

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO MULTICANAL E  
DE UM ANALISADOR AUTOMÁTICO DE FLUXO  
MONOSSEGMENTADO**

**Tese de Doutorado**

Ivo Milton Raimundo Junior

orientador: Prof. Dr. Celio Pasquini

- 1995 -



UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	T UNICAMP
	R133c
V	EX.
T. Nº	30/26.509
PRON	667/96
	0   0   K
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/01/96
N.º C/D	



Cm 62282496-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP**

Raimundo Junior, Ivo Milton  
R133c      Construção de um espectrofotômetro multicanal e de um  
analizador automático de fluxo monossegmentado / Ivo Mil-  
ton Raimundo Junior. -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientador: Celio Pasquini.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Química.

1. Instrumentação. 2. Espectrofotometria multicanal.  
3. Análise em fluxo. I. Pasquini, Celio. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**aos meus pais, Gilda e Ivo**

## AGRADECIMENTOS

---

- ao Jarbas, grande amigo, com quem dividi as angústias e as alegrias de se fazer uma tese.
- aos Profs. Wilson, Lauro e Tubino, pelas sugestões e pela colaboração com reagentes e instrumentos.
- ao Prof. Bruns, pela orientação nos estudos envolvendo planejamento fatorial.
- à Dra. Lúcia Parentoni e a todos os funcionários e professores do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital da Unicamp, pela atenção e pela paciência na separação das "intermináveis" amostras de soro e plasma.
- à Margarete e ao Gentil, que também muito me ensinaram.
- aos amigos dos Laboratórios de Instrumentação e Automação em Química Analítica e de Química Ambiental: Cristina, Roberta, Raquel, Rosana, Marta, Soraya, Vera, Sandra, Sônia, Cláudia, Ileana, Viviane, Dena, Marco, Tuca, Pedro, Ronei, Ailton, Eduardo, Fernando, Bellato, Saliba, Henrique e Efraim, pelas eventuais colaborações, pela alegria e pelo bom humor (quase) sempre constantes.
- aos amigos do antigo Laboratório B-200: Beth, Dri, Solange, Bell, Cida, Helena, Noemi, Lorena, Nívea, Paulo, Bili, Patrício, Cláudio e César pela convivência sempre agradável.
- à D. Iara, Paula e Laurindo, pelo atendimento sempre atencioso e pelos cuidados na encadernação desta tese.
- aos meus amigos-irmãos Zé Médico, Zé Ricardo, Mandelli, Sérgio, Zuca, Fernanda, Fátima e Sílvia, por estarmos sempre juntos.
- à Cíntia, que me deu ânimo para terminar esta tese e me compreendeu.

**obrigado !**

Agradeço especialmente ao **Celio**,  
pela orientação segura, pela confiança  
e pela amizade sincera. Agradeço-o também  
pelo grande incentivo, desde os tempos da "Química".

## CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO MULTICANAL E DE UM ANALISADOR AUTOMÁTICO DE FLUXO MONOSSEGMENTADO

autor: Ivo Milton Raimundo Junior

orientador: Prof. Dr. Celio Pasquini

Um espectrofotômetro multicanal sensível na região visível do espectro foi construído empregando-se um arranjo de fotodiodos RL512G (EGG-Reticon) como detector. A parte óptica do espectrofotômetro foi montada segundo o arranjo simétrico de Czerny-Turner, usando-se uma fenda de entrada ajustável, espelhos côncavos com 100 mm de distância focal e uma rede de difração com 600 linhas  $\text{mm}^{-1}$ . Este arranjo óptico resultou em uma dispersão linear de  $15,36 \text{ nm mm}^{-1}$  ( $0,384 \text{ nm diodo}^{-1}$ ), possibilitando o monitoramento de uma faixa espectral de cerca de 200 nm, com uma resolução de 1 nm. O controle do instrumento foi efetuado através de um sistema mínimo de computador baseado na CPU 8085, o qual armazena os dados espectrais em sua memória RAM e os transfere para um microcomputador padrão IBM, através de uma porta de comunicação serial RS232C. O programa de controle, aquisição e tratamento de dados foi escrito em Microsoft QuickBasic 4.5. A faixa dinâmica e a relação sinal/ruído do espectrofotômetro foram otimizadas empregando-se tempos de integração variáveis e filtros digitais. Os espectros podem ser obtidos em um mínimo de 44 ms (integração constante) ou de 307 ms (integração variável), com as absorbâncias das linhas base apresentando desvios padrão respectivamente iguais a 0,0021 e 0,0011, quando são usados filtros digitais sem peso, com média móvel de 5 diodos. Além das aplicações usuais, o espectrofotômetro pode ser empregado em sistemas de análise em fluxo, determinações cinéticas e determinações simultâneas.

Um analisador automático de fluxo monossegmentado também foi construído, empregando-se o espectrofotômetro multicanal como detector. Basicamente, o analisador foi implementado com o desenvolvimento de uma válvula amostradora e de um módulo de adição de reagentes automáticos e de um sistema de detecção, controlados por uma interface conectada a um microcomputador através de uma porta de comunicação paralela C18255. Neste analisador, as bolhas de ar do monossegmento possibilitam a localização da amostra para a adição automática de reagentes e para detecção. Com o desenvolvimento do módulo de adição de reagentes, determinações que envolvem reações sequenciais podem ser empregadas em análise em fluxo monossegmentado, com uma sensibilidade que independe do volume de amostra injetado e com um consumo de reagentes frequentemente menor que o de outros sistemas de análise em fluxo. O programa de controle do instrumento foi escrito em Microsoft QuickBasic 4.5. O analisador foi aplicado às determinações de espécies de interesse clínico, tais como glicose, creatinina e uréia. Um procedimento de diluição foi desenvolvido, possibilitando que o soro e/ou plasma seja diluído simultaneamente com a injeção. Com o uso de reatores de vidro e uma frequência de amostragem de  $90 \text{ h}^{-1}$ , um grau de intercontaminação de 2,5 % foi obtido nas determinações das três substâncias. Os resultados foram comparados com os do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sendo obtidos coeficientes de correlação iguais a 0,997; 0,982 e 0,996 para as determinações de glicose, creatinina e uréia, respectivamente.

## CONSTRUCTION OF A MULTICHANNEL SPECTROPHOTOMETER AND AN AUTOMATIC MONOSEGMENTED FLOW ANALYZER

author: Ivo Milton Raimundo Junior

supervisor: Prof. Dr. Celio Pasquini

A multichannel visible spectrophotometer was constructed based on the use of an EGG-Reticon RL512G photodiode array detector. A symmetric Czerny-Turner optical design was employed, with an adjustable entrance slit, 100 mm focus concave mirrors and a 600 line  $\text{mm}^{-1}$  dispersion grating. This assembly allowed to scan a spectral range of 200 nm, with a linear dispersion of  $15.36 \text{ nm mm}^{-1}$  ( $0.384 \text{ nm diode}^{-1}$ ). The control of the instrument was achieved by using a single-board microcomputer based on the 8085 Intel microprocessor. Spectral intensity data were stored in the single board RAM and subsequently transferred to an IBM compatible microcomputer through a RS232C interface. The software for control, data acquisition and data treatment was written in Microsoft QuickBasic 4.5. The dynamic range and signal-to-noise ratio of the spectrophotometer were improved by using a variable integration time and smoothing procedures. Spectra can be scanned in a time interval as low as 44 ms (constant integration) or 307 ms (variable integration), with base line absorbances having standard deviations of 0.0021 and 0.0011, respectively. In addition to the usual applications, the instrument is suitable to be employed in flow analysis systems, kinetic determinations and simultaneous determinations.

An automatic monosegmented flow analyzer was also constructed, employing the spectrophotometer as the detector. The analyzer has three basic components, controlled by an interface connected to an IBM compatible microcomputer through an 8255 parallel communication port: an automatic sampling valve, an automatic reagent addition module and detection system. In this analyzer, the air bubbles of the monosegment are used for sample localization allowing for reagent addition and synchronous detection without air bubble removal. The reagent addition module permits sequential reactions to be employed in monosegmented flow analysis, with a sensitivity that is independent of the injected sample volume and with reagent consumption frequently lower than in other flow methods. The software for the instrument was written in Microsoft QuickBasic 4.5. The analyzer was employed in the determination of glucose, creatinine and urea in plasma or serum. A dilution procedure was developed that allows the sample dilution to be performed simultaneously with sample injection. Glass reactors were used and a 2.5 % sample intercontamination was obtained by employing a sampling frequency of  $90 \text{ h}^{-1}$ . The results were compared with those obtained by the UNICAMP Hospital and showed correlation coefficients of 0.997, 0.982, 0.996 for the determination of glucose, creatinine and urea, respectively.

<b>I.</b>	<b>Apresentação.....</b>	<b>01</b>
<b>II.</b>	<b>Spectrofotometria Multicanal e Arranjos de Fotodiodos.....</b>	<b>05</b>
II.1.	Spectrofotometria Multicanal.....	05
II.2.	Detectores de Arranjo de Fotodiodos.....	09
II.3.	Desenvolvimento e Aplicações Analíticas de Spectrofotômetros com Arranjo Linear de Fotodiodos.....	17
<b>III.</b>	<b>Construção de um Spectrofotômetro Multicanal.....</b>	<b>22</b>
III.1	Implementação do Spectrofotômetro.....	24
III.1.1.	Arranjo Óptico.....	24
III.1.2	O Arranjo de Diodos RL512G.....	25
III.1.2.1.	Eletrônicas Analógica e Digital.....	27
III.1.2.2.	Extração de Sinais do Arranjo de Diodos RL512G.....	29
III.1.3.	Programa Computacional do Spectrofotômetro.....	31
III.1.3.1.	Procedimentos de Varredura.....	32
III.1.3.2.	Processamento dos Dados.....	35
III.1.3.3.	Calibração do Spectrofotômetro.....	36
III.2.	Soluções para Avaliação do Spectrofotômetro.....	38
III.3.	Resultados e Discussão.....	38
III.3.1.	Interação Instrumento-Usuário.....	38
III.3.2.	Avaliação do Spectrofotômetro.....	40
III.4.	Conclusões e Perspectivas.....	55
<b>IV.</b>	<b>Análise em Fluxo Monossegmentado.....</b>	<b>58</b>
IV.1.	Análises em Fluxo.....	58
IV.2.	Desenvolvimento e Aplicações da Análise em Fluxo Monossegmentado.....	64
<b>V.</b>	<b>Dispersão em Análise em Fluxo Monossegmentado.....</b>	<b>71</b>
V.1.	Experimental.....	74
V.2.	Resultados e Discussão.....	75
V.3.	Conclusões.....	84

<b>VI. Construção de um Analisador Automático de Fluxo Monossegmentado</b> .....	86
VI.1. Implementação do Analisador.....	89
VI.1.1. Válvula Amostradora Automática.....	91
VI.1.2. Módulo Automático de Adição de Reagentes.....	93
VI.1.3. Sistema de Detecção.....	96
VI.1.4. Descrição Geral do Analisador: "hard" e "software".....	97
VI.2. Soluções para Avaliação do Analisador.....	100
VI.3. Resultados e Discussão.....	101
VI.3.1. Interação Instrumento-Usuário.....	101
VI.3.2. Avaliação do Analisador.....	102
VI.4. Conclusões.....	107
<b>VII. Aplicação do Analisador a Amostras de Interesse Clínico</b> .....	110
VII.1. Sistema de Diluição.....	111
VII.1.1. Descrição do Sistema.....	112
VII.1.2. Avaliação do Sistema de Diluição.....	115
VII.1.3. Conclusões.....	117
VII.2. Glicose, Creatinina e Uréia.....	118
VII.2.1. Experimental.....	123
VII.2.1.1. Glicose.....	123
VII.2.1.2. Creatinina.....	124
VII.2.1.3. Uréia.....	124
VII.2.2. Resultados e Discussão.....	125
VII.2.3. Conclusões e Perspectivas.....	137
<b>VIII. Apêndices</b> .....	139
VIII.1. Interface Serial RS232C.....	139
VIII.2. Programa da EPROM do Sistema Mínimo.....	141
VIII.3. Programas de Controle do Espectrofotômetro.....	145
VIII.4. Programa de Controle do Sistema Mínimo.....	155
VIII.5. Circuito Eletrônico da Válvula Amostradora.....	163
VIII.6. Circuito Eletrônico do Módulo de Adição de Reagentes.....	167
VIII.7. Circuito Eletrônico do Sistema de Detecção.....	170
VIII.8. Circuitos Eletrônicos de Controle.....	171
VIII.9. Circuito Eletrônico da Porta do Usuário.....	172
VIII.10. Circuito Eletrônico de Decodificação de Endereços.....	173
VIII.11. Programa de Controle do Analisador.....	174
<b>IX. Referências</b> .....	185

# I. APRESENTAÇÃO

---

Atualmente, um dos principais objetivos da Química Analítica é obter, com melhor qualidade e menor quantidade de material, o maior número possível de informações a respeito de uma amostra e/ou sistema, investindo, ainda, menos tempo, recursos e esforço humano [1]. Dois fatos científicos ocorridos nas últimas décadas possibilitam, hoje, que este objetivo seja alcançado com êxito e relativa facilidade e têm, inevitavelmente, direcionado as tendências da Química Analítica contemporânea. O primeiro está relacionado com o desenvolvimento da Análise por Injeção em Fluxo (do inglês Flow Injection Analysis - FIA), cuja potencialidade foi salientada, em 1975, por Ruzicka e Hansen [2] e o segundo, ocorrido no início dos anos 80, está relacionado com a disseminação do uso dos microprocessadores e, em particular, com o desenvolvimento, feito pela IBM, do microcomputador no padrão no qual é hoje conhecido [3]. Na realidade, é através da automação e/ou instrumentação que a Química Analítica consegue atingir o objetivo citado acima e, neste aspecto, o sistema FIA desempenha um papel importante e o microcomputador um papel fundamental.

A automação de métodos analíticos vem, de certa forma, suprir a crescente demanda que tem ocorrido especialmente nas áreas de química ambiental e clínica. Dentre as vantagens que podem justificar a automação de um método, o aumento de produtividade, a melhora da qualidade do resultado final (exatidão e precisão) e a redução dos custos são as normalmente citadas [4-6], embora a segurança do analista/operador também seja um fator importante, principalmente nos laboratórios de análises clínicas [6,7]. A

instrumentação atual, por sua vez, trouxe novas perspectivas para a Química Analítica, onde os conceitos de multidimensão e de simultaneidade e os aspectos cinéticos são bastante significativos [1].

Os sistemas de análise em fluxo, em especial aqueles que empregam a injeção de amostra, frequentemente oferecem as vantagens dos sistemas automáticos, possibilitando também o desenvolvimento de métodos tão sensíveis quanto os manuais com baixo consumo de reagentes e amostras. Claramente, esta última característica inclui as análises em fluxo dentro da filosofia da química em microescala, que vem sendo difundida nas áreas de Química Orgânica e Inorgânica [8,9]. Entretanto, os sistemas de análise em fluxo não podem, invariavelmente, ser considerados automáticos, mas sim mecanizados, segundo a aceção da IUPAC\* [10,11]. A automação somente se dará se houver uma etapa de realimentação capaz de controlar uma das principais operações do sistema. Apesar desta realimentação poder ser facilmente implementada com o auxílio de um microcomputador, o emprego deste no controle de sistemas de análise em fluxo nem sempre proporciona um método realmente automático. Na maioria das vezes, o produto final consiste em um sistema entre a mecanização simples e a automação completa, onde o microcomputador pode controlar o processamento da amostra, adquirir e tratar dados e fornecer o resultado final mas não pode, por exemplo, reprocessar uma amostra cuja concentração esteja fora dos limites da curva de calibração.

Dentro do contexto descrito acima, esta tese descreve a construção de um espectrofotômetro multicanal e de um analisador automático de fluxo monossegmentado.

---

\* **Mecanização** refere-se ao uso de dispositivos para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o esforço humano. **Automação** relaciona-se ao uso combinado de dispositivos mecânicos e instrumentais para substituir, refinar, ampliar ou suplementar o esforço e a inteligência humanos no desempenho de um dado processo, no qual pelo menos uma das principais operações é controlada sem a intervenção humana, por um sistema de realimentação [10,11].

Primeiramente foi construído o espectrofotômetro, empregando-se como detector um arranjo linear de fotodiodos (do inglês Photodiode Array, PDA), sensível na região visível do espectro eletromagnético. Todos os componentes utilizados na construção do espectrofotômetro podem ser encontrados no mercado nacional, com exceção da rede de difração e do PDA, cujo modelo, de baixo custo, é usado em aparelhos de fac-símile. A filosofia adotada no desenvolvimento do espectrofotômetro visou torná-lo uma unidade independente e versátil. Portanto, ele possui um sistema mínimo de computador, capaz de efetuar uma série de tarefas, que deve ser controlado por qualquer microcomputador padrão IBM através de uma porta de comunicação serial RS232C. O programa de controle, aquisição e tratamento de dados, escrito em QuickBasic 4.5, possibilita que o espectrofotômetro, além das aplicações usuais, possa ser empregado em determinações simultâneas, determinações cinéticas e em sistemas de análise em fluxo.

Em uma segunda etapa, foi construído um analisador automático de fluxo monossegmentado, empregando o espectrofotômetro multicanal como detector. Fundamentalmente, o analisador foi implementado com o desenvolvimento de um injetor e de um módulo de adição de reagentes automáticos e de um sistema de detecção, controlados por uma interface construída para tal fim que, por sua vez, é conectada a um microcomputador através de uma porta de comunicação paralela. Neste analisador, as bolhas de ar do monossegmento desempenham um importante papel, possibilitando a localização da amostra para a adição automática de reagentes e para sua detecção.

Finalmente, o analisador foi aplicado às determinações de espécies de interesse clínico, tais como uréia, creatinina e glicose. Como em todas estas determinações as amostras de plasma e/ou soro sanguíneo

necessitam de uma diluição, foi desenvolvida uma técnica na qual a diluição da amostra é efetuada concomitantemente com sua injeção no analisador. O programa de controle do analisador, escrito em QuickBasic 4.5, necessita que o usuário informe a espécie a ser determinada para que o microcomputador defina o comprimento de onda monitorado e os reagentes adicionados. Os resultados das determinações são mostrados no monitor de vídeo na forma de um relatório, cuja cópia pode ser impressa.

## **II. ESPECTROFOTOMETRIA MULTICANAL E ARRANJOS DE FOTODIODOS**

---

### **II.1. Espectrofotometria Multicanal**

Os sistemas ópticos empregados em espectroscopia podem ser classificados, dentre outras maneiras, como multiplexados e não-multiplexados.

Os instrumentos multiplexados empregam um único detector que recebe informações simultâneas codificadas segundo um determinado padrão, que são posteriormente transformadas, através de métodos matemáticos, em informações espectrais. Estes instrumentos podem, ainda, utilizar sistemas dispersivos ou não-dispersivos, cujos exemplos mais significativos são os espectrofotômetros com transformada de Hadamard [12] e com transformada de Fourier [13], respectivamente.

Os instrumentos não-multiplexados podem, entretanto, empregar um ou vários detectores [14,15]. Os que empregam apenas um detector são chamados monocanais ou temporais e monitoram de forma sequencial as intensidades de radiação do espectro eletromagnético. Aqueles que empregam vários detectores são chamados multicanais ou espaciais, monitorando simultaneamente vários comprimentos de onda do espectro. Como os anteriores, os instrumentos não-multiplexados também podem ser dispersivos, empregando, via de regra, uma rede de difração, e não-dispersivos, empregando, por exemplo, filtros ou diodos emissores de luz. Atualmente os sistemas dispersivos são os mais encontrados, sendo que os espectrofotômetros monocanais normalmente usam uma rede de difração

rotatória (movida manual ou automaticamente) e como detector uma fotomultiplicadora (PMT, photomultiplier tube) fixada na fenda de saída do monocromador. Por sua vez, os instrumentos multicanais geralmente têm um monocromador fixo, podendo empregar como detectores filmes fotográficos, arranjo de fotomultiplicadoras, dispositivos de transferência de carga (CTD, Charge Transfer Devices) e arranjos de fotodiodos (PDA, Photodiode Array).

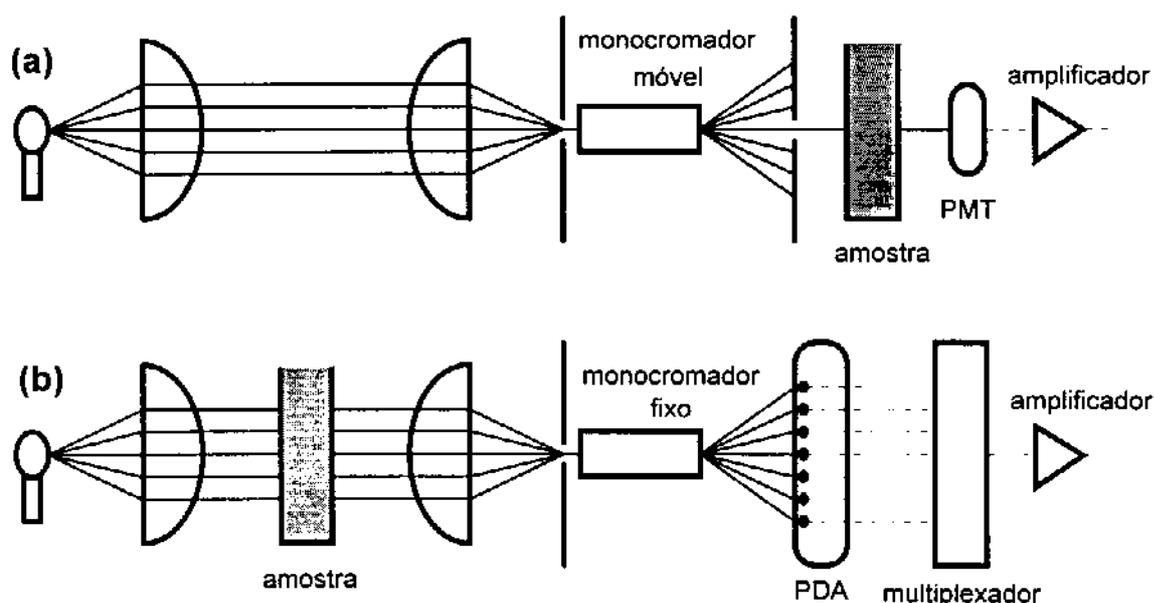
A primeira vantagem que pode ser obtida com instrumentos multicanais está diretamente relacionada com o tempo de análise e o ruído do sinal medido. A simultaneidade na aquisição de dados pode resultar, em comparação com um instrumento monocanal, em uma análise mais rápida se a relação sinal/ruído for mantida constante ou em um aumento na relação sinal/ruído se o tempo de análise for fixado [16]. Isto pode ser facilmente compreendido ao se fazer uma analogia com a pesagem de vários objetos em várias balanças, onde a massa de um objeto está relacionada com a intensidade de um comprimento de onda medido e cada balança associada a cada detector [17]. Supondo que existam quatro objetos para serem pesados em quatro balanças, dois procedimentos podem ser adotados. O primeiro consiste na pesagem simultânea destes quatro objetos em cada uma das quatro balanças, o que leva a uma determinação das massas em um tempo quatro vezes menor que com o uso de uma única balança. O segundo procedimento consiste na pesagem de cada um dos objetos nas quatro diferentes balanças, no mesmo tempo necessário para estes quatro objetos serem pesados em uma única balança. Desta forma, cada objeto é pesado quatro vezes e a estimativa do desvio padrão relativo na massa de cada objeto é reduzida à metade ( $\sqrt{4}$ ) [18]. Da mesma forma, quando comparado com um espectrofotômetro convencional, um multicanal disposto com  $n$  detectores pode, teoricamente,

obter um espectro em um tempo  $n$  vezes menor ou com um aumento na relação sinal/ruído proporcional a  $\sqrt{n}$ .

Os instrumentos multicanais podem ser desenvolvidos com o uso de arranjos de fotomultiplicadoras como, por exemplo, os encontrados nos espectrofotômetros de emissão atômica em plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). Estes instrumentos são classificados como espectrômetros de leitura direta [15], sendo que as fotomultiplicadoras empregadas, a despeito de suas vantagens (excelente sensibilidade, ampla faixa dinâmica, resposta rápida), trazem alguns inconvenientes incompatíveis com um detector multicanal verdadeiro. Embora miniaturizadas, estas fotomultiplicadoras podem ser dispostas nestes espectrofotômetros a uma distância mínima que ainda requer uma grande dispersão da radiação eletromagnética, o que, inevitavelmente, limita o número de canais do instrumento. Desta forma, os espectrofotômetros de leitura direta são fabricados para aplicações pré-determinadas, monitorando certos comprimentos de onda e sendo, portanto, pouco flexíveis [15,19,20].

Os espectrofotômetros equipados com arranjos lineares de fotodiodos trouxeram, nos últimos quinze anos, uma nova dimensão para a espectrofotometria, principalmente a UV-visível, quando comparados com os espectrofotômetros com banco de fotomultiplicadoras ou com redes de difração (ou espelhos) móveis. A Figura II.1 mostra os esquemas básicos de um espectrofotômetro com PDA e com rede de difração móvel, salientando suas principais diferenças [21]. O espectrofotômetro de arranjo de diodos emprega um sistema de óptica reversa [22], isto é, a rede de difração é colocada entre a amostra e o detector e não entre a fonte de radiação e a amostra. Assim sendo, no PDA a radiação policromática incide sobre a amostra e é, então, dispersa em um monocromador fixo em diferentes comprimentos de onda que são monitorados simultaneamente pelos diodos do arranjo. Esta configuração com

monocromador fixo traz algumas vantagens, possibilitando ao espectrofotômetro PDA tanto adquirir um espectro sem distorções e em poucos milissegundos como medir os comprimentos de onda com alta repetibilidade, pois o tempo de varredura não é determinado pelo movimento da rede de difração e a repetibilidade é limitada apenas pela geometria do detector, respectivamente. Entretanto, um espectrofotômetro PDA pode estar mais sujeito aos problemas provenientes de radiação espúria, que não pode ser eliminada por meio de filtros, e das estabilidades da fonte e/ou do detector, que não podem ser facilmente compensadas com um sistema de duplo feixe, como feito nos espectrofotômetros convencionais.



**Figura II.1.** Diagrama de um espectrofotômetro convencional com rede de difração móvel (a) e um multicanal com arranjo de fotodiodos (b).

Portanto, por estes aspectos, a aplicação de um espectrofotômetro multicanal com um arranjo de fotodiodos é particularmente recomendada no estudo de sistemas com sinais transientes (como FIA e HPLC) e na

diferenciação de compostos que absorvem em comprimentos de onda bastante próximos. Todavia, é importante salientar que nos casos onde o tempo para a obtenção de um espectro não é o parâmetro crítico, o desempenho de um espectrofotômetro convencional com rede de difração móvel é, ainda, melhor que um com PDA, devido a maior sensibilidade apresentada por uma fotomultiplicadora.

## II.2. Detectores de Arranjo de Fotodiodos

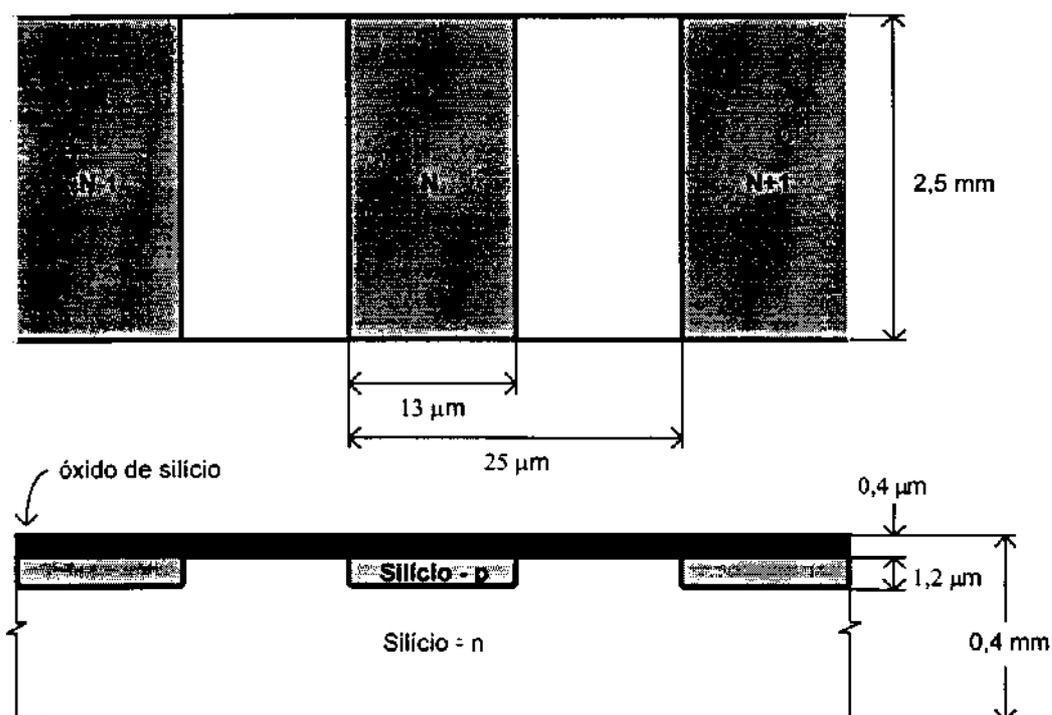
Um detector de arranjo de fotodiodos consiste em um circuito integrado único que possui um sensor de radiação, um elemento de armazenamento e um elemento de leitura. O arranjo de diodos (também chamados elementos, canais ou pixels) é fabricado em um único cristal de silício, onde cada diodo atua simultaneamente como transdutor de intensidade luminosa / carga elétrica e como elemento de armazenamento de carga.

O PDA é preparado pela oxidação da superfície de um substrato semicondutor\* do tipo-n, produzindo uma camada de óxido de silício cuja

---

\* Um material é semicondutor quando possui a banda de valência totalmente preenchida com elétrons, cuja diferença de energia em relação à banda de condução ("band gap") não é muito grande. Em outras palavras, o semicondutor é capaz de transferir um elétron da banda de valência para a banda de condução às custas de uma quantidade de energia muito pequena. Um semicondutor intrínseco é um material puro no qual a energia térmica é suficiente para promover um elétron da banda de valência para a banda de condução. Este processo cria um centro positivo na banda de valência, chamado lacuna ("hole"), capaz de se mover através desta banda. Em um semicondutor, tanto os elétrons como as lacunas, chamados de transportadores, dão origem à corrente elétrica. Um semicondutor extrínseco possui defeitos em seu retículo cristalino, provocado através de um processo de dopagem. Se o semicondutor intrínseco é dopado com uma "impureza química" que possui mais elétrons na banda de valência que o substrato, obtém-se um semicondutor do tipo-n (elétrons são os transportadores majoritários). Caso contrário, se o dopante possui menos elétrons na banda de valência que o semicondutor intrínseco, obtém-se um semicondutor tipo-p (lacunas são os transportadores majoritários). É importante notar que os semicondutores tipo-n e -p não são carregados negativa e positivamente, como pode ser induzido a pensar [23].

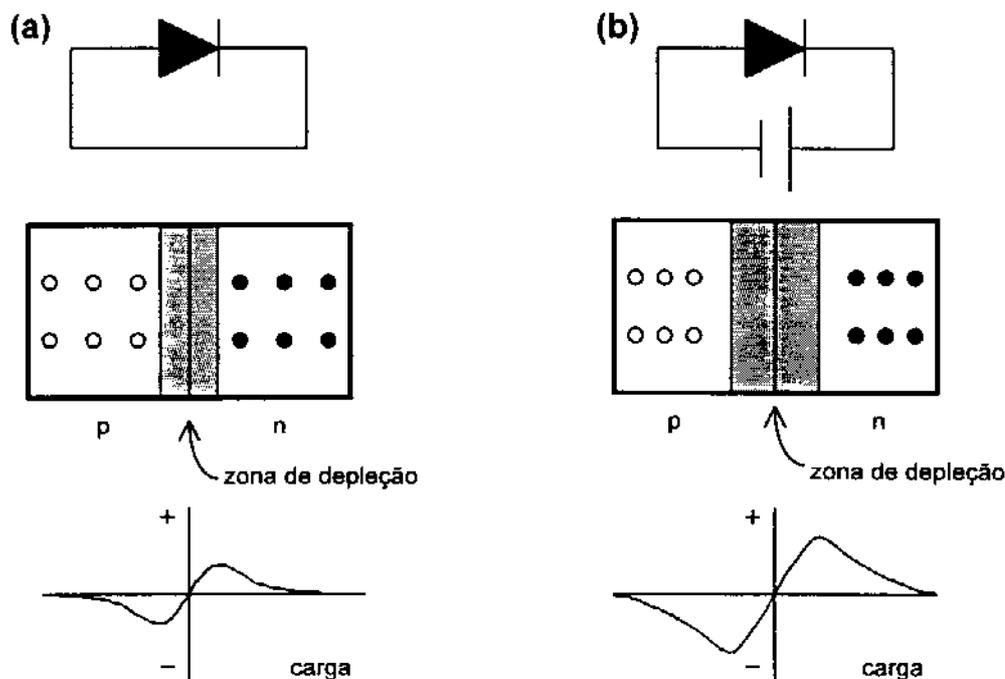
espessura pode variar de 0,4 a 3,0  $\mu\text{m}$  [23,24]. Pequenas janelas são então abertas na camada de óxido por um processo de fotolitografia, onde são formadas as junções pn, através da difusão de um semiconductor do tipo-p. Esta camada difusa de silício tipo-p pode ter uma espessura de 1,2 a 1,5  $\mu\text{m}$ . A Figura II.2 mostra um diagrama esquemático do cristal de silício e da geometria do sensor. Os arranjos com esta geometria (2,5 mm de altura e espaçamento centro a centro de 25  $\mu\text{m}$ ) são específicos para fins espectroscópicos pois possuem as mesmas proporções (100:1) de uma fenda de saída de um monocromador convencional.



**Figura II.2.** Diagrama esquemático da geometria de um arranjo linear de fotodiodos.

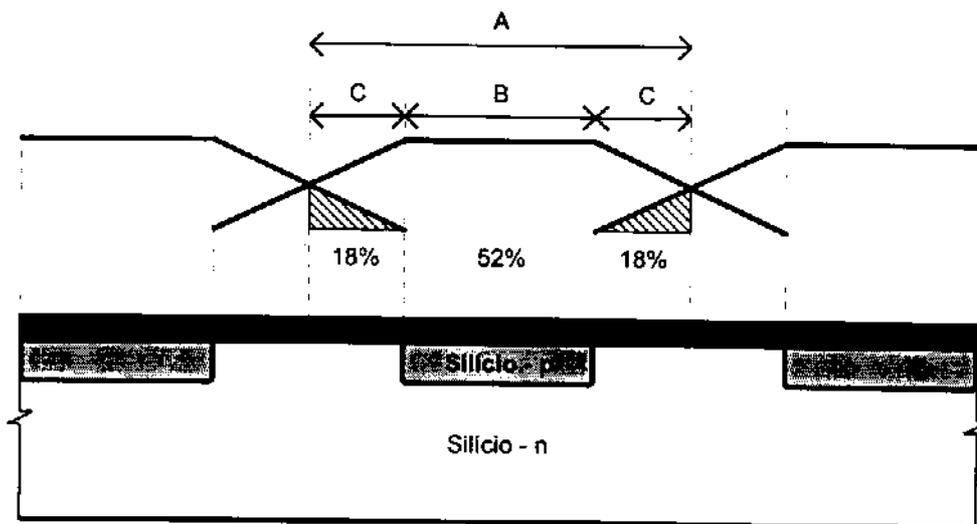
Na junção pn, os transportadores de carga majoritários de ambos os semicondutores migram em sentidos opostos, isto é, os elétrons migram do semiconductor tipo-n para o -p e as lacunas migram do semiconductor tipo-p para

o -n. Com este processo de difusão ocorre a formação de um potencial na interface cujo campo elétrico se opõe à difusão adicional dos transportadores majoritários através da junção. Desta forma, na região adjacente à junção, o semicondutor tipo-n fica positivamente carregado em relação ao tipo-p, como mostrado na Figura II.3a. Na região contígua à junção pn é criada uma zona de recombinação, conhecida como zona de depleção, onde um elétron tem maior probabilidade de preencher uma lacuna da banda de valência. Nesta região existem poucos transportadores e, portanto, a sua resistência é alta. O dispositivo assim construído com a junção dos materiais tipo-n e -p é conhecido como diodo semicondutor. Em um PDA a junção pn é polarizada reversamente, aumentando a barreira de energia que os transportadores de carga precisam atravessar, devido ao aumento da zona de depleção (Figura II.3b), permitindo que cada diodo do arranjo se comporte como um minúsculo capacitor [23,25].



**Figura II.3.** Influência da polarização sobre a zona de depleção: sem polarização (a) e com polarização reversa (b).

Os fótons absorvidos tanto pela região -p como a -n podem produzir lacunas e elétrons, se possuírem energia suficiente para isto. Estas lacunas e estes elétrons são atraídos, respectivamente, para os polos negativo e positivo do diodo reversamente polarizado, isto é, as lacunas migram para a região -p e os elétrons para a região -n. Os fótons absorvidos entre duas ilhas de semiconductor tipo-p (isto é, absorvidos pela região -n) produzem cargas que são proporcionalmente divididas entre os diodos adjacentes. A Figura II.4 mostra a função de resposta de um arranjo de diodos, onde 52 % da carga gerada é proveniente da região -p e 36 % da região -n adjacente ao diodo [25].

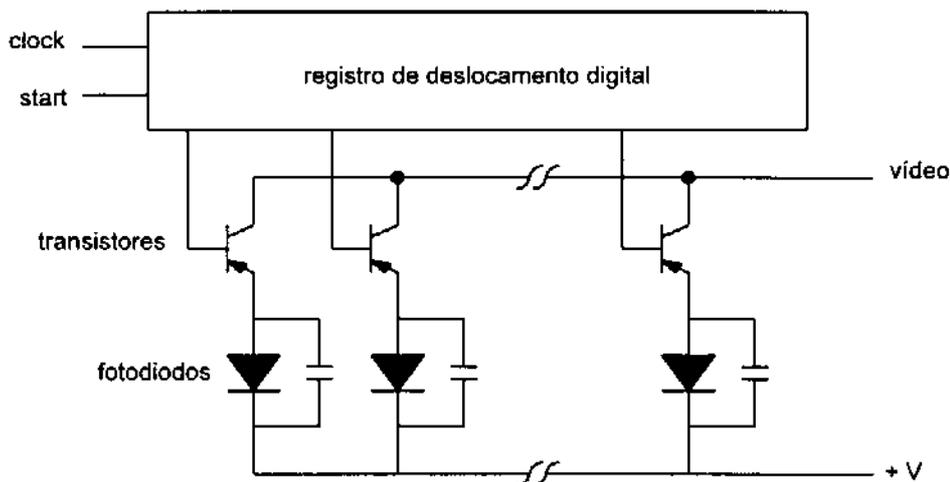


**Figura II.4.** Função de resposta idealizada de um diodo do arranjo devido à radiação incidente sobre  $25 \mu\text{m}$  a partir do centro do diodo (A), diodo (região -p) de  $13 \mu\text{m}$  (B) e região -n da matriz de  $6 \mu\text{m}$  (C).

Portanto, a absorção de fótons descarrega o minúsculo capacitor formado pelo diodo reversamente polarizado. Este processo também ocorre devido à formação de cargas geradas termicamente, conhecidas como corrente de escuro ("dark current"). Desta forma, em muitas aplicações, principalmente

naquelas onde existe a necessidade de longos períodos de exposição, o arranjo de diodos deve ser resfriado. O resfriamento é normalmente efetuado com nitrogênio líquido ou com elementos tipo Peltier, sendo que a corrente de escuro diminui à metade para uma diminuição de cerca 7-9 °C na temperatura [24,25]. Logo, mantida a corrente de escuro em níveis desprezíveis, o capacitor formado pelo diodo descarrega proporcionalmente à potência de radiação luminosa que nele incide e ao tempo de exposição à esta radiação.

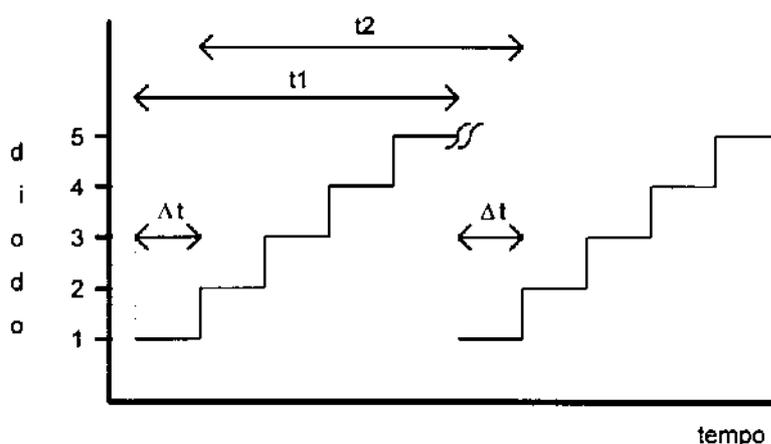
Os arranjos de diodos podem ser encontrados com 128 até 4096 elementos, sendo os mais comuns os de 512 e 1024. Embora a detecção da radiação seja simultânea, o processo de leitura de cada diodo é sequencial. A Figura II.5 mostra um diagrama esquemático simplificado do circuito de um PDA. É importante salientar que o capacitor mostrado na figura (ligado em paralelo com o diodo) não é um componente adicional do circuito mas sim uma representação da capacitância da junção pn.



**Figura II.5.** Diagrama simplificado de um arranjo linear de fotodiodos.

Cada fotodiodo do arranjo é conectado a uma chave-transistor (transistor de efeito de campo - FET), que é controlada por um único sinal que é

deslocado através de um registro digital (digital shift register). Um pulso de "start" (início de varredura) é usado para iniciar o processo de leitura. Após este pulso, os transistores FET são endereçados sequencialmente a cada pulso de "clock". Quando um transistor é endereçado, o diodo a ele associado é totalmente recarregado ao seu potencial de polarização reversa e a corrente que flui através do diodo e do transistor aparece na saída de vídeo. Este sinal analógico é amplificado, extraído por um circuito amostrador/retentor e, então, apresentado a um conversor analógico-digital. A frequência de "clock" que pode ser empregada na leitura dos diodos pode variar de 36 kHz ( $28 \mu\text{s}/\text{diodo}$ ) até 2 MHz ( $0,5 \mu\text{s}/\text{diodo}$ ) [16,25]. O tempo de integração é definido como o intervalo entre dois pulsos de "start" de duas varreduras consecutivas, sendo o mesmo para todos os diodos pois, uma vez iniciado o processo de leitura, o arranjo normalmente deve ser varrido sequencial e totalmente. Entretanto, como o PDA necessita de um intervalo de tempo  $\Delta t$  para ler cada um dos  $n$  sucessivos elementos, o  $n$ 'ésimo diodo do arranjo terá integrado a radiação por um mesmo intervalo de tempo, mas em um momento que difere do primeiro diodo em  $n \cdot \Delta t$ . A Figura II.6 ilustra este detalhe de um arranjo linear de fotodiodos.



**Figura II.6.** Sequência de leitura de um PDA:  $t_1$  e  $t_2$  são iguais e correspondem aos tempos de integração dos diodos 1 e 2, respectivamente.

Embora esta diferença de tempo seja desprezível em muitos casos, como por exemplo em HPLC e FIA, em algumas aplicações, como no estudo de reações rápidas, o erro introduzido pode causar uma distorção temporal [25].

O desempenho global de um espectrofotômetro que emprega um arranjo de fotodiodos é determinado, em grande parte, pelas características do detector, tais como faixa de resposta espectral, exatidão e precisão nas medidas de comprimento de onda e intensidade luminosa, resolução, sensibilidade, relação sinal/ruído e faixa dinâmica. A Tabela II.1 destaca algumas destas características (e outros parâmetros relacionados) de um arranjo de diodos e de uma fotomultiplicadora (PMT). Esta comparação está sendo feita pois, de certa forma, o desenvolvimento do espectrofotômetro PDA é consequência da necessidade de obtenção de espectros em curtos intervalos de tempo, os quais não podem ser facilmente conseguidos com um espectrofotômetro com rede de difração móvel que emprega uma PMT como detector.

**Tabela II.1.** Comparação entre os desempenhos de um arranjo de diodos (PDA) e de uma fotomultiplicadora (PMT).

parâmetro	PDA	PMT
resposta espectral (nm) <sup>a</sup>	200 - 1000	200 - 650
eficiência quântica (%)	40 - 80	10 - 20
sensibilidade (A W <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0,45	4,0 x 10 <sup>4</sup>
faixa dinâmica	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>
corrente de escuro (e <sup>-</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	624 (193 K)	3 (253 K)

(a) PDA Reticon 1024S x PMT Galileo Electro-Optics [26].

(b) PDA Reticon x PMT RCA C31034 [27].

É interessante notar que embora a eficiência quântica de uma fotomultiplicadora seja menor que a de um diodo, a sua sensibilidade é muito maior, devido ao alto ganho que possui. No exemplo citado na Tabela II.1, a sensibilidade da fotomultiplicadora é de  $0,067 \text{ A W}^{-1}$ , mas com o ganho de  $6 \times 10^5$ , o valor de  $4,0 \times 10^4$  é obtido, tornando-a mais sensível que o diodo [27].

A faixa dinâmica de um arranjo de diodos pode ser medida de diferentes maneiras, sendo duas as mais importantes [23,25,27]. Uma delas, definida como a razão entre o maior e o menor sinal obtidos em um mesmo intervalo de tempo e expressa na Tabela II.1, está relacionada com a resposta de apenas um diodo, podendo ser empregada para comparação com a resposta de uma fotomultiplicadora. Enquanto que para a PMT esta faixa é limitada pela corrente de escuro, para o PDA o limite é geralmente dado pelo conversor analógico/digital. Por exemplo, assumindo uma incerteza de  $\pm 1$  bit, para um A/D de 14 bits a razão máxima é de 1:8192, isto é, o maior sinal dividido pelo dobro do ruído de conversão [27]. A outra forma de medir a faixa dinâmica, chamada de faixa dinâmica intra-espectral simultânea ou intra-cênica, é definida como a razão entre o maior e o menor sinal obtidos simultaneamente em uma mesma varredura do arranjo. Esta faixa é geralmente menor que a primeira, sendo limitada pela reflexão de luz que ocorre entre a janela que cobre o arranjo de diodos e a sua superfície e pela corrente de escuro [24].

A exatidão na medida de comprimento de onda de um arranjo de diodos, determinada pela geometria do detector e pela dispersão linear recíproca do monocromador, é limitada, assumindo a estabilidade da fonte de radiação, por vibrações e expansão térmica dos componentes ópticos do sistema. Esta exatidão, equivalente ao produto do espaçamento entre os diodos (ou largura do diodo, tipicamente  $25 \mu\text{m}$ ) e a dispersão linear recíproca ( $\text{nm mm}^{-1}$ ), é geralmente melhor que a exatidão (e precisão) de um espectrofotômetro de

varredura, que é limitada por suas partes mecânicas móveis [24,25], como discutido qualitativamente no início deste capítulo.

Assim como a exatidão, a resolução de um PDA também é determinada pela largura do diodo e pela dispersão linear recíproca do monocromador, sendo muitas vezes definida, de maneira incorreta, como sendo o produto destes dois parâmetros. Na verdade, como o perfil de resposta de um arranjo de diodos é trapezoidal e não retangular (Figura II.4), provocando uma sobreposição parcial de informações espectrais, a resolução é piorada por um fator de aproximadamente 2,0 - 2,5 [16,24]. Apesar deste fato, a resolução obtida com um espectrofotômetro de arranjo linear de fotodiodos é ainda bastante adequada para um grande número de aplicações analíticas envolvendo principalmente absorção molecular.

Finalmente, é importante salientar que pela própria natureza de um PDA, que é capaz de gerar um número relativamente grande de dados num intervalo de tempo bastante pequeno, um espectrofotômetro multicanal com este detector necessita ser controlado por um microcomputador com desempenho razoável. Portanto, talvez tenha sido por esta necessidade que apenas na década de 80 tenham surgido os primeiros instrumentos comerciais.

### **II.3. Desenvolvimento e Aplicações Analíticas de Espectrofotômetros com Arranjo Linear de Fotodiodos**

Os espectrofotômetros que possuem PDAs como detectores são, sem dúvida alguma, os instrumentos multicanais mais acessíveis e, portanto, os mais empregados nos dias de hoje. A utilização de arranjos de fotodiodos em

espectroscopia teve início há cerca de 25 anos, sendo que um dos primeiros espectrofotômetros comerciais foi fabricado pela Hewlett-Packard (HP 8450A) no final da década de 70 [16].

No início do desenvolvimento de detectores multicanais (ou de imagem), alguns dos principais objetivos estavam pautados pela necessidade de substituição do filme fotográfico por um sistema de detecção eletrônico que possibilitasse a aquisição e interpretação dos dados de maneira simples e eficiente, aliando a conveniência da detecção simultânea obtida com o filme. Prova disto está nos primeiros trabalhos publicados que empregam arranjos de diodos como detectores em espectroscopia de emissão atômica [28-31]\*. Após uma primeira experiência na construção e aplicação de um arranjo de vinte diodos na determinação simultânea de cálcio e bário por emissão em chama [28], Boumans verificou que havia a necessidade de cooperação entre especialistas nas áreas de espectroscopia e eletrônica para o desenvolvimento de um arranjo de diodos com características próprias para ser usado como detector em espectrômetros [29]. Paralelamente, Coddington e Horlick empregavam um arranjo de 256 fotodiodos (Reticon RL 256/128) como detector tanto em espectrografia para a identificação de vários elementos [30] como em espectrofotometria de emissão e absorção atômica para a determinação de potássio, rubídio e cálcio [31], sendo que os sinais gerados pelo arranjo podiam ser digitalizados e armazenados em um pequeno computador ou mostrados no monitor de vídeo de um osciloscópio. Desde então, os sistemas de detecção e os espectrofotômetros com arranjos de diodos têm sido largamente difundidos e

---

\* Outros detectores de imagem, como citado anteriormente, podem ser empregados em espectroscopia. Na verdade, estes detectores têm sido usados desde 1949, quando Agnew e colab. [32] e Benn e colab. [33] empregaram um tubo Orticon de imagem de televisão no estudo espectroscópico de espécies transientes produzidas por combustão. Outros tipos, tais como tubos Silício-Vidicon e Vidicon Intensificado, também podem ser empregados como detectores de imagem mas o são em menor escala e aparecem esporadicamente na literatura [34]. Uma descrição detalhada de todos estes detectores pode ser encontrada em Busch e Busch [35].

cada vez mais aplicados em várias áreas da Química Analítica, tanto nas que empregam sistemas hidrodinâmicos, tais como FIA e HPLC, como naquelas que empregam sistemas discretos e necessitam apenas da detecção multicanal.

Os primeiros trabalhos empregando arranjos de fotodiodos como detectores em cromatografia líquida de alta eficiência foram apresentados, em 1976, por Dessy e colaboradores [36,37] e Milano e colaboradores [38]. No início da década de 80, quando já existiam espectrofotômetros PDA disponíveis comercialmente, os sistemas HPLC-PDA eram discutidos e suas potencialidades evidenciadas [39,40]. Estes sistemas têm experimentado, desde então, uma evolução significativa, que pode ser verificada pela fabricação de espectrofotômetros comerciais com "softwares" dedicados à cromatografia líquida de alta eficiência. Os detectores PDA possibilitaram o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e seletivos, sendo amplamente aplicados às áreas industrial, farmacêutica e clínica [21,22]. A obtenção de um espectro para cada tempo de retenção permite não só uma verificação mais completa a respeito da pureza do pico cromatográfico e conseqüentemente da eficiência da separação [21] como também uma análise mais rápida, pois em uma única eluição todos os cromóforos podem ser observados [41]. Além disto, duas espécies mal separadas cromatograficamente podem ser eventualmente determinadas caso não exista uma grande sobreposição espectral [21,41]. Estas vantagens têm sido frequentemente aproveitadas nos métodos descritos na literatura [42-44].

Os sistemas PDA para análise por injeção em fluxo, no início, não tiveram o mesmo desenvolvimento que os similares para HPLC. A primeira aplicação de um PDA como detector em sistemas de análise em fluxo foi proposta em 1979 por Anderson e colaboradores para a determinação simultânea de níquel e cobalto [45]. Os autores salientaram ainda que poucos esforços tinham sido envidados no desenvolvimento de instrumentos para este

fim, devido à dificuldade de serem encontrados reagentes que formassem complexos com vários metais, cujos espectros de absorção fossem suficientemente diferentes para diferenciá-los em uma mistura. Este trabalho mereceu, alguns anos mais tarde, uma tímida referência por parte de Janata e Ruzicka em um artigo envolvendo técnicas voltamétricas de varredura rápida [46]. Em 1986, Lázaro e colaboradores, em artigo de revisão, assinalavam que a associação FIA-PDA era "interessante, a priori", em decorrência das similaridades existentes entre os sistemas FIA e HPLC, podendo ser justificada principalmente nos casos onde a determinação simultânea era possível em função das diferenças espectrais entre duas espécies [22]. Neste mesmo artigo citavam o primeiro trabalho de determinação simultânea em sistemas FIA-PDA, publicado por Lázaro e colaboradores [47]. Neste trabalho os autores descreveram tanto um método de determinação simultânea de cobre (II) e ferro (II) ou (III), através da complexação com uma mistura de 1,10-fenantrolina e neocuproína, como outro que permitia a determinação de nitrito em uma ampla faixa de concentração em função do uso de métodos de diluição e amplificação, que podem ser facilmente implementados com espectrofotômetros multicanais. Enfatizaram ainda que, tendo em vista as determinações simultâneas, o desenvolvimento natural da análise por injeção em fluxo deveria passar pela sua associação com detectores de varredura rápida e que o sistema voltamétrico desenvolvido por Janata e Ruzicka [46] teria poucas aplicações práticas. Atualmente, os detectores multicanais, em especial os arranjos de fotodiodos, têm sido largamente utilizados em sistemas FIA, possibilitando que determinações simultâneas possam ser efetuadas tanto nos casos onde existam diferenças significativas nos espectros de absorção das espécies [48] como naqueles onde a sobreposição é significativa, que é resolvida pelo uso de métodos derivativos [49], mínimos quadrados parciais [50,51] ou regressão

linear múltipla [52]. Os sistemas FIA-PDA têm grande potencial para explorar os gradientes que podem ser gerados em análise por injeção em fluxo [53,54], possibilitando a obtenção de superfícies tridimensionais (Absorbância x comprimento de onda x tempo), cuja aplicação foi denominada "Flow Chemography" por Kowalski e colaboradores [55].

Os detectores de arranjo de diodos têm, naturalmente, amplas aplicações em determinações simultâneas sendo empregados em métodos de parada de fluxo (stopped-flow) [56,57], cinéticos [58,59], derivativos [60,61], quimiométricos [62,63] e técnicas como cromatografia gasosa [64], espectroeletroquímica [65,66], absorção atômica [67,68], emissão atômica em plasma acoplado indutivamente [20,69] e espectrografia de emissão atômica [70]. Entretanto, os espectrofotômetros PDA têm sido também empregados em determinações onde suas propriedades multicanais não são requisitadas [71,72], ocupando um espaço antes reservado apenas para as fotomultiplicadoras.

### III. CONSTRUÇÃO DE UM ESPECTROFOTÔMETRO MULTICANAL

---

O desenvolvimento de espectrofotômetros multicanais baseados em arranjos de diodos também ocorreu, como discutido anteriormente, em função da necessidade de obtenção de espectros em intervalos de tempo bastante curtos, especialmente em sistemas hidrodinâmicos. Embora os espectrofotômetros PDA sejam os instrumentos mais utilizados nesta tarefa, vários instrumentos empregando rede de difração móvel [73,74], arranjos de diodos emissores de luz (LEDs) [75,76] ou de fotomultiplicadoras [77] têm sido descritos na literatura.

Os espectrofotômetros com arranjo de fotodiodos disponíveis comercialmente ainda são de custo relativamente alto e, algumas vezes, têm a característica peculiar de incorporarem aplicações desnecessárias e, ao mesmo tempo, não poderem ser aplicados em sistemas mais simples de interesse do usuário. Este problema ocorre porque um instrumento comercial possui um programa de controle de difícil acesso, que não permite ao usuário adaptá-lo à uma aplicação específica. No entanto, esforços têm sido feitos no sentido de solucionar esta limitação dos instrumentos comerciais [78].

Vários instrumentos e sistemas multicanais baseados em arranjos lineares de fotodiodos têm sido descritos na literatura, empregando, em geral, sensores de última geração. Caceci [79], com o objetivo de estudar soluções radioativas, desenvolveu um espectrofotômetro utilizando como detector um Analisador Óptico Multicanal (OMA III, modelo 1461, EG&G) com um arranjo de 512 diodos. O instrumento construído possui ótima resolução (0,12 nm),

podendo adquirir até 255 espectros com tempo de integração e intervalo entre espectros iguais a 10 ms. Entretanto, a aquisição e tratamento de dados são feitos através de programa comercial e a relação sinal/ruído é baixa (0,017, após compensação do "drift" da linha base). Lepia e Horlick [80] desenvolveram e avaliaram dois sistemas de detecção multicanais para ICP-AES com alta resolução (0,15 nm), baseados nos PDAs Hamamatsu S2304-1024Q e Reticon 1024S. Fourest e colaboradores [81] acoplaram um instrumento comercial (marca Dilor, com arranjo de diodos Reticon 512S) a um sistema eletroquímico. A dispersão obtida foi de  $0,28 \text{ nm diodo}^{-1}$  (o que significa uma resolução de aproximadamente 0,84 nm) e pelo desenvolvimento de dois circuitos eletrônicos podem ser adquiridos um total de 127 espectros com tempos de integração tão curtos quanto  $512 \mu\text{s}$ , em intervalos de  $516 \mu\text{s}$ . Tal desempenho, entretanto, é dispensável em muitas aplicações analíticas que envolvem, por exemplo, medidas em sistemas de fluxo contínuo. Naffrechoux e colaboradores [82] desenvolveram um detector ultravioleta usando o sensor Hamamatsu S3901 (512 elementos), cuja faixa dinâmica é limitada em comprimentos de onda menores que 225 nm, sendo que os espectros podem ser obtidos (aquisição, tratamento matemático e armazenamento em disco rígido) em intervalos menores que 3 s. Gerhard e colaboradores [83] construíram um espectrofotômetro UV-VIS utilizando um detector de arranjo de diodos duplo para aplicação em um instrumento de parada de fluxo. Os detectores usados possuem 512 elementos possibilitando uma correção automática de qualquer variação de potência da fonte de radiação. O sistema pode obter consecutivamente até 18 espectros com tempos de integração de 16,5 ms e resolução de 6 nm. Um espectrômetro multi-modo para emissão atômica foi desenvolvido por Wingerd e Dessy [84], combinando a detecção multicanal de um arranjo de diodos (Reticon RL512S) com a multiplexada da transformada de

Fourier, podendo operar nos modos multicanal (dispersivo), multiplexado (interferométrico) ou multicanal/multiplexado. Enquanto que no modo dispersivo a resolução é relativamente baixa (1,2 nm), no modo dispersivo/multiplexado é melhorada, podendo chegar a 0,017 nm.

É importante salientar que estes sistemas de detecção multicanais foram construídos utilizando sempre que possível as facilidades oferecidas comercialmente, incluindo programas de controle. Vários deles [79-81,83] utilizam também sistemas de resfriamento Peltier para melhorar a relação sinal/ruído do detector. Por estes motivos, estes instrumentos possuem um custo relativamente alto. Entretanto, como dito anteriormente, o objetivo desta tese é a construção de um espectrofotômetro multicanal de baixo custo, com base em um arranjo linear de fotodiodos normalmente empregado em aparelhos de fac-símile.

### **III.1. Implementação do Espectrofotômetro**

#### **III.1.1. Arranjo Óptico**

A parte óptica do instrumento foi montada sobre uma placa de alumínio de 25 x 30 mm, com 10 mm de espessura, segundo o arranjo simétrico de Czerny-Turner, como mostrado na Figura III.1. Foram empregados dois espelhos côncavos de 50 mm de diâmetro e 100 mm de distância focal (Funbec) e uma rede de difração de 2,5 x 2,5 mm, com 600 linhas/mm e blaze em 500 nm (Edmond Scientific). A fenda de entrada regulável e os suportes posicionadores dos espelhos, da rede de difração e do PDA foram construídos pela Optrom (Campinas - SP). O feixe luminoso foi guiado até à fenda de entrada regulável

através de um cabo de fibra óptica de vidro de 3 mm de diâmetro (Reinchenbach, São Paulo - SP), sendo colimado pelo espelho E1 sobre a rede de difração R, onde foi dispersado e posteriormente focalizado pelo espelho E2 sobre o PDA. Os espelhos E1 e E2 foram dispostos de tal forma que os ângulos  $\theta_1$  e  $\theta_2$  fossem os menores possíveis e iguais (arranjo simétrico) para minimizar aberrações ópticas [85]. O arranjo de diodos foi fixado na parte de trás do cartão de circuito impresso que contem a eletrônica básica para extração dos sinais, sendo que o primeiro elemento a ser acessado no procedimento de leitura foi exposto à radiação de maior comprimento de onda.

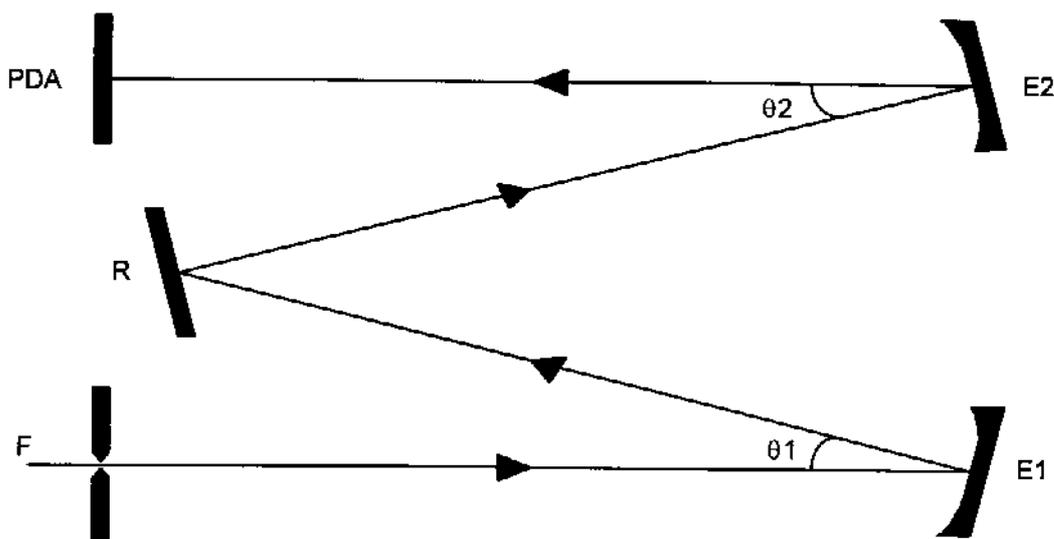


Figura III.1. Diagrama esquemático do arranjo óptico do espectrofotômetro (ângulos  $\theta_1$  e  $\theta_2$  iguais a  $17,5^\circ$ ).

### III.1.2. O Arranjo de Diodos RL512G

O arranjo linear de fotodiodos RL512G é fabricado pela EG&G Reticon para ser usado em aparelhos de fac-símile, sendo empacotado em um

"chip" de 18 pinos, com janela de vidro, o que limita a sua resposta na região de 300 a 1100 nm. A geometria do sensor é semelhante à mostrada na Figura II.2, sendo que os 512 elementos, espaçados em 25  $\mu\text{m}$  (centro a centro), possuem largura de 13  $\mu\text{m}$  e altura de 26  $\mu\text{m}$  (e não 2,5 mm como recomendado para espectroscopia) Da mesma forma, a função de resposta de cada diodo do arranjo é equivalente à apresentada na Figura II.4. A carga de saturação de cada elemento é de 4 pC e a sensibilidade, que pode diferir de 9 a 11 % de elemento para elemento, é de 2,5  $\text{pA } \mu\text{W}^{-1}\text{cm}^{-2}$  [86].

O sensor RL512G possui, na verdade, dois arranjos de diodos de 512 elementos idênticos. Um, sensível, cuja fotocorrente gerada (que descarrega o capacitor associado ao diodo) é proporcional à intensidade de radiação e ao tempo de exposição (se mantida em nível desprezível a corrente de escuro) e outro, insensível, mantido no escuro e chamado "dummy", cuja função é eliminar os transientes (ruídos) que ocorrem durante o processo de leitura dos diodos. Como descrito na seção II.2, os diodos são endereçados sequencialmente a cada pulso de "clock" e a carga necessária para recarregá-los é apresentada na saída de vídeo. Estes pulsos de "clock" geram transientes que também são apresentados na saída de vídeo. Entretanto, como para cada diodo do arranjo existe um diodo "dummy" e como eles são acessados simultaneamente, através de uma leitura diferencial dos sinais destes dois diodos o transiente de chaveamento é eliminado, pois o sinal do "dummy" contém apenas o ruído. Embora não seja descrito no catálogo do fabricante [86], parece que o arranjo "dummy" contribui também para a redução dos efeitos da corrente de escuro [23].

### III.1.2.1. Eletrônicas Analógica e Digital

O circuito analógico necessário para extrair o sinal de cada diodo do arranjo foi fornecido pela ACATEC, sendo mostrado na Figura III.2. Os sinais de corrente gerados pelos diodos ativo e "dummy" a cada pulso de "clock" (CLK) são apresentados ao amplificador operacional LH0032CG que os converte, após diferenciação, em um pulso cuja diferença de potencial é isenta do ruído de chaveamento. A diferença de potencial máxima é amostrada e segura por um "peak-holder" formado pelos diodo D1 e capacitor C1. Este sinal é amplificado pelo operacional LF351, cujo ganho foi ajustado de forma que o sinal de vídeo preencha toda a escala do conversor analógico-digital (2,5 V), quando o máximo de intensidade luminosa atinge o fotodiodo. O "peak-holder" é descarregado através de um pulso (RST) aplicado nas chaves CMOS Q1 e Q2, o que prepara o circuito para a leitura de outro diodo do arranjo.

O circuito original fornecido pela ACATEC não possui sensibilidade suficiente para detectar radiações de baixa intensidade. Este problema deve ser devido ao diodo D1, que provoca uma queda de potencial no sinal a ser amostrado pelo capacitor C1. A aplicação de 0,2 V, como indicado na Figura III.2, foi suficiente para que a correção necessária fosse efetuada.

O controle do arranjo de diodos foi feito por um sistema mínimo de computador TSI 1020 (Telemática Sistemas Inteligentes), baseado no microprocessador Intel 8085 (3,072 MHz). À área de expansão do TSI 1020 foram anexados um conversor analógico-digital de 8 bits (ADC ZN448), uma interface de comunicação programável USART (Universal Synchronous/Asynchronous Receiver/Transmitter, CI 8251A) e 4 kbytes de memória RAM estática (2 CIs 6116).

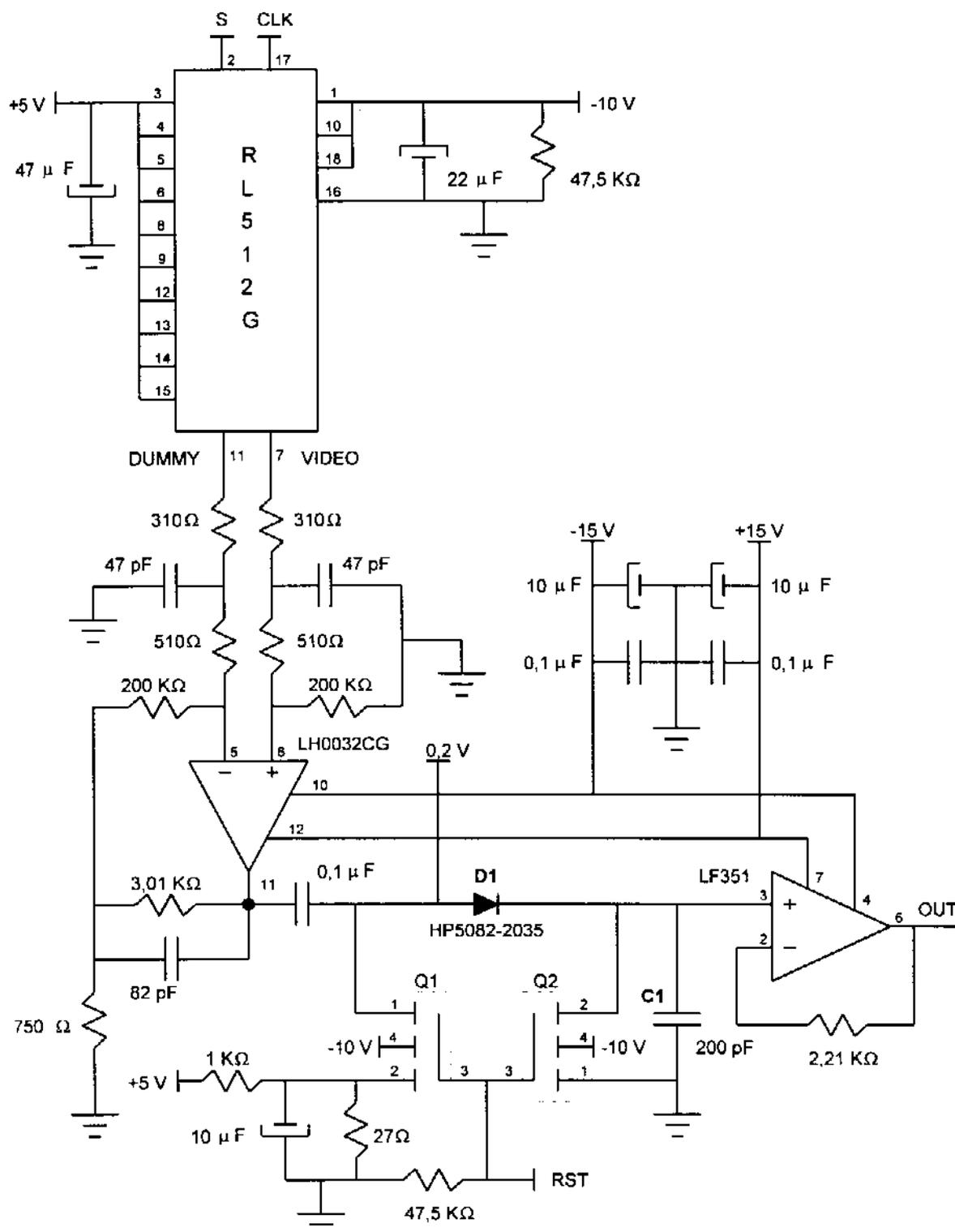


Figura III.2. Circuito eletrônico para extração de sinais do arranjo de diodos RL512G (S, start; CLK, clock; RST, reset e OUT, saída de vídeo).

O TSI 1020 possui uma porta de comunicação programável 8155 que foi utilizada para fazer a leitura do ADC e fornecer os pulsos lógicos necessários para a extração dos sinais do arranjo de diodos. O CI 8155 possui duas portas de comunicação de 8 bits (A e B) e uma de 6 bits (C), que podem ser programadas para entrada e saída de dados. A porta A foi usada para leitura do ADC (entrada), a B para fornecer os pulsos de controle do ADC e do arranjo de diodos (saída) e a C para verificação do final de conversão do ADC (entrada).

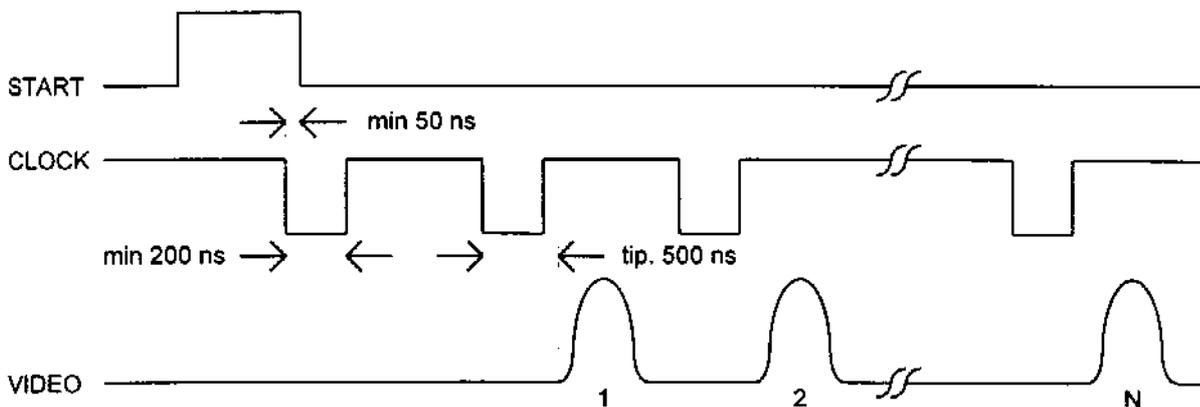
As memórias RAM (2 CIs 6116) foram utilizadas para armazenar o programa de controle do PDA (endereços 3000h a 31FFh) e os espectros adquiridos (endereços 3200h a 3FFFh - memória suficiente para armazenar até 7 espectros).

Um microcomputador padrão IBM-AT 386SX (2 Mbytes de RAM, 25 MHz), foi utilizado para controlar o sistema mínimo TSI 1020. A comunicação entre estes dois microcomputadores foi estabelecida através de uma interface serial RS232C, implementada com base no CI 8251A e com uma velocidade de transmissão de 9600 bits/s, cujos detalhes são apresentados no Apêndice VIII.1 (esta interface foi construída em substituição à original do sistema mínimo TSI 1020 que operava a 110 bits/s).

### **III.1.2.2. Extração de Sinais do Arranjo de Diodos RL512G**

A extração dos sinais do PDA, cujo controle foi efetuado pela porta de comunicação 8155, foi realizada de acordo com o diagrama de tempo do sensor RL512G mostrado na Figura III.3. O início da varredura ocorre quando

uma transição TTL negativa é aplicada ao pino 2 do sensor RL512G ("start"). Esta transição deve ocorrer "simultaneamente" a um pulso de "clock", aplicado ao pino 17 do sensor, que não é utilizado para leitura do arranjo. A partir deste ponto, o pulso de "clock" coloca o sinal de vídeo referente a descarga do diodo para ser convertido em um pulso, cuja diferença de potencial máxima é amostrada pelo "peak-holder" do circuito da Figura III.2, até que a conversão analógico-digital seja efetuada. Neste momento, um pulso negativo é aplicado, através da 8155, no pino 4 do conversor ADC ZN448 para que se inicie esta conversão. Através de um canal da porta C da 8155, o final de conversão do ADC pode ser verificado e, uma vez ocorrido, o valor é lido através da porta A da 8155, armazenado na memória RAM (CI 6116) do TSI 1020 e um pulso lógico (RST) é, então, aplicado às chaves CMOS Q1 e Q2 para descarregar o "peak-holder". Neste instante, um novo pulso de "clock" é aplicado ao pino 17 do RL512G e o procedimento se repete até que os 512 diodos sejam amostrados.



**Figura III.3.** Diagrama de tempo para extração de sinais do arranjo de diodos RL512G.

Embora a verificação do final de conversão do ADC seja o usual no procedimento descrito acima, esta etapa não foi realizada. O tempo

necessário para que esta verificação fosse feita seria muito maior que o gasto pelo ADC para realizar a conversão analógico-digital, o que limitaria o tempo de integração dos diodos a valores relativamente altos. Desta forma, como será descrito a seguir, o tempo entre o final de conversão do ADC e a leitura do dado para armazenamento na memória foi controlado por software, o que possibilitou um menor tempo de integração para os diodos.

### **III.1.3. Programa Computacional do Espectrofotômetro**

O programa de controle do espectrofotômetro foi dividido em três partes. A primeira, escrita em linguagem Assembler 8085, foi gravada na memória EPROM do sistema mínimo, após a área reservada ao seu programa monitor, isto é, a partir do endereço 0800h. Este pequeno conjunto de instruções, mostrado no Apêndice VIII.2, tem a função única de carregar outros programas na memória RAM do TSI 1020, enviados pelo computador externo.

A segunda parte, também escrita em linguagem Assembler 8085, consiste no programa de controle do espectrofotômetro. Foi desenvolvido no microcomputador externo, onde pode ser facilmente editado e arquivado, sendo enviado ao sistema mínimo no início de cada operação e gravado na sua memória RAM (endereços 3000h a 31FFh). Este programa faz todo o controle do arranjo de diodos, gerando os pulsos necessários para a extração de sinais, controlando o tempo de integração, adquirindo e armazenando os espectros requeridos. Na verdade, foram desenvolvidos dois programas, mostrados no Apêndice VIII.3, com procedimentos de varredura diferentes, que o usuário pode selecionar no início de cada operação.

A terceira parte do programa, escrita em QuickBasic 4.5 e mostrada no Apêndice VIII.4, implementa a comunicação entre os dois micros, permitindo que o microcomputador externo comande totalmente o sistema mínimo. Através de códigos de controle, enviados em caracteres ASCII, o microcomputador pode tanto requisitar que um espectro seja obtido, armazenado e posteriormente enviado como alterar os parâmetros de controle do espectrofotômetro tais como número de varreduras para se obter um espectro como média, número total de espectros, tempo de integração e intervalos de tempo entre espectros e para início de obtenção dos dados. Estes parâmetros podem ser determinados pelo usuário, cuja comunicação com o microcomputador é feita através de menus mostrados no monitor. Os espectros obtidos são sempre transferidos para e arquivados no microcomputador principal na forma de 512 intensidades expressas como números binários entre 0 e 255. Inicialmente, o programa sempre requisita que seja obtido um espectro de referência, possibilitando que os dados processados possam ser mostrados no monitor e enviados para uma impressora na forma de espectros de absorbância, transmitância ou intensidade. O programa permite também que seja feita a calibração do espectrofotômetro, como será descrito posteriormente.

### **III.1.3.1. Procedimentos de Varredura**

O processo de obtenção de sinais do arranjo de diodos consiste na leitura sequencial de todos os seus elementos, implementada através de pulsos de "clock" gerados pelo sistema mínimo a uma determinada frequência. Neste sentido, foram desenvolvidos dois procedimentos de varredura que originaram os dois programas escritos em Assembler, listados no Apêndice VIII.3.

O procedimento 1 foi desenvolvido mantendo-se o tempo de integração constante para todos os diodos, isto é, o tempo de varredura do arranjo igual ao tempo de integração de cada diodo. Esta é a maneira usual de extração de sinais do arranjo de diodos, sendo obtida através de pulsos de "clock" de frequência constante, como mostrado na Figura III.4. Para que este procedimento seja implementado é necessário que uma varredura inicial, chamada de falsa, seja feita para que todos os diodos sejam reinicializados ("reset"), eliminando eventuais saturações devido à corrente de escuro ou ao longo período de exposição à radiação luminosa. Esta varredura falsa é idêntica a todas as outras subsequentes para que o tempo de integração seja mantido constante. Desta forma, os primeiros 512 bytes armazenados na memória RAM do sistema mínimo (endereços 3200h a 33FFh) correspondem a esta varredura falsa, não sendo, portanto, enviados ao microcomputador externo. Conseqüentemente o espectrofotômetro pode armazenar, neste procedimento, até seis varreduras obtidas sequencialmente, que são utilizadas para se obter um espectro como média. O tempo de varredura é ajustado pelo valor inicial de um contador que é decrementado até zero antes da leitura de cada diodo (isto significa durante a conversão do ADC, como descrito anteriormente). O valor inicial mínimo do contador, determinado em função do tempo de conversão do ADC, é de 03h enquanto que o máximo é de FFh (255). Desta forma, o tempo de varredura do arranjo pode variar de 44 até 628 ms, em incrementos de aproximadamente 2,3 ms. Naturalmente, o tempo mínimo de varredura é determinado também pela velocidade de processamento da CPU 8085, que gera os sinais para o controle do arranjo, conforme mostrado na Figura III.3.

O procedimento 2 foi desenvolvido para compensar as diferenças de sensibilidade dos diodos em relação ao comprimento de onda e, neste caso, cada diodo tem um tempo de integração que, com exceção do último diodo, não

coincide com o tempo de varredura. Este procedimento é executado em três etapas: na primeira, onde nenhuma leitura é feita, todo o arranjo é varrido na maior frequência de "clock" permitida pela CPU 8085, de forma a reinicializar ("reset") todos os diodos. Na segunda etapa todos os diodos são integrados igualmente por um período de tempo pré-determinado (12,7 a 535,1 ms). Na terceira etapa, cujo diagrama de pulsos de "clock" é mostrado na Figura III.4, é feita a varredura do arranjo, onde os primeiros 256 diodos são lidos na mesma frequência e os últimos são lidos em uma frequência que aumenta regularmente, resultando em um tempo de integração crescente do primeiro ao último diodo. Esta frequência de leitura é determinada da mesma maneira que no procedimento 1, isto é, através de um contador que é decrementado até zero antes da leitura do ADC. Neste caso, apesar do contador assumir os mesmos valores (03h a FFh), os tempos de varredura variam de 294 a 1314 ms. O tempo de varredura total é dado pela soma dos tempos de integração inicial e varredura do arranjo. Neste procedimento o espectrofotômetro pode armazenar até 7 varreduras, que são enviadas ao microcomputador externo para a obtenção de um espectro como média. Embora qualquer contagem de tempo seja feita através de um contador que é decrementado até zero, o usuário alimenta o programa com o tempo em ms, que é convertido em um valor hexadecimal pelo microcomputador, antes de ser enviado ao sistema mínimo.

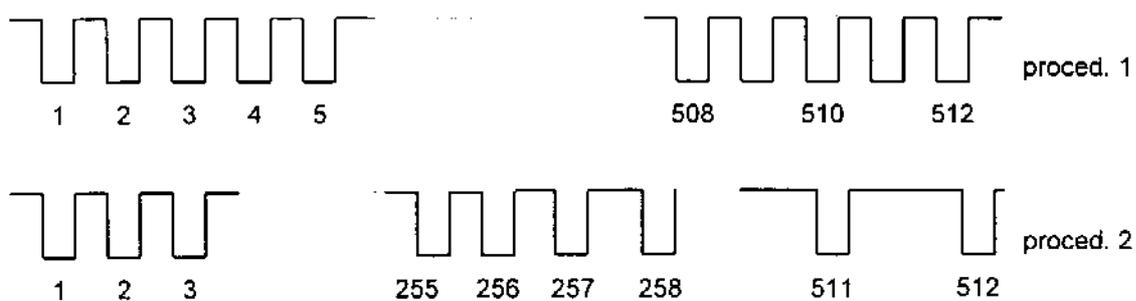


Figura III.4. Diagramas de pulsos de clock para varredura do arranjo de diodos.

### III.1.3.2. Processamento dos Dados

Os dados espectrais adquiridos pelo espectrofotômetro foram submetidos a alguns tipos de tratamentos, com a finalidade de se otimizar a relação sinal/ruído. Como descrito anteriormente, um espectro pode ser obtido como média de algumas varreduras (2 a 5) e, neste caso, o espectro resultante foi ainda submetido a outro tratamento. Dois tipos de filtros digitais foram avaliados neste trabalho, sendo empregadas as médias móveis dos sinais obtidos sem peso [87] e com peso [12]. Foram feitas médias de 3 ou 5 diodos, sendo que no caso de 3 diodos, foram utilizadas as seguintes equações:

$$A(n-1) = \frac{A(n-1) + A(n) + A(n+1)}{3}, \text{ para } n = 2 \text{ a } 511 \text{ (sem peso)}$$

$$A(n-1) = \frac{A(n-1) + 2A(n) + A(n+1)}{4}, \text{ para } n = 2 \text{ a } 511 \text{ (com peso)}$$

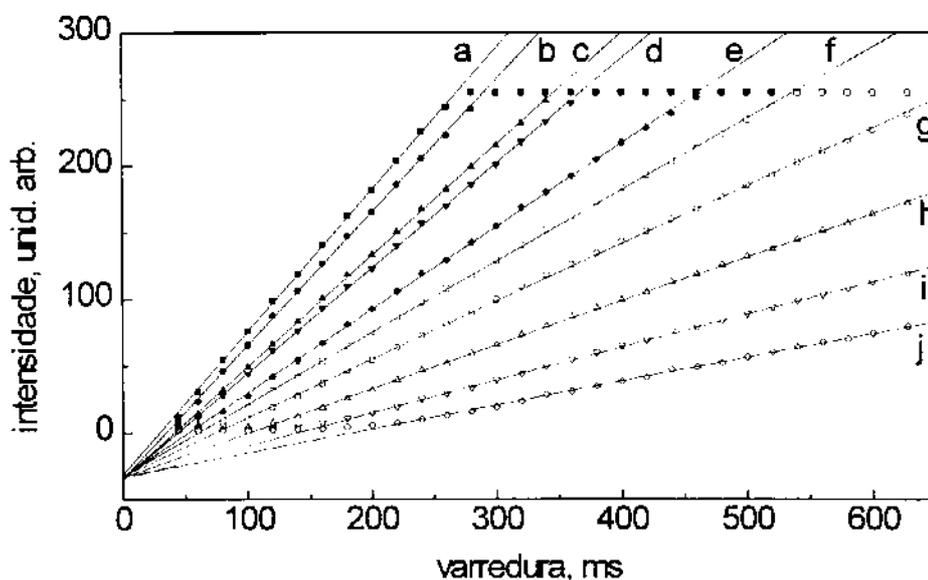
As médias de 5 diodos foram efetuadas de maneira análoga, sendo usada, no caso da média com peso, a ponderação de 1:2:3:2:1.

O cálculo da absorbância do diodo  $n$  foi realizado através da seguinte equação:

$$A(n) = \log \frac{[I_0(n) - D(n) + K]}{[I(n) - D(n) + K]},$$

onde  $I_0(n)$  é a intensidade do sinal de referência (por exemplo, a solução do branco),  $I(n)$  é a intensidade do sinal da solução da amostra,  $D(n)$  é o sinal devido à corrente de escuro e  $K$  é uma constante que corrige as intensidades dos sinais para o tempo de integração igual a zero. Esta constante foi determinada experimentalmente, efetuando-se, com o procedimento 1, várias

varreduras do arranjo de diodos exposto à luz dispersa, com diferentes tempos de integração (44 a 628 ms). O gráfico da intensidade do sinal obtido versus tempo de integração, para qualquer diodo, possui uma região linear, cuja extrapolação para tempo de integração igual a zero intercepta o eixo de intensidades em um único valor negativo, como mostrado na Figura III.5. O valor médio absoluto da interseção foi definido como a constante K.

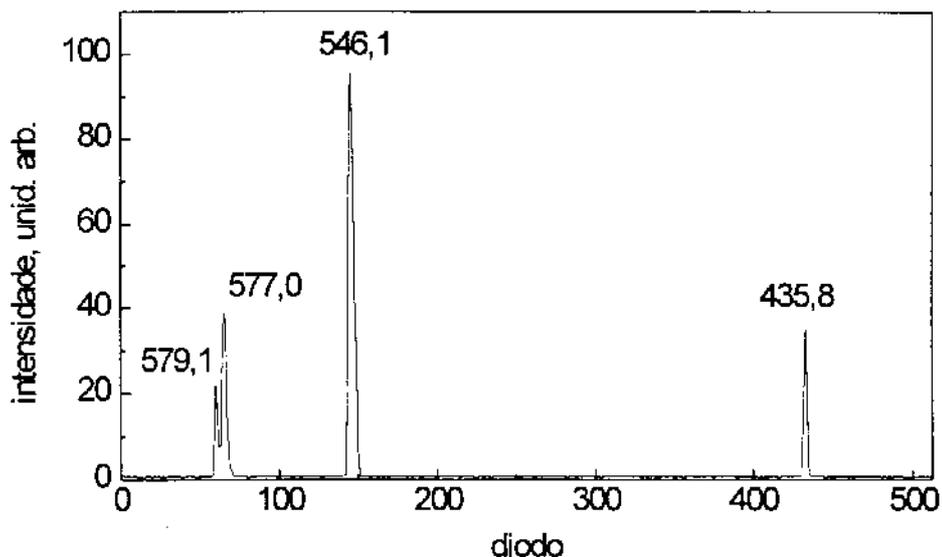


**Figura III.5.** Respostas dos diodos do arranjo em função do tempo de integração: a - j, diodos 1, 105, 153, 201, 257, 305, 353, 401, 457 e 505, respectivamente.

### III.1.3.3. Calibração do Espectrofotômetro

A calibração do espectrofotômetro foi realizada utilizando-se uma lâmpada de vapor de mercúrio, muito embora possa ser usado um padrão que possua bandas de absorção bastante agudas [88]. A lâmpada de mercúrio tem

a vantagem de possuir duas raias de emissão muito próximas na região amarela do espectro visível (577,0 e 579,1 nm), que auxiliam no ajuste de foco do espectrofotômetro. A Figura III.6 mostra um espectro desta lâmpada utilizado na calibração, cujo procedimento consiste em mover um cursor gráfico sobre o espectro e selecionar as raias de emissão conhecidas, relacionando-as com os respectivos diodos do arranjo. Após a seleção dos pares diodo/comprimento de onda (pelo menos dois são necessários para que a calibração seja efetuada), o programa computacional (Apêndice VIII.4) converte automaticamente o número do diodo (1 a 512) no comprimento de onda da radiação que nele está incidindo, fornecendo a faixa de comprimento de onda que o arranjo está cobrindo e o coeficiente de correlação da reta de calibração para que o usuário verifique a sua validade. Os parâmetros de calibração do espectrofotômetro são armazenados em um arquivo que é acessado ao se inicializar o sistema e que é atualizado sempre que uma nova calibração for efetuada.



**Figura III.6.** Espectro de uma lâmpada de mercúrio para calibração do espectrofotômetro (valores indicam os comprimentos de onda de emissão, em nm).

## **III.2. Soluções para Avaliação do Espectrofotômetro**

As soluções de permanganato de potássio foram preparadas na faixa de  $5,0 \times 10^{-5}$  a  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. As diluições necessárias da solução estoque, recém-filtrada com algodão de fibra de vidro, eram realizadas momentos antes das medidas serem efetuadas. Uma solução de cloreto de neodímio  $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada a partir do carbonato do metal e ácido clorídrico concentrado. Uma solução de dicromato de potássio  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada em ácido sulfúrico  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>.

## **III.3. Resultados e Discussão**

### **III.3.1. Interação Instrumento-Usuário**

O programa de controle do espectrofotômetro foi desenvolvido de forma que a interação com o usuário ocorresse através de menus mostrados no monitor de vídeo do computador principal (Apêndice VIII.4). Uma vez inicializado, o programa mostra uma mensagem, indicando ao usuário o procedimento que deve ser adotado para que a conexão entre o sistema mínimo e o computador externo seja implementada. Em seguida, o usuário deve escolher o programa com o qual deseja adquirir dados, isto é, escolher entre os procedimentos de varredura com tempo de integração constante ou tempo de integração variável. Isto feito, o programa é carregado no sistema mínimo e os principais parâmetros (e seus valores "default") são mostrados no vídeo do microcomputador, além dos parâmetros da última calibração (faixa do espectro

monitorada, dispersão e coeficiente de correlação). Um menu principal é, então, mostrado ao usuário, que possui as opções de calibração do instrumento, obtenção de espectros e apresentação de espectros. A calibração do espectrofotômetro pode ser feita segundo o descrito anteriormente e a opção de apresentar espectros e imprimí-los não contem detalhes que mereçam ser aqui discutidos.

O procedimento de obtenção de espectros possibilita ao usuário determinar uma série de parâmetros, divididos em dois grupos. O primeiro, constituído por parâmetros mostrados no início do programa, permite que o espectrofotômetro seja empregado em experimentos que necessitam de monitoramento por um determinado período de tempo (cinética, por exemplo). Desta forma, o usuário pode definir o número de espectros a serem obtidos (1 a 255) e os intervalos de tempo entre estes espectros (1,0 a 6500 s) e para início da aquisição de dados (0 a 6500 s). É conveniente salientar que o intervalo entre a obtenção de cada espectro não inclui o tempo para a transferência de dados do sistema mínimo para o microcomputador externo, como será discutido a seguir. O segundo grupo é constituído por parâmetros "internos" do espectrofotômetro, possibilitando ao usuário definir o número de varreduras para se obter um espectro como média (1 a 5) e o tempo de varredura. No caso do procedimento 1 de varredura apenas o tempo de integração (constante) deve ser escolhido (44 a 628 ms), enquanto que com o procedimento 2 devem ser determinados o intervalo de tempo, após o "reset" do arranjo, para início da varredura (12,7 a 535,1 ms) e o tempo de varredura (294 a 1314 ms). A aquisição de dados espectrais só pode ser iniciada após o usuário ter obtido a varredura dos sinais de referência. O espectro da prova em branco é mostrado no monitor do microcomputador na forma de intensidades dos sinais medidos, devendo ser ajustado através dos parâmetros internos para que seja utilizada

toda a faixa dinâmica do conversor A/D. Isto significa que os tempos de varredura devem ser escolhidos de modo que as intensidades dos sinais do espectro da prova em branco sejam bastante próximas de 255 (valor máximo de conversão do ADC).

Os dados referentes ao(s) espectro(s) obtido(s) são armazenados em arquivos, cujo nome principal é definido pelo usuário. O programa automaticamente salva os dados da prova em branco, das intensidades dos espectros e dos parâmetros (incluindo a calibração do espectrofotômetro) em arquivos com extensões *blk*, *pda* e *prm*, respectivamente. Este procedimento foi adotado pois os arquivos *blk* e *pda* foram criados em binário (e não em ASCII), para que fossem reduzidos os espaços por eles ocupados em disco rígido.

### III.3.2. Avaliação do Espectrofotômetro

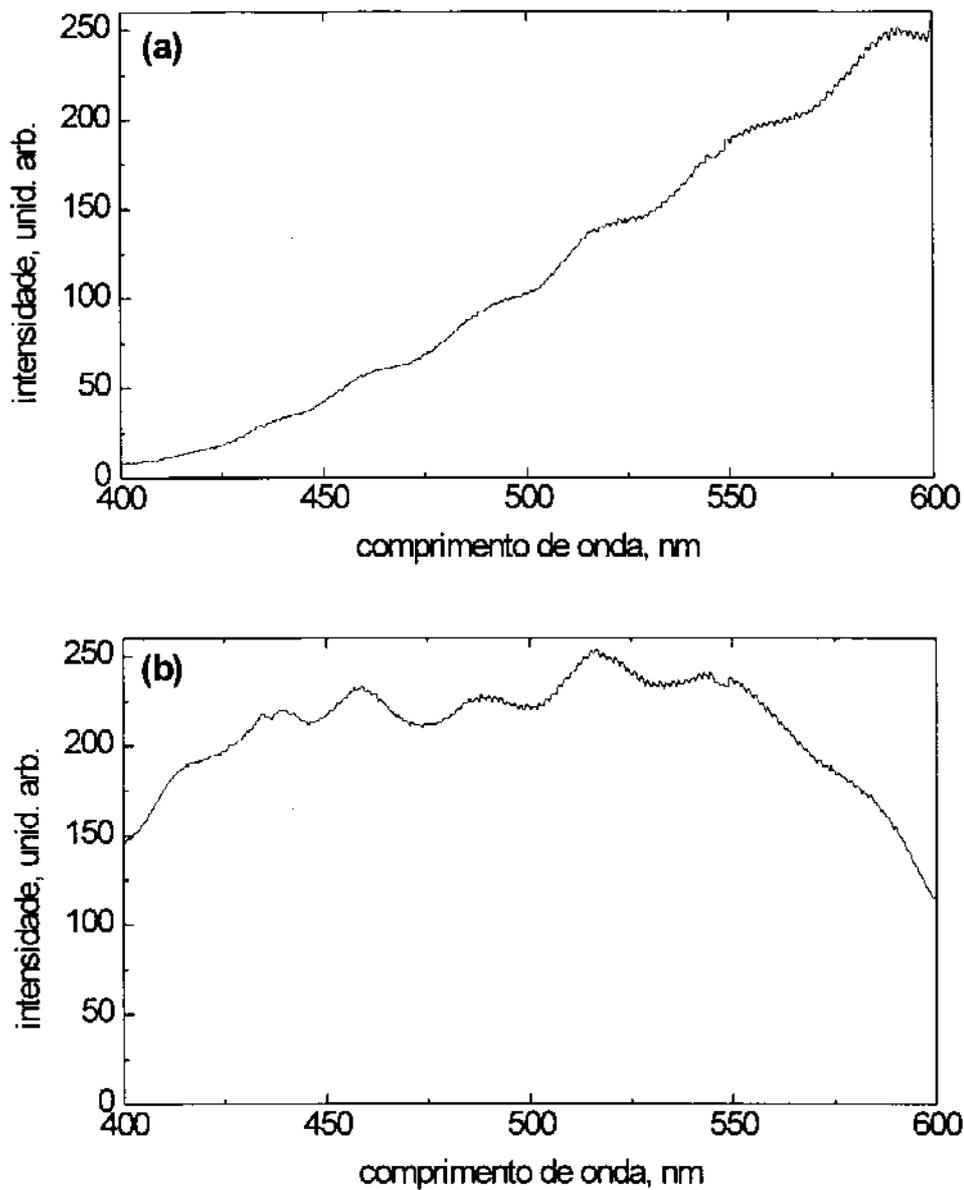
O arranjo óptico empregado na construção do espectrofotômetro resultou em uma dispersão linear de  $15,36 \text{ nm mm}^{-1}$  ( $0,384 \text{ nm diodo}^{-1}$ ), possibilitando o monitoramento de uma faixa espectral de cerca de 200 nm, com uma resolução em torno de 1 nm [16,24].

O instrumento foi desenvolvido para ser utilizado como detector em um analisador de fluxo monossegmentado. Portanto, as medidas para a avaliação do desempenho do espectrofotômetro foram efetuadas empregando-se uma cela de fluxo com caminho óptico de 10 mm e diâmetro interno de 2 mm. Esta cela foi colocada entre dois cabos de fibras ópticas de vidro de 500 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro; um cabo foi usado para guiar a luz da fonte halógena até a cela e o outro para levar o feixe luminoso da cela até a fenda de entrada do espectrofotômetro. Em algumas ocasiões, como no caso da

calibração do instrumento com a lâmpada de vapor de mercúrio, o feixe foi direcionado por um único cabo de fibra óptica da fonte até a fenda de entrada do espectrofotômetro.

O sistema mínimo TSI 1020 pode armazenar, como citado, até 7 varreduras em sua memória RAM expandida. Entretanto, se o procedimento 1 de varredura for empregado, apenas 6 varreduras podem ser efetivamente usadas, uma vez que a primeira é falsa ("reset" dos diodos). Quando estas varreduras são transferidas para o microcomputador externo através da porta serial RS232C, a média destas varreduras é armazenada em um arquivo definido pelo usuário. Os tempos necessários para a transferência de uma varredura (512 bytes) e a obtenção da média de 6 varreduras, armazenando-a em um arquivo, estão em torno de 600 e 850 ms, respectivamente. Portanto, os espectros podem ser obtidos em intervalos de até 1,5 s, aproximadamente (convém citar que o tempo gasto na operação para a obtenção da média aritmética é muito menor que o gasto para salvar os 512 bytes em um arquivo, isto é, são necessários cerca de 850 ms para a realização desta última tarefa). Entretanto, como um espectro obtido na forma de média possui uma melhor relação sinal/ruído, os espectros apresentados neste trabalho, exceto onde mencionado, são médias de 5 varreduras, o que eleva o tempo de transferência de dados para 3 s.

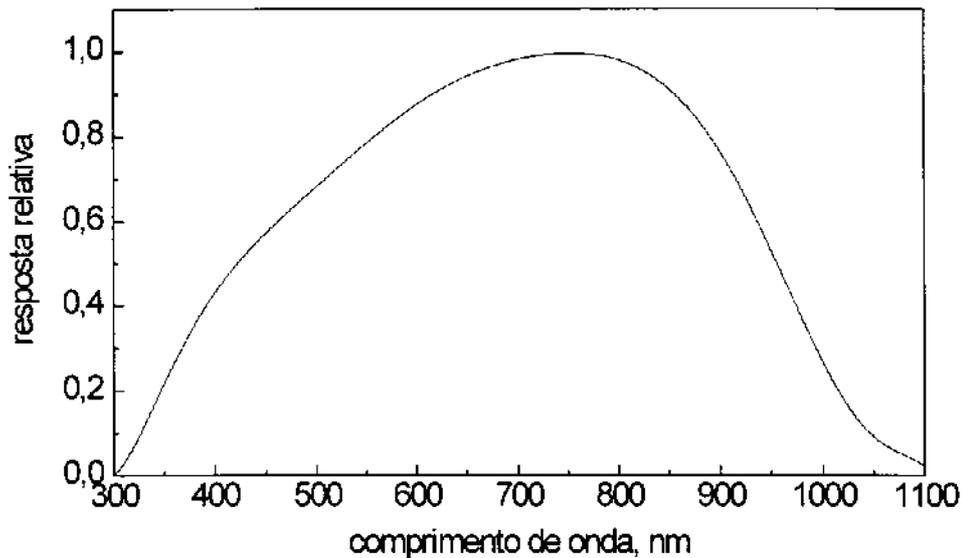
A Figura III.7 mostra os espectros de emissão de uma fonte de luz halógena obtidos com os procedimentos 1 (Fig. III.7a) e 2 (Fig. III.7b), com tempos de varredura de 63 e 450 ms, respectivamente (no procedimento 2 o tempo total de 450 ms é devido à integração inicial,  $t_i = 20$  ms, e à varredura do arranjo,  $t_v = 430$  ms). Ao se observar a Figura III.7a, cujo espectro foi obtido com tempo de integração constante, pode ser notado que as intensidades dos sinais registrados pelos diodos não são idênticas, mas dependente do



**Figura III.7.** Intensidades registradas pelo arranjo de fotodiodos utilizando: **(a)** o procedimento 1 (tempo de varredura = 63 ms) e **(b)** o procedimento 2 (tempo de varredura = 450 ms,  $t_i = 20$  e  $t_v = 430$  ms).

comprimento de onda. Este perfil é resultado não só da sensibilidade do diodo, que aumenta com o aumento do comprimento de onda na região visível do espectro, como mostrado na Figura III.8, mas também da fonte utilizada que emite uma baixa intensidade luminosa na região azul do espectro. Além disto,

os cabos de fibras ópticas empregados certamente atenuam a radiação emitida a comprimentos de onda menores que 500 nm.



**Figura III.8.** Resposta espectral relativa do arranjo de diodos em função do comprimento de onda [86].

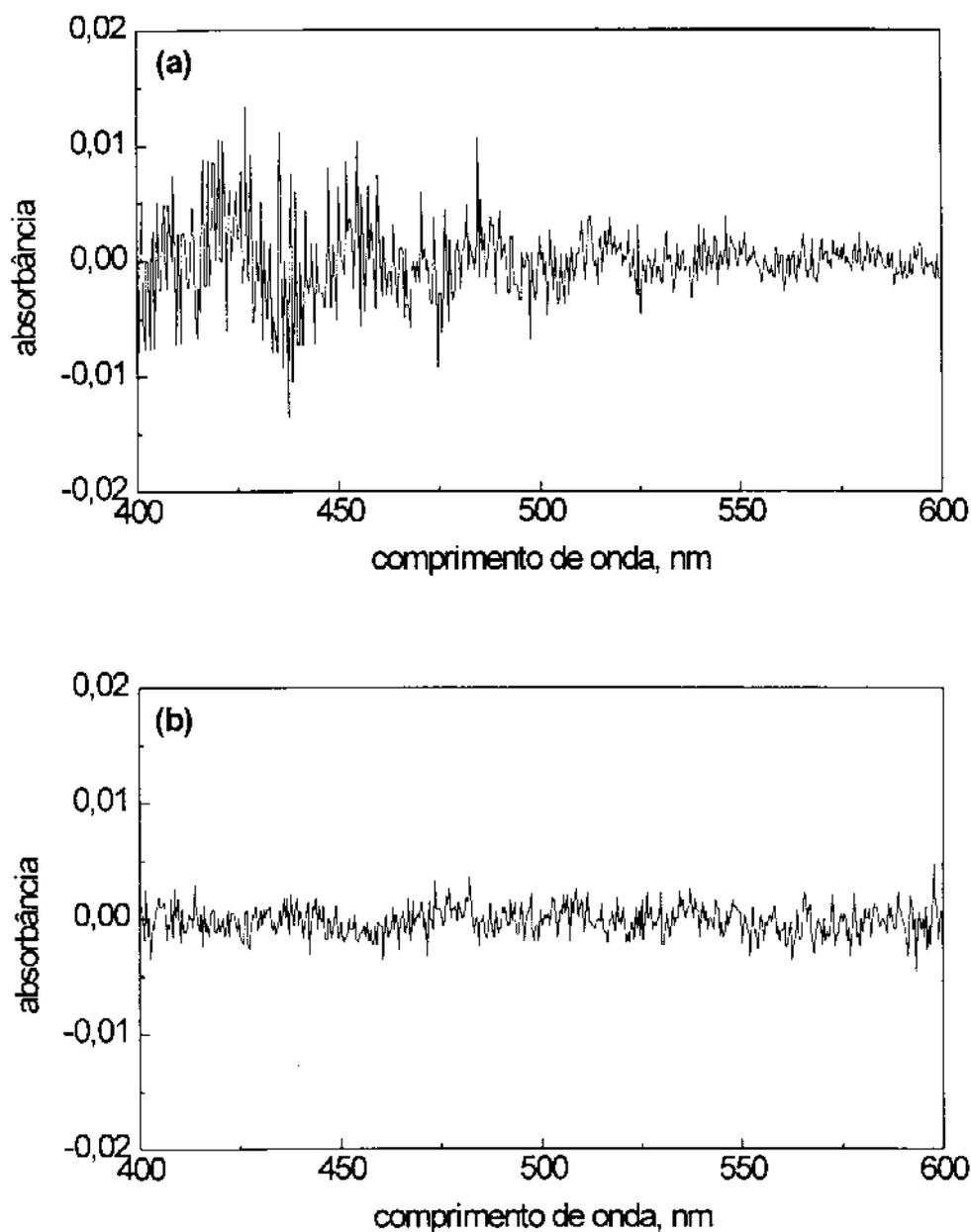
Estes sinais pouco intensos na região de 400 a 500 nm trazem alguns problemas tais como baixa relação sinal/ruído e distorção do espectro de absorção. Para corrigir estes problemas provenientes da sensibilidade do arranjo de diodos nesta região, foi desenvolvido o procedimento 2 de varredura, no qual o tempo de integração é variável, aumentando do primeiro para o último diodo. Neste caso, necessariamente, os primeiros diodos do arranjo devem monitorar a região vermelha, enquanto que os últimos a região azul do espectro visível (deve ser notado que os espectros são mostrados na ordem inversa da aquisição dos dados). Desta forma, foi obtido o espectro mostrado na Figura III.7b, que é mais apropriado para cálculos de absorbância ou transmitância,

uma vez que as faixas dinâmicas do sensor e do conversor A/D foram otimizadas para toda a faixa espectral monitorada.

Os procedimentos de integração com tempo variável encontrados na literatura empregam basicamente o modelo desenvolvido por Talmi e Simpson [24]. Neste modelo, uma série de varreduras com diferentes tempos de integração são adquiridas e o espectro final é obtido a partir da junção das partes destas varreduras com máxima intensidade e sem saturação. Apesar de relativamente demorado, este procedimento tem sido empregado em espectroscopia de emissão atômica, onde Wirz e colaboradores [89] obtiveram um espectro completo (aquisição de dados e cálculos) em aproximadamente 60 s e Lepla e Horlick [90] em intervalos entre 15 e 30 s. Por outro lado, o procedimento descrito nesta tese permite a otimização da faixa dinâmica em apenas uma varredura, em intervalos de tempo de 306,7 a 1849,1 ms. Obviamente, o procedimento de integração variável foi desenvolvido de acordo com a resposta apresentada pelo detector na região monitorada (Figura III.7a), não sendo, portanto, de aplicação irrestrita. Por exemplo, se o arranjo de diodos for empregado para monitorar a região de 700 a 900 nm, outro procedimento de varredura deverá ser desenvolvido pois a resposta do detector é praticamente inversa à apresentada na região de 400 a 600 nm, como está mostrado na Figura III.8.

A Figura III.9 mostra o ruído da linha base quando são empregados os procedimentos de varredura 1 (Fig. III.9a) e 2 (Fig. III.9b), cujos espectros foram obtidos nas mesmas condições que os mostrados na Figura III.7. Como pode ser notado, a Figura III.9a mostra um espectro com um ruído bastante alto na região de 400 a 500 nm, que é devido à baixa intensidade do sinal obtido nesta região com o procedimento 1. Entretanto, através da variação do tempo de integração dos diodos, quando o procedimento 2 é empregado, a

relação sinal/ruído é melhorada e o ruído mantido praticamente constante e minimizado ao longo de toda a região monitorada do espectro, como ilustrado na Figura III.9b.



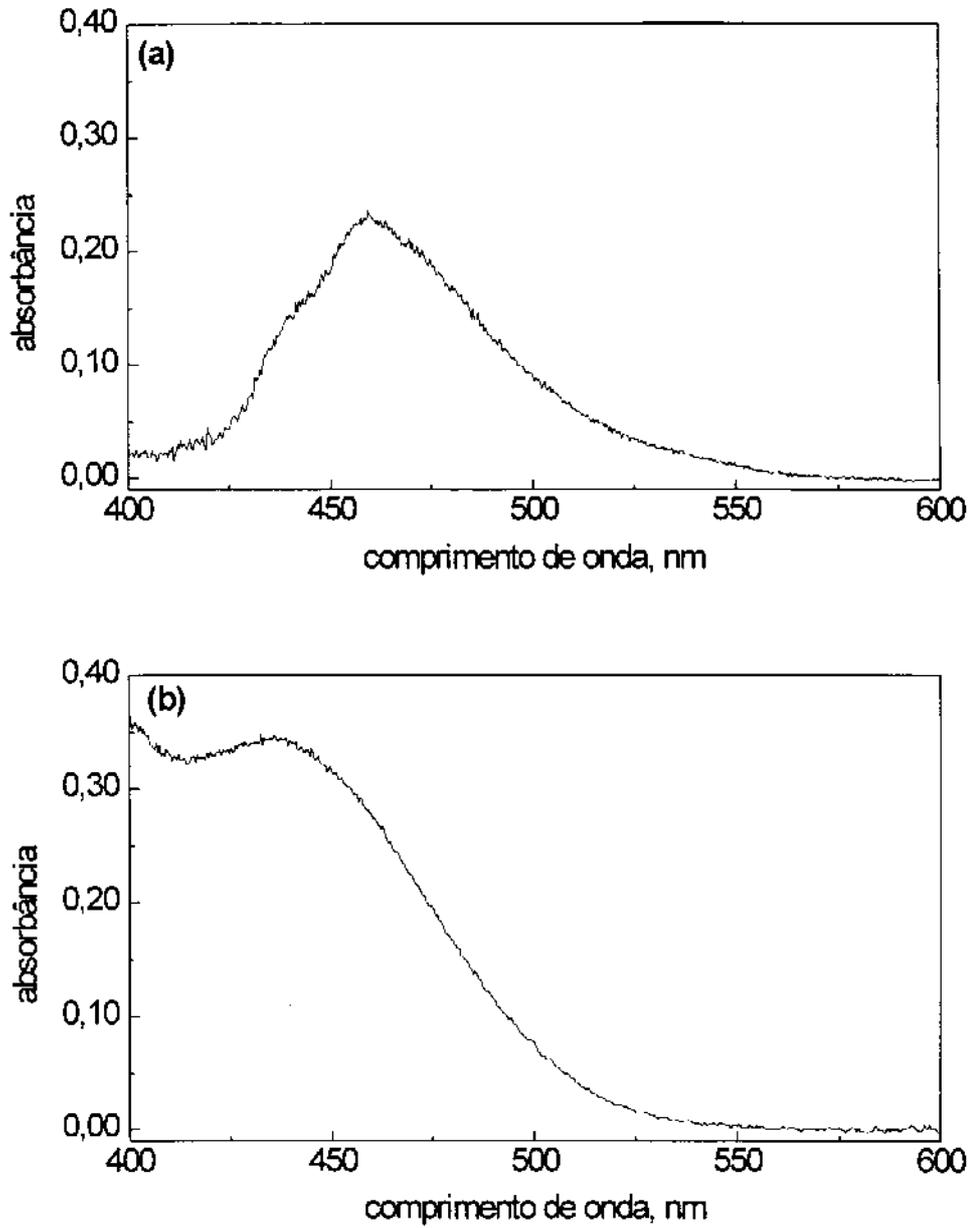
**Figura III.9.** Ruído da linha base utilizando: (a) o procedimento 1 (tempo de varredura = 63 ms) e (b) o procedimento 2 (tempo de varredura = 450 ms,  $t_i = 20$  ms e  $t_v = 430$  ms).

Além de melhorar a faixa dinâmica e, portanto, a relação sinal/ruído, o tempo de integração variável elimina eventuais distorções nos espectros. A Figura III.10 apresenta os espectros de uma solução de dicromato de potássio  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, em ácido sulfúrico  $1,0 \times 10^{-1}$  mol L<sup>-1</sup>, obtidos com os procedimentos de varredura 1 (Fig. III.10a) e 2 (Fig. III.10b). O espectro mostrado na Figura III.10b é o que concorda com a literatura e o da Figura III.10a, distorcido, resulta dos sinais extremamente baixos obtidos na região de 400 a 500 nm, quando o procedimento 1 é empregado.

A relação sinal/ruído também pode ser melhorada submetendo os dados espectrais à um tratamento com filtros digitais. A Tabela III.1 relaciona os desvios padrão da linha base dos espectros mostrados na Figura III.7, obtidos com os dados originais e após a aplicação de filtros digitais com médias móveis de 3 e 5 diodos. Como pode ser verificado, a aplicação de filtros digitais melhora a relação sinal/ruído dos dados obtidos, não existindo, com relação a este parâmetro, diferenças significativas entre as médias sem e com peso.

**Tabela III.1.** Desvios padrão de medidas de absorvância da linha base com a aplicação de filtros digitais de médias móveis.

proced. varredura	dados originais	média de 3 diodos		média de 5 diodos	
		sem peso	com peso	sem peso	com peso
1	0,0040	0,0024	0,0026	0,0021	0,0022
2	0,0018	0,0013	0,0014	0,0011	0,0012

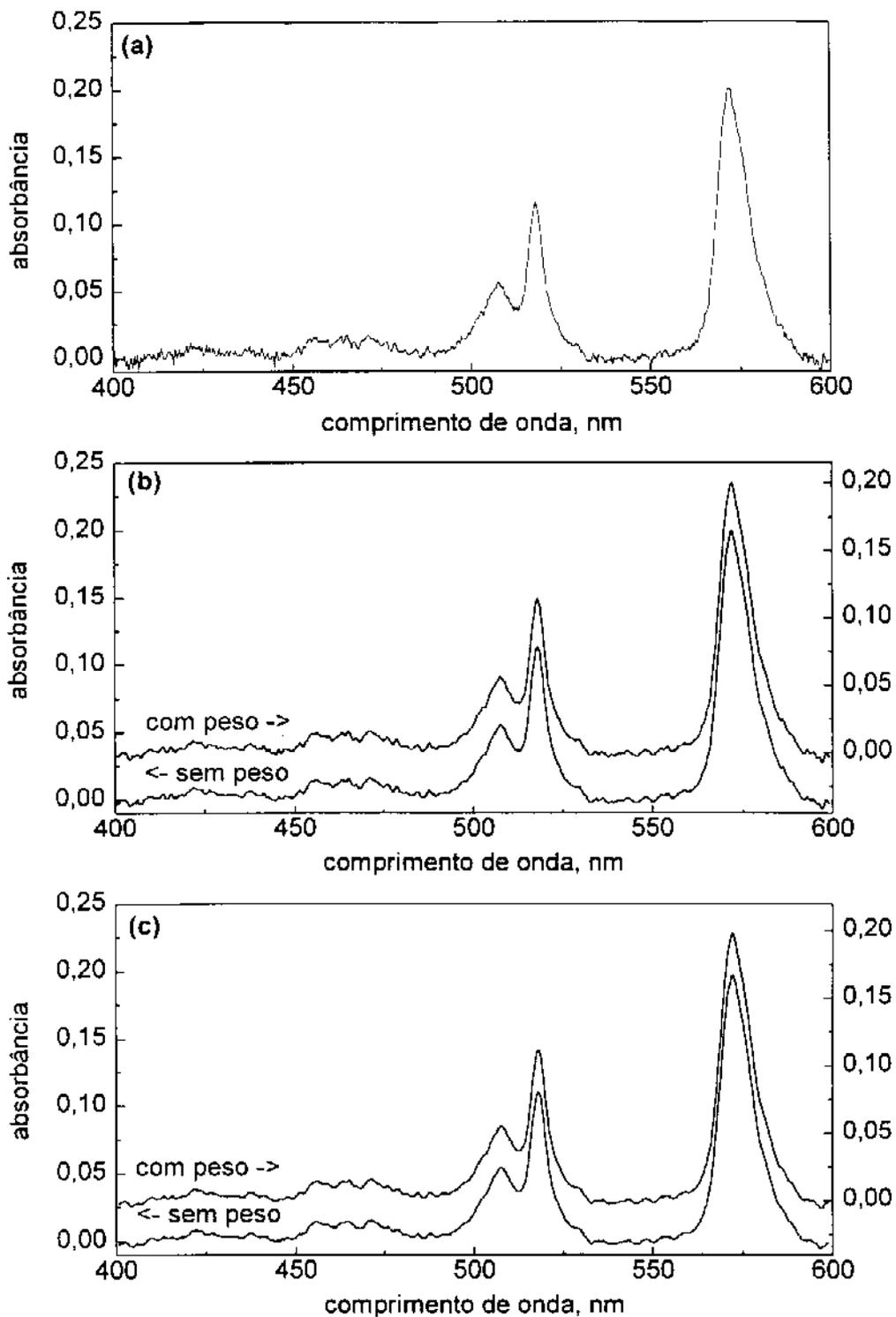


**Figura III.10.** Espectros de absorção de uma solução de dicromato de potássio: **(a)** com distorção causada pelo procedimento 1 e **(b)** espectro correto obtido com procedimento 2 .

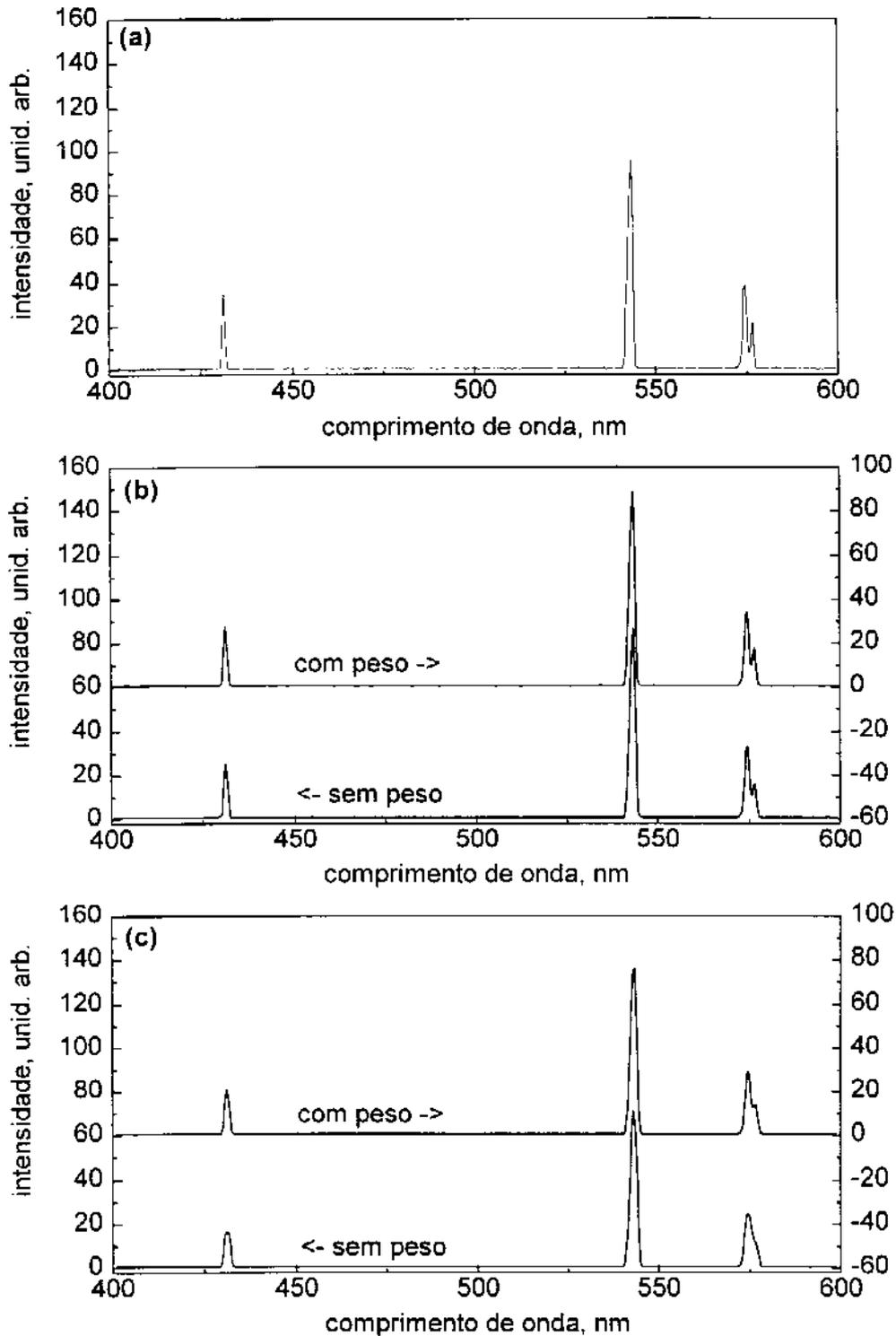
A Figura III.11 mostra os espectros de uma solução de cloreto de neodímio  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  obtidos originalmente com o procedimento 2 de varredura (Fig. III.11a) e após a aplicação de filtros digitais com médias móveis de 3 (Fig. III.11b) e 5 (Fig. III.11c) diodos. Pela observação destes espectros pode ser notado que o ruído é diminuído quando são aplicados filtros digitais, sendo que o melhor resultado é obtido com a média de 5 diodos. Mais uma vez, não pode ser notada uma diferença significativa no aumento da relação sinal/ruído entre os resultados obtidos com médias sem e com peso.

Muito embora a relação sinal/ruído seja melhorada com a aplicação de filtros digitais, a resolução do espectro obtido é diminuída. Esta diminuição não está claramente evidenciada nos espectros mostrados na Figura III.11, pois estes espectros de absorção apresentam bandas bastante largas. Entretanto, a diminuição na resolução pode ser facilmente verificada quando os espectros de emissão de uma lâmpada de vapor de mercúrio são submetidos ao tratamento com filtros digitais, como é mostrado na Figura III.12. A Figura III.12a mostra o espectro de emissão empregado na calibração do espectrofotômetro (Fig. III.6) e as Figuras III.12b e III.12c mostram este espectro após o tratamento com médias móveis de 3 e 5 diodos, respectivamente. Como pode ser notado, o tratamento com média de diodos sem peso compromete a resolução de forma mais significativa que a média com peso e, em ambos os casos, as intensidades dos sinais obtidos diminuem com o tratamento.

Portanto, conforme exposto acima, existe uma interdependência entre resolução e relação sinal/ruído, que deve ser ponderada pelo usuário em função do resultado final desejado. No caso de espectros de absorção, cujas bandas são largas, a perda de informação é relativamente pequena com a aplicação de filtros digitais, ao contrário do que ocorre no caso de espectros de emissão.



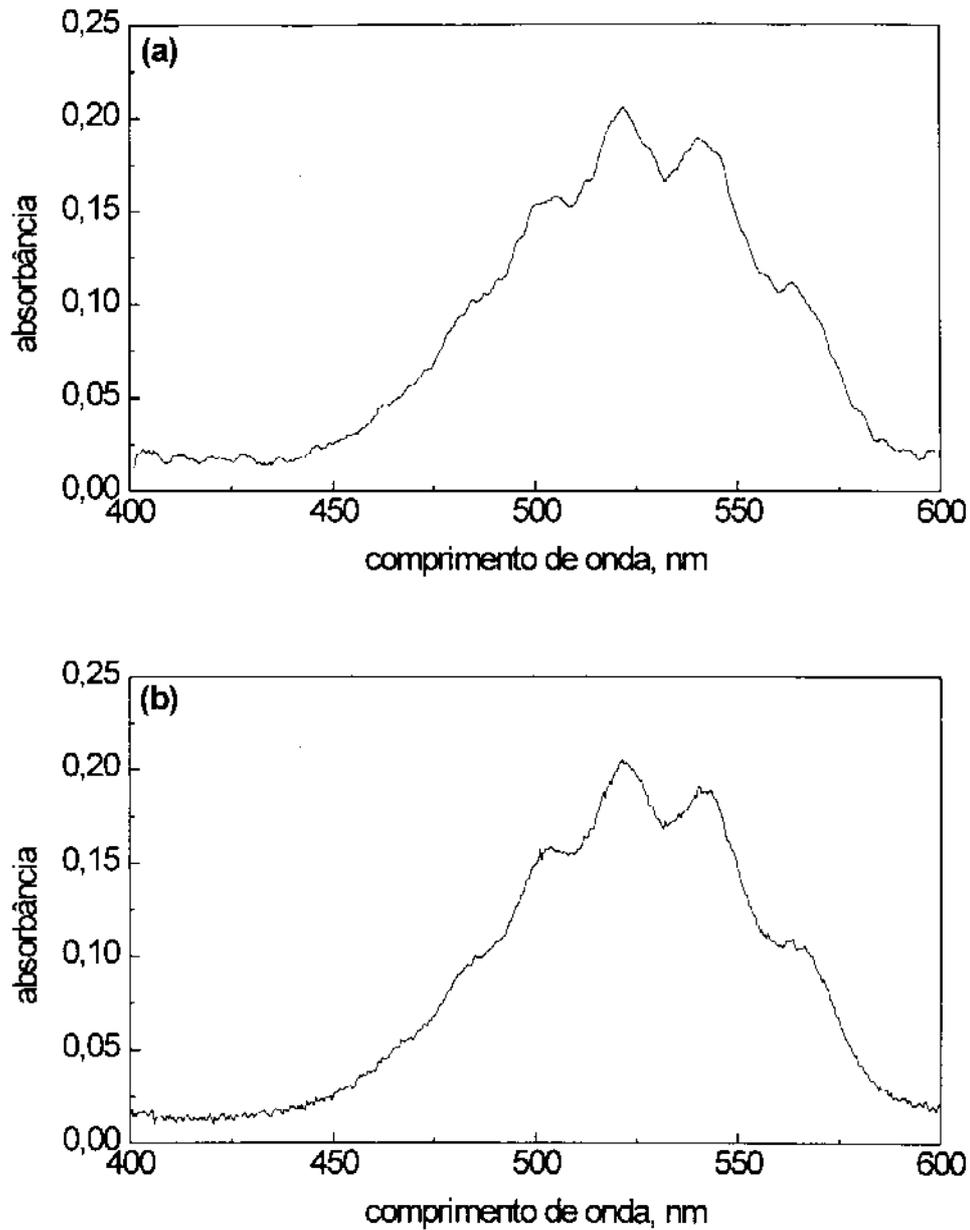
**Figura III.11.** Efeito da aplicação de filtros digitais sobre o espectro de absorção de uma solução de cloreto de neodímio: (a) dados originais, (b) média de 3 diodos e (c) média de 5 diodos.



**Figura III.12.** Efeito da aplicação de filtros digitais sobre a resolução. Espectro de emissão de uma lâmpada de mercúrio: (a) dados originais, (b) média de 3 diodos e (c) média de 5 diodos.

Em vista dos resultados obtidos com a utilização de filtros digitais, foram analisados os efeitos de dois procedimentos de aquisição e tratamento de dados. No primeiro foi obtido um espectro a partir de uma única varredura e, posteriormente, aplicado um filtro digital de média móvel sem peso de 5 díodos. No segundo, 5 varreduras consecutivas foram efetuadas e armazenadas na memória RAM do TSI 1020 e o espectro foi obtido a partir da média dessas 5 varreduras. A Figura III.13 mostra os efeitos desses procedimentos nos espectros de absorção de uma solução de permanganato de potássio  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, obtidos nas mesmas condições (integração variável e tempo total de varredura de 450 ms). Com o primeiro procedimento, um espectro é obtido em aproximadamente 2 s (aquisição, transferência e armazenamento dos dados na memória do computador principal), enquanto que com o segundo esta mesma tarefa é feita em cerca de 6 s. Não está sendo computado aqui o tempo necessário para o tratamento dos dados com filtros digitais, que pode ser efetuado posteriormente à aquisição de todos os espectros. Portanto, se em uma determinada análise o fator limitante for a velocidade de aquisição de dados e não a resolução dos espectros obtidos, o primeiro procedimento pode ser empregado com vantagens.

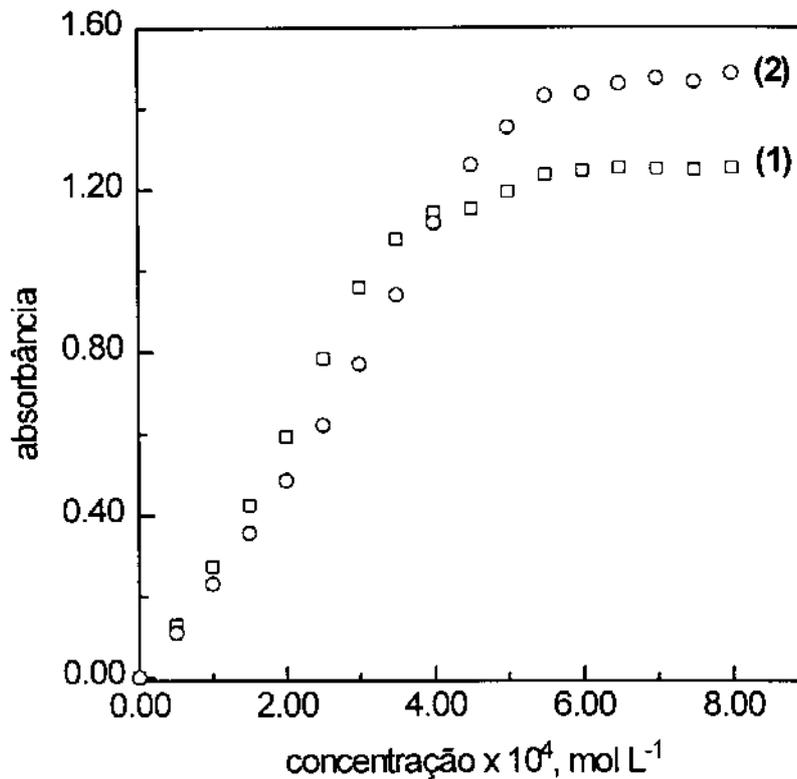
A precisão e o "drift" do instrumento foram determinados com a mesma solução de permanganato de potássio  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> utilizada acima, sendo efetuadas medidas em 525 nm (média sem peso de 5 díodos), a partir dos espectros obtidos como média de 5 varreduras. Inicialmente foram obtidos 18 espectros em intervalos de 1 s (intervalo entre o último dado transferido e o início da varredura subsequente), cuja absorbância média foi de  $0,2029 \pm 0,0013$ . Quando 18 espectros foram obtidos em intervalos de 10 min, a média resultante foi de  $0,2002 \pm 0,0021$ , indicando que o espectrofotômetro não possui "drift" significativo, no intervalo de 3 horas no qual foi avaliado.



**Figura III.13.** Espectros de absorção de uma solução de permanganato de potássio: **(a)** adquirido em uma varredura e submetido a média móvel sem peso de 5 diodos e **(b)** obtido como média de 5 varreduras.

A linearidade do espectrofotômetro foi avaliada com soluções de permanganato de potássio, na faixa de  $5,0 \times 10^{-5}$  a  $8,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. A Figura III.14 mostra as curvas de calibração obtidas com os procedimentos 1 e 2 de

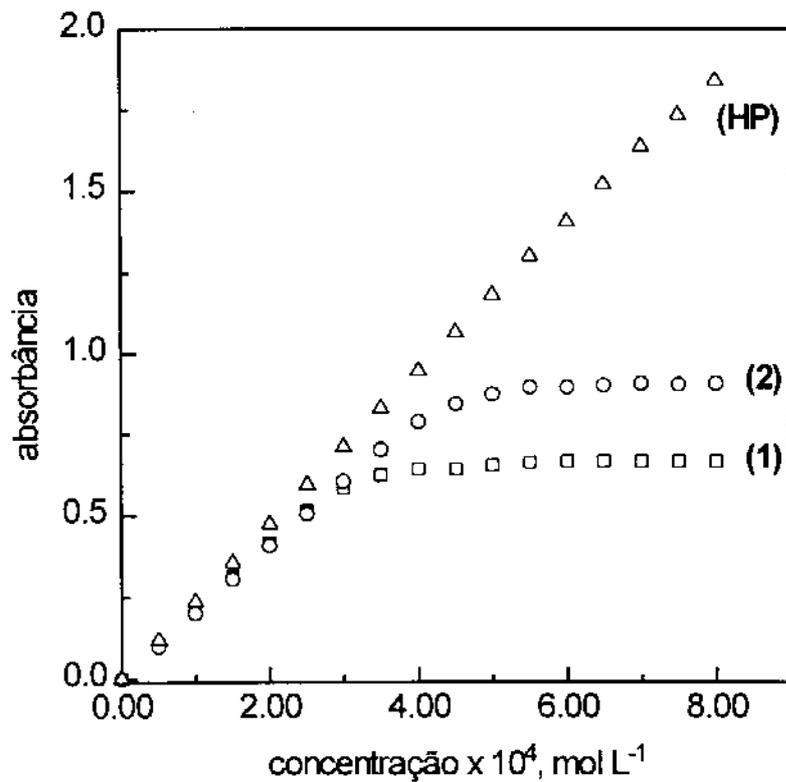
varreduras, sem a inclusão da constante K nos cálculos de absorvância. As curvas não são lineares, apresentando um formato levemente sigmoidal, que é devido, provavelmente, aos problemas associados com a eletrônica empregada na extração dos sinais dos diodos, como discutido anteriormente.



**Figura III.14.** Curvas de calibração para padrões de permanganato de potássio obtidas com os procedimentos de varredura 1 e 2, sem a inclusão da constante K nos cálculos de absorvância.

A Figura III.15 mostra, além destas mesmas curvas de calibração, onde as absorvâncias foram calculadas com a inclusão da constante K, conforme discutido no item III.1.3.2, a curva obtida com o espectrofotômetro multicanal HP 8452A. Na calibração efetuada, foi obtido um valor de 25,39 para

esta constante K. Desta forma, supondo a corrente de escuro desprezível, o valor máximo de absorbância fica limitado a cerca de 1,00, pois a intensidade obtida quando toda a luz é absorvida é igual ao valor da constante ( $A = \log [(255+25)/25]$ , onde 255 é o maior valor de intensidade obtido com um conversor A/D de 8 bits).



**Figura III.15.** Curvas de calibração para padrões de permanganato de potássio obtidas com os procedimentos 1 e 2, incluindo a constante K nos cálculos de absorbância, e com o espectrofotômetro HP8452A.

Quando foi utilizado o procedimento de varredura 1, foi obtida uma calibração linear até  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $r = 0,99988$ ), enquanto que com o procedimento 2 a faixa foi estendida até  $3,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $r = 0,99994$ ) e com o espectrofotômetro HP 8452A a resposta foi linear até  $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$

( $r = 0,99990$ ). A comparação dos resultados obtidos com os procedimentos 1 e 2 de varredura mostra claramente que a utilização do tempo de integração variável melhora as características do instrumento, pois este otimiza tanto a faixa dinâmica do conversor A/D como a do arranjo de diodos. Entretanto, o desempenho do espectrofotômetro construído é inferior ao do comercial, uma vez que foi empregado um detector de baixo custo, recomendado para uso em aparelhos de fac-símile e não como detector em espectroscopia.

### **III.4. Conclusões e Perspectivas**

O espectrofotômetro multicanal desenvolvido possui um desempenho coerente com o dispositivo de detecção empregado. Embora sua faixa dinâmica linear seja limitada tanto pela qualidade do arranjo de diodos como pelo conversor A/D empregado, sendo relativamente estreita, o instrumento tal como foi implementado é relativamente versátil, podendo ser aplicado em várias áreas, tais como análise por injeção em fluxo, análise em fluxo monossegmentado, cromatografia líquida de alta eficiência, determinações cinéticas e simultâneas, entre outras. Para que o espectrofotômetro possa ser empregado na realização de uma tarefa específica é necessário apenas que o programa de controle, aquisição e tratamento de dados seja complementado com as instruções particulares de cada aplicação, podendo ser ampliado ou até mesmo simplificado. Uma das principais vantagens do espectrofotômetro está no procedimento de varredura com integração variável, que permite a otimização das faixas dinâmicas do conversor A/D e do detector em apenas uma única varredura. Embora esta otimização tenha sido conseguida em um intervalo de tempo (450 ms) que pode ser relativamente grande para

determinadas aplicações, o uso de um sensor próprio para espectroscopia e/ou uma fonte de luz de maior potência certamente contribuirá para a diminuição do tempo de varredura do arranjo de diodos.

A construção deste espectrofotômetro de arranjo de diodos naturalmente gerou conhecimentos básicos em espectroscopia multicanal e tem possibilitado o desenvolvimento de novos projetos relacionados a esta área. Como exemplo mais significativo pode ser citado a modernização de um Espectrógrafo de Rede Plana [91], onde o sistema de detecção fotográfico foi substituído por um arranjo de fotodiodos (de qualidade espectroscópica).

Em um contexto mais amplo, a espectrofotometria multicanal está se tornando quase que uma necessidade dentro da Química Analítica, em função da quantidade (e qualidade) de informações que pode fornecer a respeito de um sistema, ampliando-as para um espaço tridimensional. Neste aspecto, os arranjos lineares de fotodiodos são apenas o início de um novo conceito dentro da espectrofotometria. Se hoje os instrumentos multicanais, baseados em arranjos lineares de fotodiodos, são bastante difundidos e comercializados a preços relativamente acessíveis é porque a tecnologia nesta área está sedimentada o suficiente para atender as necessidades do mercado. Entretanto, paralelamente, outros tipos de detectores têm sido empregados com relativa frequência, trazendo uma dimensão ainda maior para a espectrofotometria multicanal. Estes detectores são os chamados dispositivos de transferência de carga (CTD - Charge Transfer Device), que incluem os dispositivos acoplados por carga (CCD - Charge Coupled Device) e os dispositivos de injeção de carga (CID - Charge Injection Device). Embora não caiba aqui uma descrição detalhada de cada um destes detectores, vale a pena salientar que estes dispositivos podem apresentar, por exemplo, uma eficiência quântica da ordem de 80 %, um ruído de leitura menor que 5 elétrons e uma

corrente de escuro de 1 elétron/hora, podendo ser encontrados em formatos bidimensionais de 4096 por 4096 elementos [92]. Isto significa que o desempenho de um CTD (CCD ou CID) supera tanto o desempenho de um arranjo de diodos como o de uma fotomultiplicadora. Os detectores CTDs têm sido utilizados com certa frequência nas mais variadas áreas da espectroscopia, incluindo as espectrofotometrias atômica e molecular. O estado da arte que hoje se encontra o desenvolvimento e a aplicação destes detectores indica que, provavelmente, os dispositivos de transferência de carga ocuparão um espaço relativamente importante na área da Química Analítica em um futuro não muito distante. Portanto, talvez seja este um dos próximos desafios que deverá ser enfrentado após a realização deste trabalho.

## **IV. ANÁLISE EM FLUXO MONOSSEGMENTADO**

---

### **IV.1. Análises em Fluxo**

Os sistemas de análises em fluxo têm sido largamente utilizados em Química Analítica, pois permitem que sejam obtidos resultados em um curto espaço de tempo, com graus de precisão e exatidão bastante altos. A disseminação destes sistemas ocorreu como consequência natural da crescente demanda de análises, principalmente nas áreas da química ambiental e clínica.

O primeiro sistema de análise em fluxo que causou grande impacto, principalmente na área de análises clínicas, foi desenvolvido por Skeggs, em 1957 [93]. Neste sistema, a amostra é aspirada, segmentada por ar e misturada com reagentes enquanto é continuamente bombeada através de tubos até atingir o detector. À época, o conceito de análise era baseado no princípio de que as medidas deveriam ser efetuadas tanto em equilíbrio físico (homogeneização entre amostra e reagentes) como em equilíbrio químico (com exceção aos métodos cinéticos). Desta forma, a segmentação da amostra por bolhas de ar no analisador de fluxo contínuo possibilita que estes estados de equilíbrio sejam atingidos, evitando uma grande dispersão e, conseqüentemente, uma intercontaminação das amostras. Possibilita, ainda, que a amostra resida no analisador por longos períodos de tempo, podendo, portanto, ser utilizadas reações cineticamente lentas. A multissegmentação da amostra é necessária para garantir a medida em estado estacionário pois existe uma etapa de retirada das bolhas de ar antes que a zona da amostra atinja o detector. A Análise em Fluxo Contínuo (CFA) trouxe uma nova dimensão para a

Química Analítica, possibilitando a execução de determinações rápidas, precisas e exatas, sendo efetivamente consolidada através dos "Autoanalyzers" da Technicon.

Durante muito tempo acreditou-se nesta necessidade de segmentação da amostra por bolhas de ar para que uma determinação em um sistema de fluxo contínuo fosse efetuada. Fundamentalmente, como comentado anteriormente, o papel das bolhas era permitir que fosse feita uma medida em estado estacionário, sem intercontaminação das amostras. Entretanto, em 1975, Ruzicka e Hansen [2], mostraram que essas determinações poderiam ser feitas em fluxo não segmentado, em estado não-estacionário e sem intercontaminação. Este novo conceito, denominado Análise por Injeção em Fluxo (FIA), consiste na injeção da amostra em um fluido transportador não-segmentado (reativo ou não), ao qual se mistura através de dispersão, enquanto é continuamente bombeada para o detector. A eliminação das bolhas de ar possibilita o desenvolvimento de sistemas mais simples que os de fluxo contínuo segmentado, com uma maior frequência de amostragem. Entretanto, esta não-segmentação do fluido transportador acarreta uma maior dispersão da amostra que, embora controlada, limita a aplicação do sistema quase que exclusivamente às reações rápidas, com alguma perda de sensibilidade.

Em 1985, Pasquini e Oliveira [94] desenvolveram um sistema aliando as vantagens da Análise por Injeção em Fluxo (simplicidade, reprodutibilidade, versatilidade e alta frequência de amostragem), com as da Análise em Fluxo Contínuo (baixa dispersão da amostra e aplicação à métodos baseados em reações lentas). Na Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentada, como foi chamada pelos autores, a amostra, após ser misturada previamente com os reagentes, é injetada, entre duas bolhas de ar, em um fluido transportador inerte. Da mesma forma que na CFA, as bolhas de

ar são retiradas, através de um desborbulhador, antes da amostra atingir o detector. Entretanto, as medidas não precisam ser feitas em estado estacionário, além do que ocorre uma pequena dispersão após a retirada das bolhas, como nos sistemas FIA, até que a amostra seja detectada. Portanto, a Análise em Fluxo Contínuo Monossegmentada consiste em um sistema híbrido entre as análises em fluxo contínuo e por injeção em fluxo. Convém, ainda, lembrar que, diferentemente do proposto pelos autores, a IUPAC [95] recomenda o uso de Análise em Fluxo Monossegmentado (MSFA), para denominar esta técnica, conforme classificação recentemente proposta\*.

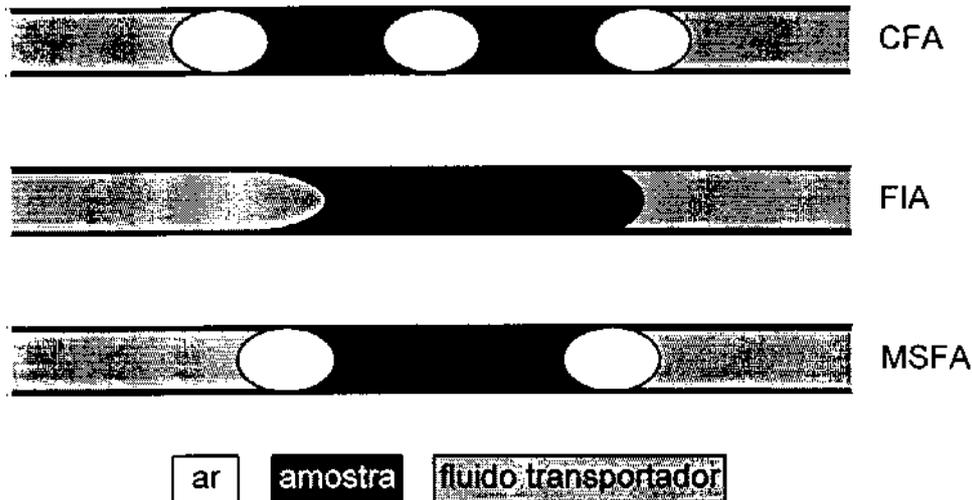
A Figura IV.1 mostra um diagrama esquemático da estrutura da amostra nos três sistemas descritos, onde a amostra é multissegmentada (não necessariamente como indicado na Figura) na CFA, é dispersa no fluido transportador no sistema FIA e monossegmentada na MSFA.

Alguns detalhes dos três sistemas devem ser salientados com clareza para que sejam evidenciadas as suas principais características. Na análise em fluxo contínuo a amostra é aspirada para o analisador, ao contrário do que ocorre em MSFA e FIA, onde é injetada. Este fato, além de consumir uma quantidade menor de amostra, torna estes últimos sistemas mais simples, pois o volume de amostra é determinado pela alça de amostragem de um injetor proporcional [96] ou de uma válvula rotatória semelhante às usadas em HPLC, enquanto que na CFA este volume é determinado pelo tempo de aspiração ou

---

\* A IUPAC classifica os sistemas de análise em fluxo, primeiramente, pela forma de amostragem: contínua ou intermitente. Os sistemas que empregam amostragem intermitente por aspiração e fluxo segmentado são classificados em Continuous Flow Analysis (CFA). Os sistemas que empregam amostragem intermitente por injeção em fluxo não-segmentado podem ser classificados em Flow Injection Analysis (FIA) ou Liquid Chromatography (LC); se a amostragem for intermitente por injeção em fluxo monossegmentado, o sistema é classificado em Mono Segmented Flow Analysis (MSFA). Mais detalhes sobre esta classificação e os termos recomendados são encontrados na referência [95].

por sensores eletrônicos [97], o que implica um maior grau de mecanização e/ou automação.



**Figura IV.1.** Estrutura da amostra nos sistemas de análise em fluxo contínuo (CFA), análise por injeção em fluxo (FIA) e análise em fluxo monossegmentado (MSFA).

Com relação à adição de reagentes, no sistema MSFA é geralmente efetuada a mistura prévia destes com a amostra, através de bombeamento diferencial [94]. Neste sistema, portanto, os reagentes estão contidos apenas no monossegmento, ao contrário do que ocorre na CFA e frequentemente nos sistemas FIA, onde são misturados à amostra por confluência, sendo continuamente bombeados para o analisador. Desta forma, o sistema monossegmentado possibilita um menor consumo de reagentes. Entretanto, tal como foi desenvolvida, a MSFA não possibilita determinações nas quais hajam a necessidade de reações sequenciais, como por exemplo na determinação espectrofotométrica de uréia, uma vez que a adição de outros reagentes por confluência descaracteriza o monossegmento.

A segmentação por bolhas de ar diferencia os sistemas CFA e MSFA do sistema FIA no tocante à dispersão e, como consequência, o processamento das amostras é também diferente. Na análise por injeção em fluxo, a amostra normalmente sofre uma dispersão maior que nos outros sistemas e, para que seja evitada uma intercontaminação entre as amostras, estas são, em geral, processadas individualmente, isto é, após uma determinada injeção, a seguinte ocorrerá apenas depois que o sinal do detector retornar à linha base. Nos sistemas segmentados, ao contrário, várias amostras podem ser processadas simultaneamente\*, pois, devido às bolhas de ar, a dispersão é pequena e a intercontaminação das amostras minimizada.

Certamente, a questão central dos sistemas de análise em fluxo está diretamente relacionada com o fenômeno de dispersão da amostra. Em termos conceituais, houve uma significativa evolução da análise em fluxo contínuo para a análise por injeção em fluxo, assinalada pelo fato de ser possível realizar uma determinação em um estado não-estacionário. Neste aspecto, a dispersão controlada e reproduzível obtida nos sistemas FIA alavancou este novo conceito. Entretanto, inerente à dispersão, os sistemas FIA carregam uma interdependência entre sensibilidade, tempo de residência e frequência de amostragem [94], possibilitando a otimização de dois destes parâmetros em detrimento do terceiro. O ganho de sensibilidade pode ser obtido pelo aumento do tempo de residência da amostra no reator desde que a dispersão não seja também significativamente aumentada. Isto pode ser feito através da parada de fluxo [98] ou trapeamento da amostra [99], que comprometem a frequência de amostragem, tornando crítica, em alguns casos, a aplicação de FIA em determinações baseadas em reações cineticamente

---

\* o processamento simultâneo em um sistema segmentado significa que várias amostras podem estar ao mesmo tempo no reator, muito embora as medidas sejam realizadas sequencialmente.

lentas. Da mesma forma, na análise em fluxo contínuo a sensibilidade é aumentada em uma proporção direta ao tempo de residência da amostra no analisador. Embora a dependência entre sensibilidade e frequência de amostragem não exista na CFA, esta última é limitada pelo próprio conceito de se efetuar as medidas em estado estacionário, o que exige uma grande quantidade de amostra para que, após o processo de desborbulhamento, ela não sofra dispersão até atingir o detector. A análise em fluxo monossegmentado têm o mérito de tornar os parâmetros sensibilidade e tempo de residência independentes da frequência de amostragem, conseguido por associar os aspectos práticos da CFA (segmentação da amostra) com os conceituais do sistema FIA (medidas em estado não-estacionário). Neste sentido, uma maior sensibilidade em um sistema MSFA é facilmente obtida pelo aumento do tempo de residência da amostra no reator, sem comprometer a frequência de amostragem. Por exemplo, esta pode ser aumentada com o aumento da vazão do fluido transportador e o tempo de residência mantido constante e otimizado através do aumento do percurso analítico do reator, isto é, não existe perda de sensibilidade com este procedimento.

Como pode ser notado, os sistemas FIA e MSFA apresentam uma série de vantagens sobre os de análise em fluxo contínuo, que começa pela própria simplicidade dos analisadores. Com respeito às análises por injeção em fluxo e fluxo monossegmentado, a cinética da reação utilizada em um determinado método pode indicar, a princípio, qual sistema seria o mais recomendado. Entretanto, dadas as frequências de amostragem praticamente iguais e a maior sensibilidade da MSFA (devido à menor dispersão), pode ser discutido se este sistema não teria, de uma maneira geral, vantagens sobre os sistemas FIA. Obviamente, devem ser excluídos desta discussão os métodos que, em alguma etapa, empregam gradientes de concentração, ponto no qual

os sistemas de análise por injeção em fluxo são insuperáveis, pelo menos até o momento.

## **IV.2. Desenvolvimento e Aplicações da Análise em Fluxo Monossegmentado**

A análise em fluxo monossegmentado, apesar da sua simplicidade e versatilidade, não causou o impacto que as CFA e FIA causaram. Enquanto a análise em fluxo contínuo trouxe novas perspectivas aos laboratórios de análises clínicas, o sistema FIA mereceu especial atenção da comunidade científica, o que resultou em mais de 5000 publicações nos últimos 20 anos [100]. Quanto a MSFA, poucos trabalhos têm sido descritos na literatura, sendo a maioria desenvolvida por pesquisadores brasileiros.

Embora seja difícil identificar as reais causas da baixa utilização do sistema monossegmentado, algumas hipóteses podem ser levantadas na tentativa de elucidar este fato. A primeira delas está relacionada com a injeção da amostra entre duas bolhas de ar, que é facilmente realizada com o injetor proporcional desenvolvido por Bergamin e colaboradores [96], sendo largamente difundido no Brasil. Embora esta injeção possa ser feita com uma válvula rotatória de 6 portas, semelhante às de HPLC, apenas em 1990 ela foi primeiramente empregada [101,102].

Outro ponto que pode ser considerado envolve o processamento de amostras. Como descrito anteriormente, um analisador FIA tem capacidade de processar, geralmente, apenas uma amostra de cada vez, isto é, após uma determinada injeção uma outra poderá ser feita quando o sinal registrado retornar à linha base. Isto permite que o operador controle facilmente o sistema

e faça injeções em intervalos praticamente idênticos. Por outro lado, um analisador CFA processa simultaneamente várias amostras, mas a "injeção" (aspiração) é controlada por um amostrador automático, dispensando a atenção cuidadosa de um operador. Entretanto, um analisador MSFA, que também processa as amostras simultaneamente\*, tem, em geral, a simplicidade de um FIA e, portanto, é operado manualmente. O sinal que está sendo registrado não indica o momento no qual deve ser feita uma nova injeção e o operador necessita realizar as injeções em intervalos de tempo constantes para garantir a boa reprodutibilidade das medidas. Neste sentido, é necessário que sejam feitas marcas no reator para se efetuar, com a passagem das bolhas de ar do monossegmento, a comutação do injetor em intervalos constantes ou que seja usado um injetor comutado automaticamente por um circuito eletrônico com temporizador [94]. Enfim, a MSFA necessita de uma maior atenção do operador ou, então, de um maior grau de mecanização/automação que o sistema FIA.

Finalmente, também deve ser levado em consideração o fato de não ter havido, na época, uma série de publicações para salientar tanto os aspectos positivos da MSFA como o seu escopo de aplicações. Desta forma, provavelmente, o trabalho original tenha sido visto apenas como uma proposta alternativa para o desenvolvimento de metodologias de análise em fluxo baseadas em reações cineticamente lentas, tais como a parada de fluxo e o trapeamento de amostra, não ocupando, portanto, um espaço diferenciado entre as inúmeras publicações envolvendo FIA.

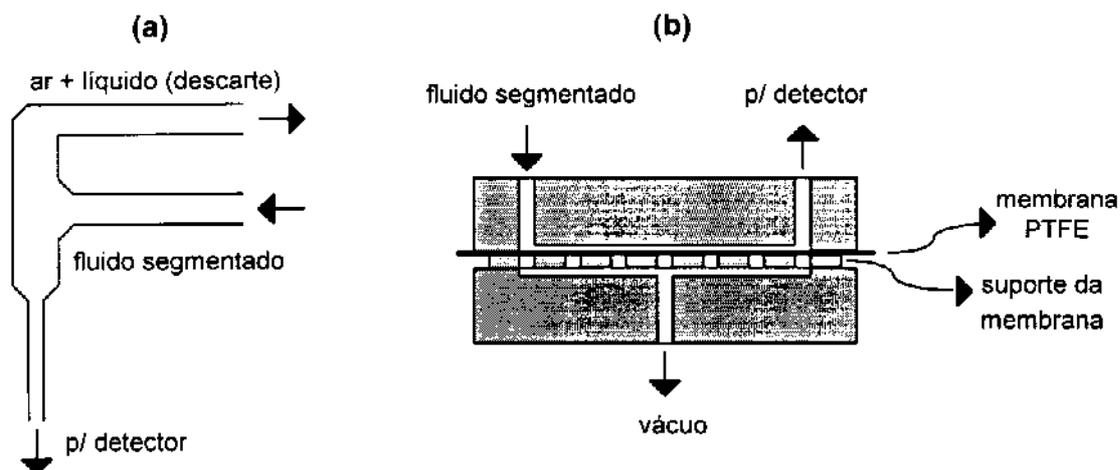
A proposta contida no trabalho descrito por Pasquini e Oliveira [94] era, obviamente, baseada em alguns aspectos da análise em fluxo contínuo. Tal como nesta, na MSFA existe, a princípio, a necessidade de retirada das bolhas

---

\* tanto na MSFA como na CFA é necessário, devido ao uso de reatores longos, o processamento simultâneo das amostras para que seja garantida uma alta frequência de amostragem.

de ar do monossegmento antes da amostra atingir o detector, para que sejam evitados registros de sinais espúrios. A Figura IV.2 mostra os desborbulhadores geralmente empregados nestes dois analisadores.

Na CFA a bolha de ar é, na maioria das vezes, retirada do reator através de bombeamento diferencial, causando uma certa instabilidade no fluxo e arrastando também uma pequena parte da amostra. Este procedimento provoca um consumo maior de amostra, pois, como discutido anteriormente, as medidas devem ser feitas em estado estacionário. Por outro lado, na MSFA [94] as bolhas de ar são retiradas através de uma cela de permeação de acrílico com membrana de politetrafluoretileno, sem perda de amostra e sem causar uma grande instabilidade no fluxo. O processo de permeação também foi empregado na CFA por Martin e colaboradores [103], que desenvolveram um desborbulhador utilizando um pequeno tubo de PTFE microporoso localizado, como nos outros casos, imediatamente antes da cela de fluxo.



**Figura IV.2.** Celas para desborbulhamento empregadas em: (a) análise em fluxo contínuo e (b) análise em fluxo monossegmentado.

A principal desvantagem proveniente da retirada das bolhas consiste na dispersão da amostra que, embora pequena, irá diminuir a frequência de amostragem. Para eliminar esta diminuição é necessário que seja aumentada a vazão, tanto na MSFA como na CFA, tornando o processo de limpeza mais rápido. Entretanto, esta solução é viável caso seja empregado um reator de maior comprimento para que o tempo de residência seja mantido constante e a sensibilidade não seja prejudicada. Uma alternativa elegante para aumentar a frequência de amostragem, mesmo empregando uma baixa vazão do fluido transportador e, portanto, um reator relativamente curto, foi proposta por Pasquini [104] e é aplicável apenas à MSFA. Neste sistema, o monossegmento injetado, após passar pelo reator, é reamostrado para uma linha de detecção na qual a vazão do fluido transportador inerte é significativamente maior. Desta forma, enquanto no trabalho original [94] foi obtida uma frequência de amostragem de  $120 \text{ h}^{-1}$  (vazão =  $4,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; reator =  $3 \text{ m} \times 2 \text{ mm}$  diâmetro interno), a reamostragem do monossegmento aumentou esta frequência para  $150 \text{ h}^{-1}$  (vazão no reator =  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; vazão na linha de detecção =  $6,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; reator =  $1,5 \text{ m} \times 2 \text{ mm d.i.}$ ). Como pode ser notado, além de melhorar o desempenho, este procedimento contribui no sentido de miniaturização do analisador. Recentemente uma nova alternativa, não menos elegante que a anterior, foi descrita por Nogueira e colaboradores [105], na qual o detector é deslocado da linha do reator para uma linha de lavagem (o que pode trazer as mesmas vantagens descritas acima) ou para uma linha com fluxo interrompido. Neste sistema a segmentação é feita com apenas uma bolha de ar, localizada após a amostra, sendo que a realocação é feita de forma a evitar a passagem da bolha pelo detector.

A remoção das bolhas de ar dos analisadores segmentados tem a finalidade de poupar o registrador potenciométrico, porventura empregado, tanto

de sinais espúrios como de esforço mecânico. Entretanto, a não remoção destas bolhas aumenta a frequência de amostragem pois diminui a dispersão longitudinal da amostra e, neste sentido, vários trabalhos têm sido descritos empregando este procedimento. Patton e colaboradores [106] descreveram, em 1982, um detector de bolhas que possibilita o registro do sinal espectrofotométrico em um analisador de fluxo contínuo apenas quando a cela está totalmente preenchida com líquido, elevando a frequência de amostragem para  $360 \text{ h}^{-1}$ . Os analisadores de 3ª geração da Technicon (TrAAcs-800 e CHEM-1) provavelmente sejam os exemplos mais significativos entre os analisadores de fluxo contínuo que dispensam a etapa de remoção de bolhas [97]. Ademais, celas potenciométricas que admitem bolhas de ar têm sido também descritas para uso em CFA, com o objetivo de se melhorar tanto a frequência de amostragem [107,108] como a sensibilidade da medida potenciométrica [109]. Com relação à MSFA, tem sido verificado que pequenas bolhas de ar não comprometem a estabilidade da chama em espectrofotometria de absorção atômica [110,111] e que a passagem das bolhas de ar através da cela possibilita o registro do sinal espectrofotométrico com precisão e sem dano aparente ao registrador potenciométrico [112,113]. Provavelmente, com a utilização cada vez mais acentuada de microcomputadores na aquisição de dados, em substituição aos registradores convencionais, a passagem de bolhas de ar através do sistema de detecção deverá se tornar o procedimento usual nas análises em fluxo monossegmentado e fluxo contínuo.

Outras contribuições ao desenvolvimento da MSFA, além das citadas acima, têm sido descritas na literatura. Andrade e Loboschi [114], em função do processamento simultâneo de amostras que ocorre em um analisador monossegmentado, desenvolveram um contador digital simples para auxiliar no controle das injeções das amostras. Reis e colaboradores [110] empregaram

apenas uma bolha de ar para segmentar a amostra na sua região posterior, a qual foi introduzida em um espectrofotômetro de absorção atômica. Neste caso, assim como em outro envolvendo a mesma técnica de detecção [111], a monossegmentação foi utilizada apenas com o objetivo de minimizar a dispersão da amostra e não obter um longo tempo de residência.

A análise em fluxo monossegmentado tem sido aplicada em determinações espectrofotométricas de boro [105,115], creatinina [116] e molibdênio [117], onde as primeiras estão baseadas em reações lentas e a última em uma reação catalisada. Com relação ao molibdênio(VI), a sua atividade catalítica na reação de oxidação do iodeto por peróxido de hidrogênio tem sido estudada em função de vários parâmetros, usando métodos quimiométricos, com o objetivo de se otimizar as condições para a sua determinação através de MSFA [118,119].

Embora Pasquini [120], em 1984, tenha afirmado que "a extração por solventes dificilmente poderá ser aplicada ao sistema proposto", esta tem sido realizada com sucesso em MSFA, tanto em fase única [112] como em duas fases [113]. Além do mais, a possibilidade de diálise em MSFA foi sugerida pelo mesmo autor [120] como sendo possível e esta tem sido efetuada por Buch-Rasmussen [101,102] com sangue total. Entretanto, a diálise é feita para um fluido não segmentado e a detecção amperométrica de NADH é utilizada para a determinação de glicose, creatinina e lactato.

Em 1990, a análise em fluxo monossegmentado foi novamente descrita por Tian e colaboradores [121,122], sendo inadequadamente denominada "segmental-FIA". Na verdade, este sistema é semelhante ao MSFA, apresentando, ainda, algumas desvantagens. O principal ponto em comum consiste no fato da amostra ser injetada entre duas bolhas de ar. Entretanto, analogamente à CFA, no sistema "segmental-FIA" o reagente é

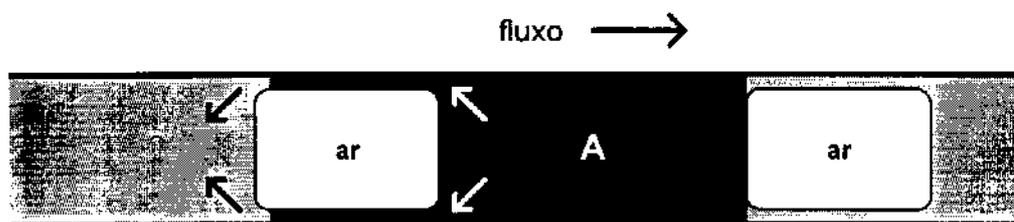
adicionado continuamente ao reator e a retirada das bolhas de ar é realizada através de bombeamento diferencial (com uma cela semelhante à mostrada na Figura IV.2a), o que causa um maior consumo de reagentes e amostras quando comparado com a MSFA. Os sistemas "segmental-FIA" têm sido utilizados em determinações potenciométricas de fluoreto [123] e de demanda química de oxigênio [124] com detecção espectrofotométrica. Curiosamente, o sistema descrito por Tian tem sido denominado ora análise por injeção em fluxo segmentado [124], ora análise em fluxo contínuo monossegmentado [125].

A análise em fluxo monossegmentado, como exposto, tem várias vantagens sobre a análise em fluxo contínuo, principalmente quanto à frequência de injeção e ao consumo de amostras e reagentes. Como a CFA tem sido empregada frequentemente em determinações de interesse clínico [126,127], farmacológico [128] e ambiental [129-133] e também no desenvolvimento de analisadores eletroquímicos [134], é importante salientar que estas metodologias descritas podem, em princípio, ser adaptadas com as respectivas vantagens à MSFA.

## V. DISPERSÃO EM ANÁLISE EM FLUXO MONOSSEGMENTADO

---

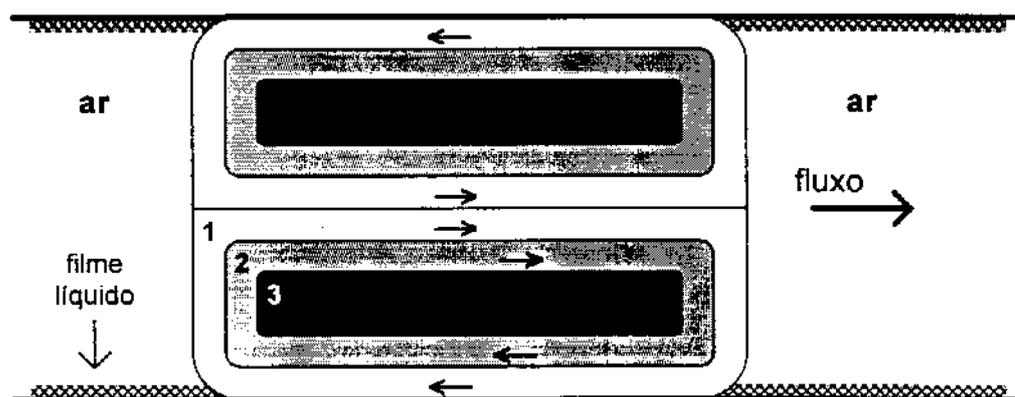
A dispersão em sistemas segmentados ocorre como consequência da molhabilidade das paredes internas do reator pela solução contida no segmento. Desta maneira, um filme de solução de determinada espessura recobre as paredes do reator e, portanto, a espécie em questão pode ser transferida para outro segmento (de amostra ou fluido transportador) através de difusão e convecção. A Figura V.1 mostra um esquema da segmentação do fluido em um analisador segmentado, indicando como este processo acontece.



**Figura V.1.** Diagrama esquemático do fluido em um analisador segmentado. As setas mostram como ocorre a transferência das espécies do segmento (A) para o segmento posterior.

A dispersão em análise em fluxo contínuo, na qual a amostra é multissegmentada, foi detalhadamente estudada por Snyder e Adler, empregando modelos ideal [135] e não-ideal [136]. No modelo ideal foi assumido que a concentração da amostra em um dado segmento é uniforme em qualquer instante, isto é, a mistura entre amostra e fluido dentro de um segmento é infinitamente rápida. Ao contrário, no modelo não-ideal o processo de mistura não é instantâneo, ocorrendo segundo um padrão em forma de oito,

mostrado na Figura V.2 e conhecido como "bolus flow". Por exemplo, se uma espécie colorida é colocada no centro ou na borda de um segmento em fluxo contínuo, imediatamente ocorre a dispersão na forma de um oito (região 1 da Figura V.2), sendo que a transferência desta espécie para as regiões adjacentes "2" e "3" é lenta. Em outras palavras, a dispersão longitudinal através do segmento é rápida, enquanto que a radial (transferência de massa) é lenta. Portanto, a mistura de uma espécie dentro de um segmento ocorre pelo seu movimento de uma corrente para outra adjacente por processos de difusão e convecção [136].



**Figura V.2.** Representação esquemática do padrão de fluxo dentro de um segmento líquido ("bolus flow").

A teoria desenvolvida por estes autores permite avaliar a dispersão de uma espécie em função dos parâmetros do analisador (diâmetro interno, comprimento, vazão, volumes dos segmentos de ar e de amostra), da solução (viscosidade e tensão superficial) e, no caso do modelo não-ideal, da própria espécie (coeficiente de difusão). Nos experimentos realizados, que concordaram com os modelos desenvolvidos, foram empregados tubos de vidro, cuja molhabilidade por soluções aquosas é bastante alta. Na CFA é necessário que

a parede do reator seja molhada pois, caso contrário, podem ocorrer problemas de natureza hidráulica. Entretanto, na MSFA normalmente são utilizados tubos de polietileno (PE) ou politetrafluoretileno (PTFE) para a construção dos analisadores. Portanto, os resultados obtidos nestes estudos não são suficientes para a otimização dos sistemas monossegmentados, principalmente porque as molhabilidades destes materiais poliméricos frente às soluções aquosas são muito diferentes quando comparadas à do vidro.

Tian e colaboradores [121] realizaram estudos de dispersão em sistemas monossegmentados, tanto em reatores de vidro como de PTFE, avaliando os efeitos do comprimento e diâmetro do reator, vazão, volume do segmento e temperatura. Entretanto, empregaram um desborbulhador que influencia diretamente a dispersão.

O estudo realizado neste trabalho objetivou a otimização do sistema monossegmentado com relação à frequência de amostragem. Com a utilização de Planejamento Fatorial de dois níveis [137], os efeitos dos seguintes parâmetros sobre o tempo de limpeza do monossegmento foram investigados: material, diâmetro e comprimento do reator, vazão, volumes dos segmentos de amostra e de ar, viscosidade e tensão superficial da solução. O tempo de limpeza é importante uma vez que determina o intervalo mínimo que deve ocorrer entre as injeções consecutivas de dois monossegmentos, de forma que o material transferido do primeiro para o fluido transportador não seja transferido deste para o segundo, o que caracterizaria uma intercontaminação. O tempo de limpeza foi medido através da injeção de um monossegmento, constituído de solução colorida, em um analisador totalmente preenchido com água e observação do sinal espectrofotométrico gerado por esta solução.

## V.1. Experimental

Os parâmetros estudados e os respectivos níveis estão listados na Tabela V.1. Os parâmetros físico-químicos foram determinados de acordo com os utilizados por Snyder e Adler [135]. A viscosidade da solução foi variada com o uso de água ( $\eta/\eta_0 = 1,00$ ) e solução de glicerol a 28 % ( $\eta/\eta_0 = 2,27$ ) e a tensão superficial foi variada com o uso de água ( $\gamma = 72 \text{ din cm}^{-1}$ ) e solução de n-propanol a 1,0 % ( $\gamma = 49 \text{ din cm}^{-1}$ ). Foi admitido que, nestas concentrações, o glicerol não altera significativamente a tensão superficial da água (solução 30 %,  $\gamma = 72 \text{ din cm}^{-1}$ ), assim como o n-propanol não altera a viscosidade da água (solução 1,0 %,  $\eta/\eta_0 = 1,05$ ). Admitiu-se também que não existem efeitos sinérgicos ou antagônicos entre o glicerol e o n-propanol sobre a viscosidade e a tensão superficial da solução.

**Tabela V.1.** Parâmetros utilizados no estudo da dispersão em sistemas de fluxo monossegmentado.

parâmetro	nível (+)	nível (-)
<b>material</b>	PTFE	PE
<b>diâmetro do reator (mm)</b>	1,54 <sup>PTFE</sup> ; 1,40 <sup>PE</sup>	0,97 <sup>PTFE</sup> ; 1,07 <sup>PE</sup>
<b>comprimento do reator (m)</b>	3,0	1,0
<b>vazão (mL min<sup>-1</sup>)</b>	2,75	1,85
<b>volume do segmento (μL)</b>	500	100
<b>volume das bolhas (μL)</b>	150	50
<b>viscosidade (<math>\eta/\eta_0</math>)</b>	2,27	1,00
<b>tensão superficial (din cm<sup>-1</sup>)</b>	72	49

Nos planejamentos fatoriais envolvendo apenas os parâmetros físicos, foi usada uma solução de permanganato de potássio  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Nos casos envolvendo os parâmetros físico-químicos, foi empregada uma solução resultante da reação de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrito de sódio com sulfanilamida e n-naftil-etilenodiamina [138].

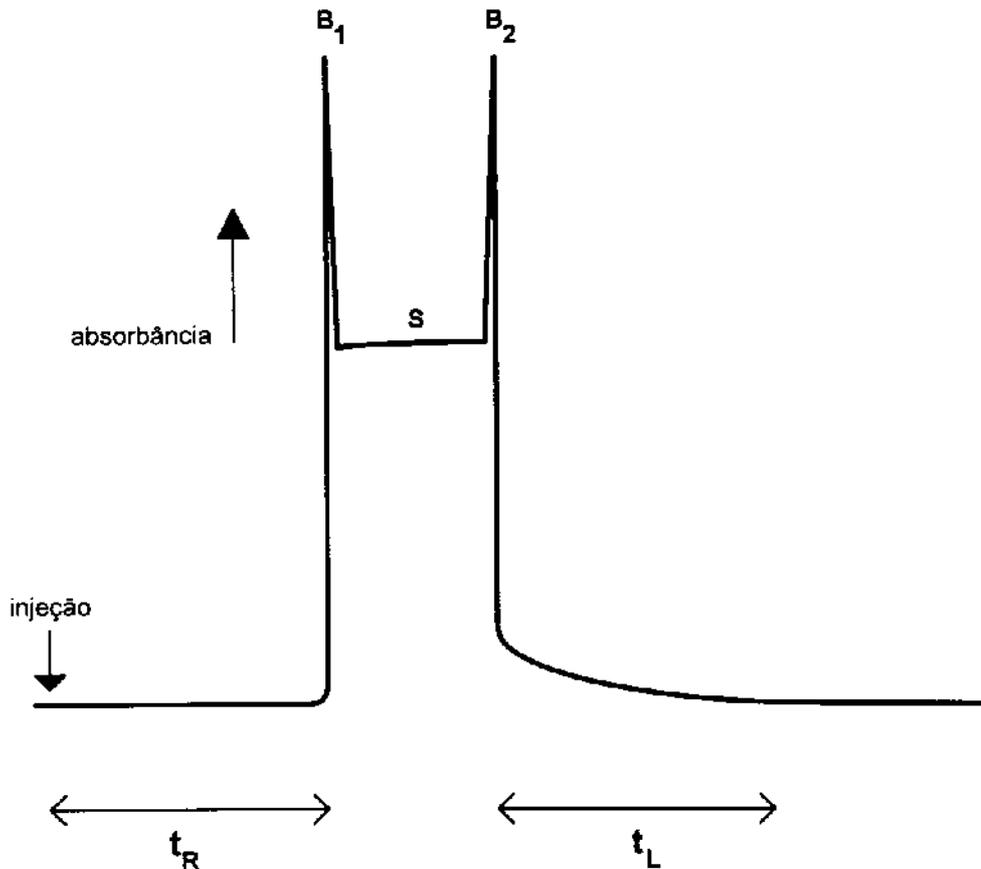
O monossegmento foi injetado no analisador totalmente preenchido com água, sendo o injetor comutado para a posição de amostragem imediatamente após a inserção da segunda bolha de ar. Os fluidos foram impulsionados por uma bomba peristáltica Ismatec modelo MP13GJ-4 através de tubos de "tygon". Os reatores foram dispostos na forma de bobina com diâmetro de 40 mm.

O sistema de detecção empregado foi baseado em um fotômetro que emprega LED/LDR, similar àquele descrito anteriormente [139]. A detecção foi feita perpendicularmente a um tubo de vidro de 2,5 mm de diâmetro interno e 30 mm de comprimento, utilizando-se um LED com intensidade máxima de emissão em 560 nm.

## V.2. Resultados e Discussão

A dispersão de um segmento injetado em um reator tubular em forma de bobina se manifesta pela transferência do material constituinte da amostra para o fluido transportador, na região situada logo após a última bolha de ar que define o monossegmento. Uma espécie colorida, quando presente em um monossegmento introduzido em um sistema de fluxo, gera, ao passar pelo detector, um sinal espectrofotométrico típico, como mostrado na Figura V.3.

Basicamente, a dispersão do monossegmento pode ser descrita como sendo constituída de dois processos, ilustrados esquematicamente na Figura V.1. No primeiro, as espécies presentes no monossegmento são



**Figura V.3.** Sinal típico obtido pela passagem de um monossegmento por um detector espectrofotométrico:  $t_R$ , tempo de residência;  $t_L$ , tempo de limpeza; S, sinal originado pelo monossegmento;  $B_1$  e  $B_2$ , sinais originados pela passagem das bolhas de ar pelo detector.

transferidas para o filme que molha as paredes do reator e/ou para as regiões estagnadas decorrentes de irregularidades que podem existir na superfície interna deste reator, através de efeitos de difusão e convecção. Neste processo, similar ao que ocorre em um analisador multissegmentado, o efeito convectivo provém da movimentação interna do fluido do monossegmento (Figura V.2) enquanto que o efeito difusivo predomina na interface filme/solução. Uma vez transferidas para o filme e/ou regiões estagnadas, as espécies ali presentes tornam-se contaminantes em potencial para o próximo monossegmento. Desta

forma, a sua remoção pelo fluido transportador deve ser a mais completa possível.

O segundo processo consiste na transferência de massa do filme e/ou das regiões estagnadas para o fluido transportador. Este processo deve diferir do que ocorre em sistemas multissegmentados em função dos diferentes graus de segmentação. Como na MSFA, a segmentação é feita em uma frequência bem menor que na CFA, intercalando pequenos segmentos de amostra em grandes segmentos de fluido transportador, o tamanho deste não possibilita que um efeito convectivo considerável se manifeste durante a transferência de massa, quando comparado com o que ocorre nos sistemas multissegmentados. Entretanto, efeitos convectivos devem atuar na interface transportador/bolha de ar, transferindo rapidamente as espécies presentes no filme para as porções iniciais do transportador. No sentido axial, somente os efeitos de difusão devem ser os responsáveis pela dispersão da espécie. Portanto, estes processos podem explicar o perfil de concentração exponencial, observado experimentalmente na região do fluido transportador situada logo após a segunda bolha do monossegmento e mostrado esquematicamente na Figura V.3.

Neste trabalho, o parâmetro escolhido para se estudar o fenômeno de dispersão em um analisador de fluxo monossegmentado foi o tempo de limpeza. Este tempo está diretamente relacionado, mantida a vazão do fluido transportador constante, com a quantidade e distribuição do material que foi perdido pelo monossegmento durante o trajeto efetuado desde a injeção no analisador até o detector, refletindo, portanto, a dispersão sofrida pela amostra.

Inicialmente foram estudados os efeitos dos seis primeiros parâmetros listados na Tabela V.1 sobre o tempo de limpeza, empregando-se a solução de permanganato de potássio. Dentro dos limites propostos, os tempos

de residência das amostras variaram de 20 s até cerca de 3 min. O diâmetro da bobina empregada não foi objeto de investigação pois nos trabalhos desenvolvidos por Snyder e Adler [135,136] foi verificado que esta variável não influencia a dispersão em sistemas multissegmentados.

Experimentos preliminares mostraram que ao se efetuar os planejamentos para o PTFE e PE separadamente, a interpretação dos resultados tornava-se mais simples e clara. Desta forma, foram realizados dois fatoriais de 2 níveis e 5 efeitos, para os reatores de PTFE e PE, cujos resultados experimentais estão relacionados nas Tabelas V.2 e V.3, respectivamente.

As alturas dos sinais espectrofotométricos dos monossegmentos de maior volume (500  $\mu$ L) foram tomadas em dois pontos diferentes. A primeira, denotada por *h*, corresponde à medida efetuada no mesmo intervalo de tempo que para o monossegmento de menor volume. A segunda, denominada *H*, foi tomada ao final do monossegmento. Na verdade, com a injeção de 500  $\mu$ L de amostra, o sinal espectrofotométrico aumenta até atingir o equivalente ao medido em volume infinito. Entretanto, as pequenas diferenças (cerca de 5 mm) entre os sinais tomados nestes dois pontos podem ser atribuídas ao fato do monossegmento de maior volume conseguir lavar totalmente o tubo de vidro do sistema de detecção.

A Tabela V.4 mostra os efeitos mais significativos dos parâmetros sobre o tempo de limpeza, obtidos com os dois materiais. As estimativas dos desvios padrão dos efeitos foram calculadas a partir das interações de altas ordens. No caso do PTFE foi obtido um valor de  $\pm 0,65$ , considerando os valores de interações de 2ª ordem e superiores desprezíveis e, no caso do PE, um valor de  $\pm 0,60$  foi obtido considerando os valores das interações terciárias e superiores como devido a erros experimentais.

**Tabela V.2.** Resultados obtidos no planejamento fatorial de  $2^5$  experimentos no analisador de PTFE:  $t_R$ , tempo de residência;  $t_L$ , tempo de limpeza;  $V_L$ , volume de limpeza, h e H, sinais espectrofotométricos. Parâmetros: V1, diâmetro do reator; V2, comprimento; V3, vazão; V4, volume da amostra e V5, volume das bolhas de ar.

	V1	V2	V3	V4	V5	$t_R$ (s)	$t_L$ (s)	$V_L$ (mL)	h (mm)	H (mm)
01	-	-	-	-	-	31,2	20,4	0,63	124,0	
02	+	-	-	-	-	70,8	20,4	0,63	122,5	
03	-	+	-	-	-	79,5	16,2	0,50	122,8	
04	+	+	-	-	-	194,0	23,4	0,72	120,5	
05	-	-	+	-	-	21,0	15,6	0,72	121,8	
06	+	-	+	-	-	45,6	17,4	0,80	121,5	
07	-	+	+	-	-	52,2	15,6	0,72	123,0	
08	+	+	+	-	-	126,0	14,4	0,66	122,5	
09	-	-	-	+	-	31,8	22,8	0,70	124,0	129,0
10	+	-	-	+	-	69,6	22,2	0,68	123,0	127,0
11	-	+	-	+	-	79,8	22,5	0,69	124,5	128,0
12	+	+	-	+	-	194,0	20,4	0,63	123,0	128,0
13	-	-	+	+	-	20,4	16,8	0,77	122,0	128,0
14	+	-	+	+	-	46,2	19,8	0,91	121,5	128,0
15	-	+	+	+	-	52,2	19,2	0,88	123,5	128,5
16	+	+	+	+	-	128,0	16,5	0,76	122,5	128,0
17	-	-	-	-	+	36,0	21,6	0,67	119,0	
18	+	-	-	-	+	74,4	23,4	0,72	117,0	
19	-	+	-	-	+	84,6	22,5	0,69	119,0	
20	+	+	-	-	+	194	15,9	0,49	120,0	
21	-	-	+	-	+	23,4	16,5	0,76	118,0	
22	+	-	+	-	+	49,8	14,4	0,66	118,5	
23	-	+	+	-	+	57,0	17,1	0,78	123,0	
24	+	+	+	-	+	130,0	16,5	0,76	122,0	
25	-	-	-	+	+	36,0	22,2	0,68	121,0	128,0
26	+	-	-	+	+	74,4	22,2	0,68	120,0	127,5
27	-	+	-	+	+	83,7	22,2	0,68	123,0	129,5
28	+	+	-	+	+	198,0	23,1	0,71	119,0	126,0
29	-	-	+	+	+	22,8	16,8	0,77	122,5	127,0
30	+	-	+	+	+	49,8	16,5	0,76	123,0	126,5
31	-	+	+	+	+	56,1	16,8	0,77	123,5	127,5
32	+	+	+	+	+	133,0	15,3	0,70	125,0	128,0

**Tabela V.3.** Resultados obtidos no planejamento fatorial de  $2^5$  experimentos no analisador de PE:  $t_R$ , tempo de residência;  $t_L$ , tempo de limpeza;  $V_L$ , volume de limpeza, h e H, sinais espectrofotométricos. Parâmetros: V1, diâmetro do reator; V2, comprimento; V3, vazão; V4, volume da amostra e V5, volume das bolhas de ar.

	V1	V2	V3	V4	V5	$t_R$ (s)	$t_L$ (s)	$V_L$ (mL)	h (mm)	H (mm)
01	-	-	-	-	-	36,9	21,0	0,65	121,0	
02	+	-	-	-	-	52,8	22,2	0,68	123,0	
03	-	+	-	-	-	95,4	18,6	0,57	121,0	
04	+	+	-	-	-	154,0	42,0	1,30	95,5	
05	-	-	+	-	-	24,0	15,0	0,69	121,5	
06	+	-	+	-	-	33,9	13,5	0,62	121,0	
07	-	+	+	-	-	62,1	15,3	0,70	123,0	
08	+	+	+	-	-	102,0	35,1	1,61	85,0	
09	-	-	-	+	-	37,2	20,7	0,64	122,0	127,5
10	+	-	-	+	-	51,6	24,3	0,75	123,0	127,5
11	-	+	-	+	-	94,8	18,0	0,56	124,5	128,0
12	+	+	-	+	-	154,0	49,2	1,52	115,0	121,0
13	-	-	+	+	-	24,3	14,4	0,66	123,5	128,5
14	+	-	+	+	-	35,4	15,9	0,73	123,0	127,0
15	-	+	+	+	-	63,0	15,6	0,72	123,0	127,5
16	+	+	+	+	-	102,0	38,1	1,75	111,0	117,5
17	-	-	-	-	+	39,6	21,6	0,67	122,0	
18	+	-	-	-	+	55,8	22,2	0,68	121,5	
19	-	+	-	-	+	98,4	15,6	0,48	124,0	
20	+	+	-	-	+	158,0	43,2	1,33	101,0	
21	-	-	+	-	+	27,0	14,1	0,65	124,0	
22	+	-	+	-	+	36,0	16,8	0,77	119,5	
23	-	+	+	-	+	65,7	16,2	0,74	122,5	
24	+	+	+	-	+	104,0	34,2	1,57	84,0	
25	-	-	-	+	+	40,8	20,1	0,62	122,0	128,0
26	+	-	-	+	+	54,9	22,2	0,68	121,0	126,5
27	-	+	-	+	+	98,1	21,0	0,65	123,0	127,0
28	+	+	-	+	+	157,0	48,3	1,49	117,0	121,0
29	-	-	+	+	+	26,1	15,0	0,69	125,0	128,0
30	+	-	+	+	+	36,6	17,4	0,80	125,5	128,0
31	-	+	+	+	+	64,8	13,8	0,63	124,0	129,0
32	+	+	+	+	+	104,0	37,2	1,71	111,0	117,0

**Tabela V.4.** Estimativa dos efeitos mais significativos obtidos a partir de um planejamento fatorial de  $2^5$  experimentos para PTFE e PE.

<b>efeito</b>	<b>PTFE</b>	<b>PE</b>
<b>diâmetro do reator</b>	- 0,19	+ 12,86
<b>comprimento do reator</b>	- 0,71	+ 10,31
<b>vazão</b>	- 4,76	- 6,41
<b>volume do segmento</b>	+ 1,50	+ 1,54
<b>volume das bolhas</b>	- 0,04	0,00
<b>diâmetro x comprimento</b>	- 0,64	+ 11,29
<b>média</b>	18,96	+ 23,68
<b>desvio padrão</b>	± 0,65	± 0,60

Em função das estimativas dos desvios padrão obtidas e assumindo um grau de confiança de 95 %, pode ser afirmado que, dentro dos limites impostos pelos níveis das variáveis, com o uso de polietileno tanto a vazão como o diâmetro e o comprimento do reator afetam significativamente o tempo de limpeza, havendo um efeito sinérgico entre estas duas últimas variáveis. Os valores positivos dos efeitos indicam que o tempo de limpeza aumenta quando estes parâmetros são alterados do nível inferior para o superior. Por outro lado, quando PTFE é utilizado apenas a vazão afeta o tempo de limpeza.

O fato, obviamente esperado, da vazão afetar diretamente o tempo de limpeza não significa, entretanto, que esta variável tenha alguma influência na dispersão do monossegmento. Ao serem comparados, nas Tabelas V.2 e V.3, os sinais espectrofotométricos ( $h$ ) obtidos em experimentos nos quais apenas a vazão foi alterada (por exemplo, experimentos 1 e 5, 2 e 6, 3 e 7, etc), pode ser verificado que, dentro dos erros experimentais, não há diferenças significativas entre estas medidas. Portanto, pode ser concluído que a vazão do

fluido transportador não afeta a dispersão do monossegmento em ambos os analisadores, o que concorda com o observado por Pasquini [120] para o reator de polietileno e por Tian e colaboradores [121] para o reator de PTFE. Ademais, Tian e colaboradores também verificaram que, no caso do PTFE, o comprimento e o diâmetro do reator, o volume do segmento e a temperatura não interferem na dispersão do monossegmento, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Para a determinação dos efeitos da viscosidade e tensão superficial da solução sobre o tempo de limpeza, foram efetuados dois planejamentos fatoriais fracionais  $2^{7-3}$  (para PE e PTFE). Neste tipo de planejamento, os efeitos principais estão misturados com os efeitos terciários. Assumindo que os efeitos terciários não são significativos, os efeitos destes dois parâmetros podem ser inferidos. Os resultados obtidos nestes experimentos estão relacionados na Tabela V.5, indicando que, tanto para o PE como para o PTFE, a viscosidade e a tensão superficial da solução não afetam o tempo de limpeza do monossegmento. Como pode ser visto, os desvios padrão foram relativamente altos, o que pode estar associado às constantes variações de viscosidade e tensão superficial das amostras, frente ao fluido transportador de água.

Neste fatorial fracional envolvendo variáveis físico-químicas alguns comportamentos anômalos foram observados. No caso do reator de PTFE, foram obtidos sinais espectrofotométricos menores que os esperados, principalmente quando a amostra em questão possuía baixa viscosidade e era antecedida por uma de alta viscosidade. Por exemplo, o sinal obtido em uma medida efetuada nas mesmas condições que o experimento 6 da Tabela V.2 apresentou um sinal equivalente a cerca de 70 % do obtido em estado estacionário. Embora este comportamento possa estar associado à variação de

viscosidade das amostras, é muito difícil estabelecer uma explicação consistente para este fato, pois os parâmetros estudados eram variados simultânea e aleatoriamente. Uma hipótese, considerando que os reatores também eram alterados, pode estar fundamentada na limpeza do tubo de vidro do sistema de detecção. Outro ponto que deve ser salientado está relacionado com a estabilidade mecânica do monossegmento. Ao contrário do que ocorre no PTFE, foi observado que o monossegmento não possui estabilidade no reator de polietileno quando uma amostra com alta viscosidade é injetada no analisador, cujo fluido transportador também possui alta vazão.

**Tabela V.5.** Estimativa dos efeitos mais significativos obtidos a partir de um planejamento fatorial de  $2^{7-3}$  experimentos para PTFE e PE.

<b>efeito</b>	<b>PTFE</b>	<b>PE</b>
<b>diâmetro do reator</b>	- 1,20	+ 0,34
<b>comprimento do reator</b>	- 0,38	+ 6,49
<b>vazão</b>	- 5,48	- 5,89
<b>volume do segmento</b>	+ 2,10	+ 1,84
<b>volume das bolhas</b>	+ 1,35	+ 1,61
<b>tensão superficial</b>	+ 0,45	- 1,68
<b>viscosidade</b>	-1,13	- 0,19
<b>média</b>	12,98	17,61
<b>desvio padrão</b>	± 1,30	± 2,41

Em razão dos resultados obtidos e dos comportamentos observados neste fatorial fracional, existe a necessidade de uma investigação mais cuidadosa sobre a influência da viscosidade e tensão superficial na dispersão da amostra em sistemas monossegmentados, que foge do objetivo principal desta tese. Por exemplo, uma cela de detecção com propriedades semelhantes

às do polietileno e politetrafluoretileno pode ser empregada. Além do mais, é necessário um estudo sobre o comportamento de uma amostra nestes sistemas, onde as suas viscosidade e/ou tensão superficial diferem significativamente (ou não) das do fluido transportador.

De qualquer maneira, os tubos de PE e PTFE empregados neste estudo apresentaram um comportamento diferente de um reator de vidro, que está diretamente relacionado com as diferentes molhabilidades destes três materiais frente às soluções aquosas. Desta forma, a pequena dispersão observada, principalmente no reator de PTFE, pode ser atribuída à existência de regiões do analisador nas quais o fluido se encontra estagnado e/ou ao fato da cela de detecção ser feita de vidro, pois este material pode ser molhado, retendo um filme de composição próxima à do monossegmento da amostra. Ao contrário do que ocorre na CFA, onde as paredes do reator devem ser molhadas para que seja obtida uma segmentação mecanicamente estável, na MSFA é possível que sejam obtidos monossegmentos estáveis, independentemente da molhabilidade do material do reator. Isto é conseguido fundamentalmente porque, como discutido, a taxa de segmentação em um analisador de fluxo monossegmentado é muito menor que a de um multissegmentado. Como consequência, os reatores de PE e, em especial, de PTFE causam uma menor dispersão da amostra, como já haviam postulado Snyder e Adler [135].

### **V.3. Conclusões**

Os resultados dos planejamentos fatoriais realizados com as variáveis físicas e físico-químicas relevantes de um sistema monossegmentado revelaram uma diferença de comportamento no tempo de limpeza em função do

material (PE ou PTFE) constituinte do analisador. O PTFE apresentou um comportamento excelente uma vez que, quando utilizado em um sistema de fluxo, a dispersão da amostra independe do diâmetro e do comprimento do reator pelo qual passa o monossegmento. Portanto, no caso de aplicações às soluções aquosas, é possível concluir que este material deve ser o recomendado para a construção de analisadores miniaturizados pois possibilita o uso de reatores menores sem que se comprometa o desempenho global do instrumento.

## **VI. CONSTRUÇÃO DE UM ANALISADOR AUTOMÁTICO DE FLUXO MONOSSEGMENTADO**

---

Os analisadores podem ser classificados, em função da forma de processamento da amostra, em discretos, contínuos e robotizados [140,141]. Os discretos caracterizam-se por preservar a integridade de uma amostra, mantendo-a fisicamente separada das outras durante toda a análise. Em resumo, neste tipo de analisador a amostra é colocada em um recipiente, geralmente semelhante a uma cubeta, onde pode ser diluída, aquecida e receber reagentes antes que a medida do parâmetro de interesse seja efetuada. Na verdade, um analisador discreto realiza operações de maneira análoga ao respectivo procedimento manual. Nos analisadores contínuos, as amostras são sequencialmente introduzidas em um reator tubular contendo um fluido, o qual transporta as amostras continuamente até o sistema de detecção. Este fluido pode ser inerte ou reativo, segmentado ou não, podendo, ainda, confluir com outras soluções reativas necessárias para que a amostra seja analisada. Os analisadores robotizados são, naturalmente, baseados no uso de robôs, cujos movimentos imitam as ações de um operador humano nos procedimentos que devem ser realizados durante uma análise.

Dentre estes tipos de analisadores, os robotizados, embora mais flexíveis, são os mais complexos pois, além da microeletrônica e do computador, necessitam de sistemas mecânicos de altas precisão e exatidão. O emprego de robôs em laboratórios químicos ainda é restrito e, por ora, apenas justificado na análise de amostras tóxicas e/ou radioativas. Os analisadores robotizados, ao contrário dos discretos e contínuos, podem ser aplicados na realização das operações preliminares de uma metodologia de análise

(pesagem, dissolução, filtração, etc.) e, portanto, desempenharão, em um futuro não muito distante, um papel essencial no desenvolvimento de laboratórios totalmente automáticos [140].

Os analisadores discretos e contínuos, sendo mais simples, experimentaram um acentuado desenvolvimento nos últimos 25 anos, fundamental para a automação dos métodos de análises. Nos dias de hoje, são estes os analisadores mais utilizados nos laboratórios, principalmente naqueles que possuem uma alta demanda de amostras.

Uma comparação entre estes dois tipos de analisadores permite afirmar que os discretos possibilitam a determinação de várias espécies em uma amostra de forma simples e rápida, consomem menos reagentes e amostras, diminuem o risco de intercontaminação das amostras e são mais versáteis, isto é, possibilitam que sejam adaptados de acordo com as finalidades desejadas sem necessidade de muitas alterações. Entretanto, possuem as desvantagens de serem mecanicamente mais complexos e mais caros, de não permitirem a incorporação de métodos de separação e, apesar da versatilidade, de serem construídos com uma configuração básica rígida, a qual dificulta o uso destes analisadores em pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de metodologias automáticas, caso não se disponha da infra-estrutura necessária para se trabalhar com os avanços da microeletrônica e da micromecânica [140].

A área de análises clínicas, certamente, foi a que mais se beneficiou com o desenvolvimento dos métodos automáticos. Sob outro ponto de vista, talvez a química clínica, pela alta demanda, tenha suscitado boa parte deste desenvolvimento. Prova disto é o analisador contínuo de Skeggs [93] que, se não foi o pioneiro, trouxe importantes avanços para a automação em química analítica. Os analisadores contínuos segmentados (ou analisadores de fluxo contínuo, como recomendado pela IUPAC) foram intensamente utilizados pelos

laboratórios de análises clínicas. Contudo, apesar de mais simples, os sistemas FIA não conseguiram nestes laboratórios um espaço condizente com suas potencialidades. A propósito, Rocks [142] tem criticado seriamente estes sistemas com relação ao grande volume de amostra requerido para uma determinação (incluindo a lavagem da alça de amostragem), aos vazamentos e desgaste da válvula amostradora e à necessidade, não rara, de se realizar uma pré-diluição do sangue antes da sua injeção no analisador.

Recentemente, os laboratórios que possuem alta demanda de amostras, tanto clínicos como de controle ambiental, têm substituído os analisadores contínuos pelos discretos. Esta tendência existe porque os analisadores discretos podem incorporar um mecanismo de acesso aleatório que permite tanto realizar apenas as determinações de interesse (consumindo menos amostra, reagentes e tempo) como iniciar a análise de uma amostra mesmo se o instrumento estiver em uma operação de rotina [143].

Em vista do grau de complexidade e da dificuldade de construção, os analisadores discretos empregados nestes laboratórios são fabricados por grandes empresas, que possuem a devida infra-estrutura [144]. Neste sentido, vários trabalhos relacionados com avaliações dos desempenhos destes instrumentos são encontrados na literatura [145-147]. Ao contrário, os analisadores contínuos, principalmente os baseados em sistemas FIA, por serem bastante simples, são de fácil desenvolvimento. Portanto, vários trabalhos têm sido descritos na literatura, envolvendo tanto sistemas mecanizados, que empregam um sistema mínimo de computador no controle das operações [148,149], como automáticos, que utilizam um microcomputador para o controle do sistema e aquisição e tratamento dos dados [150-153].

Os analisadores FIA automáticos são, em princípio, mais simples de serem implementados que os monossegmentados, pois processam as

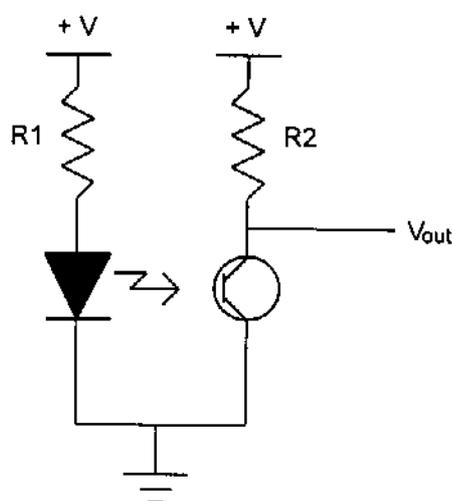
amostras individualmente. Como consequência, o "software" de controle do instrumento deve ser escrito de forma a associar uma determinada injeção com a respectiva leitura do sinal. Por outro lado, um analisador monossegmentado comporta diversas amostras em seu reator e, como discutido no capítulo IV, não existe relação aparentemente direta com a injeção da amostra e aquisição de dados. Portanto, em um analisador automático deste tipo é fundamental que uma amostra seja facilmente localizada, para que o microcomputador possa controlá-lo. Como a amostra pode ser inserida nestes sistemas entre duas bolhas de ar, a detecção destas permite localizar a amostra para a adição de reagentes e leitura do sinal, como será descrito a seguir.

## **VI.1. Implementação do Analisador**

O analisador foi construído através do desenvolvimento das suas três unidades fundamentais: válvula amostradora, módulo de adição de reagentes (ambos automáticos) e sistema de detecção, no qual foi utilizado o espectrofotômetro multicanal descrito anteriormente.

A principal preocupação durante o seu desenvolvimento foi garantir que, uma vez estando a amostra na cela, a detecção fosse efetuada imediatamente, minimizando os riscos de perda de dados, o que inviabilizaria uma análise. Portanto, na construção do instrumento vários controles e/ou tarefas foram implementados por "hardware" (por exemplo, retorno da válvula amostradora para a posição de amostragem e adição de reagentes ao monossegmento), liberando o microcomputador para gerar o sinal de injeção da amostra e para, principalmente, efetuar a aquisição e tratamento de dados.

O controle do instrumento (localização da amostra e da posição da válvula amostradora) foi efetuado basicamente através do uso de sensores ópticos (PCST 2103), cujos sinais lógicos gerados podiam ser acessados pelo microcomputador. Um sensor óptico é um dispositivo formado por um diodo emissor de luz infravermelha (LED), que tem um fototransistor acoplado como detector. A Figura VI.1 mostra o circuito básico que permite a extração de sinais de um destes sensores. Quando o LED e o coletor do fototransistor são alimentados com +5 V, sinais lógicos ( $V_{out}$ ) podem ser diretamente obtidos, se os valores dos resistores  $R_1$  e  $R_2$  forem adequados. Neste caso, a diferença de potencial de saída corresponderá a um nível lógico alto (+5 V) TTL ou CMOS, quando o caminho entre o LED e o fototransistor estiver interrompido e a um nível lógico baixo quando o caminho estiver aberto.



**Figura VI.1.** Circuito eletrônico básico para extração de sinais de um sensor óptico.

Estes sensores ópticos podem também ser utilizados para detectar uma interface água/ar (ou solução/ar) em um tubo de vidro ou PTFE, isto é, podem detectar as bolhas de ar do monossegmento, localizando a amostra. O

circuito eletrônico mostrado na Figura VI.1 não pode ser empregado diretamente pois as transições água/solução não geram sinais lógicos, necessitando, portanto, de algumas modificações que serão detalhadas em seção posterior.

### **VI.1.1. Válvula Amostradora Automática**

A válvula amostradora, esquematizada na Figura VI.2, foi construída empregando-se um injetor proporcional como o descrito por Bergamin e colaboradores [96], através do acoplamento de um motor de passo (24 V, 1 A, 7,5º/passo) à sua barra central deslizante. O circuito eletrônico desenvolvido para o controle e o acionamento deste motor encontra-se no Apêndice VIII.5. Entretanto, o motor pode ser também movimentado através do microcomputador, procedimento que é necessário no início de operação do analisador para o posicionamento correto da válvula. As posições de amostragem e injeção desta válvula foram determinadas com o uso dos sensores ópticos "opto A" e "opto I", respectivamente.

A injeção da amostra é efetuada através de um sinal lógico enviado pelo microcomputador\*, habilitando o circuito eletrônico para gerar os pulsos que acionam o motor. A comutação da válvula ocorre em aproximadamente 400 ms. Quando esta atinge a posição de injeção ("opto I" é interrompido pela haste), o funcionamento do motor é interrompido e o circuito preparado para acioná-lo no sentido inverso. O sensor óptico "opto R" verifica quando todo o monossegmento foi injetado pela passagem da sua primeira bolha de ar. Ao final desta, isto é, na interface ar/amostra, o "opto R" gera um

---

\* o sinal lógico também pode ser gerado através de um contato mecânico, possibilitando o uso da válvula amostradora em um analisador não-automático.

outro sinal lógico que aciona novamente o motor de passo, retornando a válvula para a posição de amostragem. Por sua vez, o "opto A" interrompe o motor, preparando-o para ser acionado no sentido inverso.

O "opto R" pode ser posicionado no início do reator de acordo com o tamanho do monossegmento (amostra e bolhas de ar), garantindo que o motor de passo seja acionado tão logo a injeção seja completada. O emprego deste sensor óptico simplifica a operação da válvula amostradora, pois o momento de retorno para a posição inicial independe da vazão do fluido transportador, o que não ocorreria se isto fosse efetuado com base no tempo. Além do mais, este sensor também facilita o gerenciamento do sistema pelo microcomputador, que tem a tarefa de apenas determinar o momento da injeção da amostra.

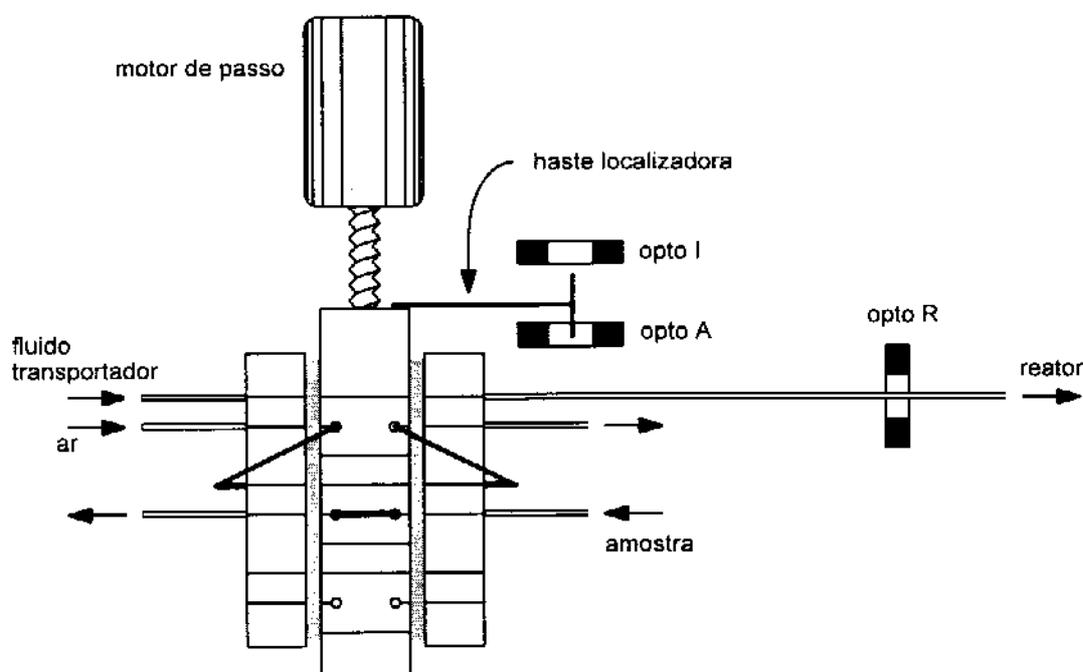


Figura VI.2. Diagrama esquemático da válvula amostradora automática (posição de amostragem).

## VI.1.2. Módulo Automático de Adição de Reagentes

O módulo foi desenvolvido para que a adição de reagentes à amostra fosse efetuada apenas no monossegmento, sendo mantidas as características do trabalho original [94], isto é, amostra e reagentes contidos apenas no espaço delimitado pelas duas bolhas de ar. Este módulo consiste em um ponto de adição de reagente situado entre dois sensores ópticos, uma microválvula solenóide de três vias (12 V, 80 mA) e um circuito eletrônico capaz de extrair os sinais lógicos dos sensores e acionar a válvula durante a passagem do monossegmento.

O ponto de adição, mostrado na Figura VI.3, foi feito através da inserção de uma agulha de seringa hipodérmica, cuja ponta foi previamente lixada, em um tubo de PTFE de 1,6 mm de diâmetro interno e posteriormente fixada em um bloco de resina poliéster. A inserção de várias agulhas próximas uma das outras, fixadas em um mesmo bloco, permite que vários reagentes sejam adicionados em um mesmo ponto (por exemplo, a Figura VI.3 mostra um ponto de adição para até dois reagentes).

A Figura VI.4 mostra um diagrama esquemático do módulo, indicando a posição dos sensores ópticos com relação ao ponto de injeção. Os sensores foram separados por uma distância de 45 mm (centro a centro), que é equivalente a um volume de aproximadamente 90  $\mu\text{L}$  para o tubo de PTFE usado e uma (ou mais) agulha para adição do reagente foi colocada a 10 mm do centro do primeiro sensor (opto 1). Obviamente, à cada agulha deve estar associada uma válvula solenóide para a adição do reagente.

Os circuitos eletrônicos analógicos e digitais para extração de sinais dos sensores ópticos e para o acionamento da válvula solenóide são mostrados no Apêndice VIII.6.

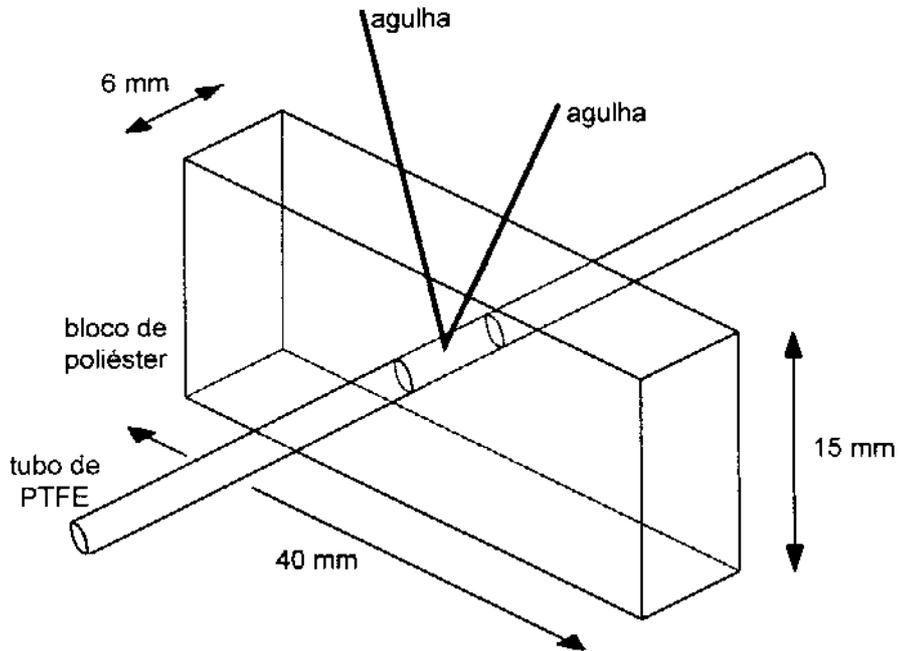


Figura VI.3. Desenho em perspectiva do "ponto" de adição de reagentes.

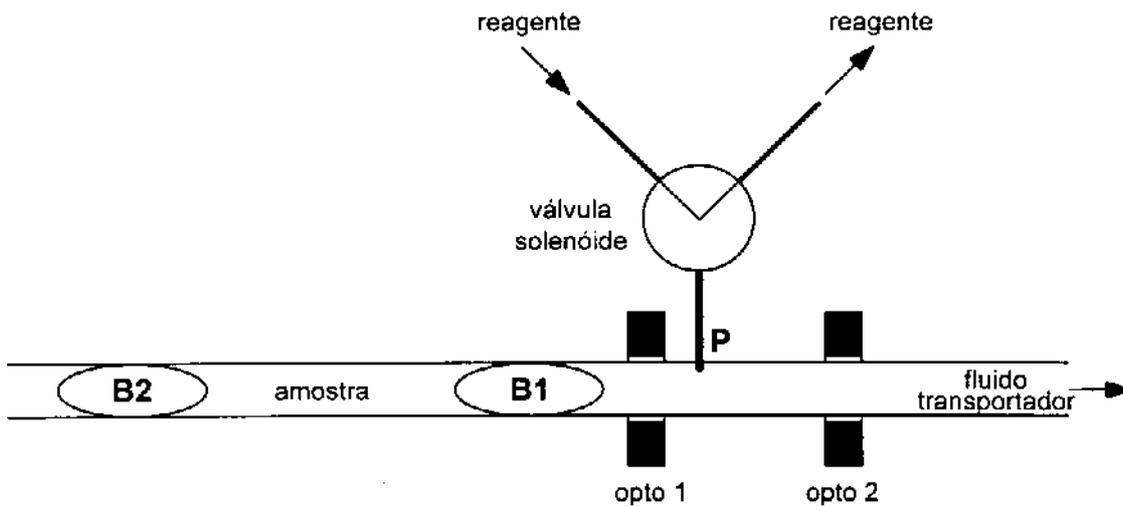


Figura VI.4. Diagrama esquemático do módulo de adição de reagentes (o ponto P mostra apenas uma agulha).

A passagem das bolhas de ar pelos sensores determina o funcionamento do módulo. Quando a bolha frontal (B1) do monossegmento atinge o segundo sensor óptico (opto 2), a válvula solenóide é automaticamente acionada, adicionando reagente à amostra. Quando a segunda bolha (B2) atinge o primeiro sensor óptico (opto 1), a válvula é automaticamente desligada. Nada ocorre quando a primeira bolha de ar passa pelo "opto 1" e a segunda passa pelo "opto 2". Todos estes eventos ocorrem independentemente do microcomputador, que tem as tarefas de, antes da realização de uma determinação, reinicializar o circuito eletrônico ("reset") para que funcione da forma como descrito e selecionar quais válvulas deverão ser acionadas. Por exemplo, o módulo da Figura VI.3 pode ser usado para a adição de um ou dois reagentes; se apenas um for selecionado para adição, o outro circulará pela bomba peristáltica e retornará para o frasco. Estas operações de "reset" e seleção também podem ser efetuadas, como no caso da válvula amostradora, através de chaves, tornando este módulo independente do microcomputador e possibilitando o seu uso em um analisador monossegmentado não-automático.

A principal limitação deste módulo está relacionada à formação de pequenas bolhas de ar no analisador e suas passagens pelos sensores ópticos, eliminando o sincronismo da adição de reagentes. Este problema foi suplantado incorporando-se ao circuito eletrônico (Apêndice VIII.6) um dispositivo que torna lenta a transição entre os níveis lógicos dos sensores, possibilitando que ela ocorra somente se a troca de ar por solução (e vice-versa) permanecer por um determinado período de tempo. Desta forma, estes dispositivos tornam-se insensíveis à uma pequena bolha ou, analogamente, à uma pequena porção de solução no meio de uma bolha de ar. Naturalmente, esta imunidade depende não só do tamanho da bolha espúria mas também da vazão do fluido transportador e, por estas razões, o "atraso" na resposta do sensor pode ser

regulado, no próprio circuito eletrônico, em função destas duas variáveis. Finalmente, para que fosse evitada a adição de reagentes à segunda bolha de ar do monossegmento por causa deste "atraso", foi necessário afastar a agulha hipodérmica do primeiro sensor óptico, como mostrado na Figura VI.4.

### **VI.1.3. Sistema de Detecção**

O sistema de detecção do analisador de fluxo monossegmentado é constituído pelo espectrofotômetro multicanal descrito anteriormente, por uma cela de fluxo e por um sensor óptico que indica o momento para a aquisição de dados, isto é, quando a cela está preenchida com a amostra.

A cela de fluxo, mostrada na Figura VI.5, foi construída a partir de uma barra de PTFE grafitado (diâmetro de 25 mm), de maneira semelhante à descrita por Tubino [154]. Esta cela possui janelas de acrílico (espessura de 1,0 mm), o qual é transparente à radiação visível [155], possuindo, ainda, a vantagem de minimizar a dispersão pois sua molhabilidade por soluções aquosas é pequena. O caminho óptico tem 5 mm de comprimento, com um diâmetro de 1,6 mm (igual ao diâmetro interno do tubo de PTFE).

O sensor óptico do sistema foi colocado após a cela de detecção, a uma distância sempre determinada em função dos volumes da primeira bolha de ar e da amostra do monossegmento. Este posicionamento foi efetuado de forma que a parte central do monossegmento estivesse dentro da cela quando a primeira bolha atingisse o sensor óptico, cujo circuito eletrônico para a extração de sinais (idêntico ao descrito para o módulo de adição de reagentes, incluindo o "atraso" na resposta) e para a identificação das bolhas de ar é mostrado no Apêndice VIII.7. No decorrer de uma determinação, o microcomputador pode

verificar quase que continuamente o nível lógico gerado pelo sensor óptico (ar ou solução), podendo, ainda, discernir quais das bolhas de ar do monossegmento o atingiu. Caso seja a primeira bolha, a cela está preenchida com a amostra e a aquisição de dados pode ser efetuada.

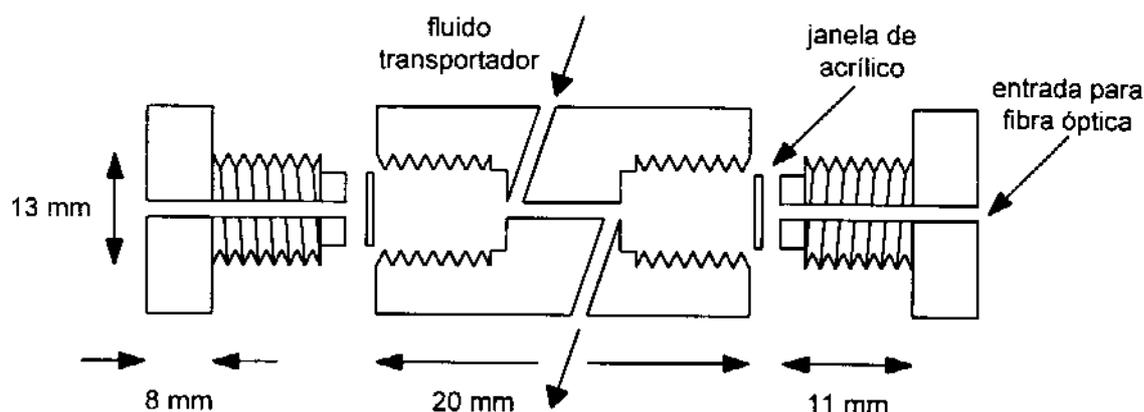


Figura VI.5. Corte lateral da cela de fluxo do analisador.

#### VI.1.4. Descrição Geral do Analisador: "hard" e "software"

O analisador automático de fluxo monossegmentado foi construído conforme o diagrama mostrado na Figura VI.6. Embora não esteja indicado nesta figura, para preservar a clareza do diagrama, a interface pode acionar tanto a bomba peristáltica como a válvula amostradora e tem acesso a todos os sensores ópticos do analisador. Neste diagrama, pelo mesmo motivo, não estão constando as válvulas solenóides dos módulos de adição 1 e 2, os quais podem adicionar até três e dois reagentes, respectivamente. O primeiro sensor óptico do módulo de adição 1 foi também empregado para gerar o sinal lógico de retorno da válvula amostradora para a posição de amostragem.

O controle do instrumento foi efetuado com um microcomputador padrão IBM-AT 386SX, através de uma porta do usuário (Apêndice VIII.9) baseada no CI 8255 [156], que se comunica com a interface paralela de 8 bits\*. Esta interface foi construída em função das operações desempenhadas pelo analisador, mas possui um padrão de comunicação (decodificação de endereços) básico, cujos detalhes também são mostrados no Apêndice VIII.10.

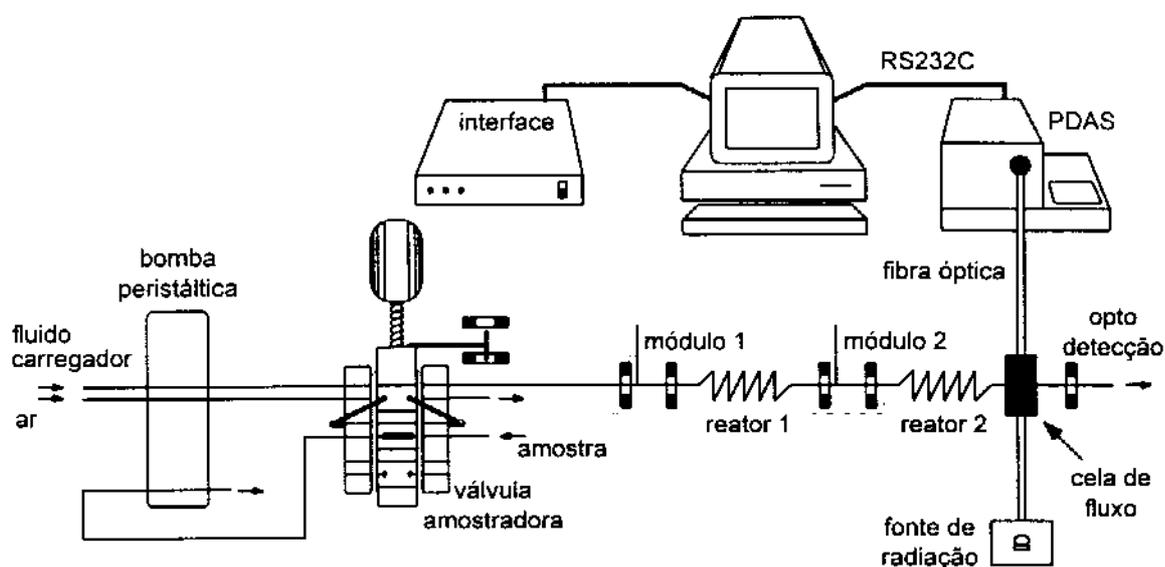


Figura VI.6. Diagrama esquemático do analisador de fluxo monossegmentado.

O programa computacional do analisador foi escrito em QuickBasic 4.5 (Apêndice VIII.11), contendo instruções para acionamento da bomba peristáltica, válvula amostradora e módulos de adição e para controle do espectrofotômetro multicanal. No entanto, as vazões do fluido transportador e reagentes, isto é, a velocidade da bomba peristáltica não pode ser controlada por "software". Este programa permite que os procedimentos preliminares para acerto do analisador, tais como preenchimento do reator com o fluido

\* O controle do espectrofotômetro foi realizado através de uma porta de comunicação serial RS232C, como descrito no capítulo III, seção III.1.2.1.

transportador e dos módulos de adição com os reagentes e posicionamento da válvula amostradora, sejam efetuados no início da operação do instrumento.

Com relação aos parâmetros de análise, o programa deve ser alimentado com o nome da espécie a ser determinada, número de padrões (3 a 7) e respectivas concentrações, número de replicatas (1 a 3), reagentes a serem adicionados (até 3 no primeiro ponto de adição e até 2 no segundo), largura de banda (1, 2 ou 3 nm) e comprimento de onda (nm) a serem monitorados.

O controle do espectrofotômetro foi efetuado de maneira similar à descrita no capítulo II desta tese, empregando-se o mesmo programa escrito em Assembler 8085 (Apêndice VIII.3). Entretanto, no desenvolvimento do programa em QuickBasic, a escolha do número de varreduras completas (1 a 5) para obtenção de um espectro como média foi mantida, mas a transferência dos dados do sistema mínimo para o microcomputador foi limitada apenas aos diodos de interesse. A partir do comprimento de onda escolhido pelo usuário e dos dados de calibração do espectrofotômetro (dispersão linear e faixa de comprimento de onda monitorada), o microcomputador externo pode determinar o diodo em questão e, tendo este diodo como elemento central, a transferência dos sinais relativos a 3, 5 ou 9 diodos pode ser efetuada em função das larguras de banda de 1, 2 ou 3 nm, respectivamente, uma vez que a dispersão linear do espectrofotômetro é de  $0,384 \text{ nm diodo}^{-1}$ . A intensidade correspondente a um determinado comprimento de onda é, portanto, obtida através da média sem peso dos sinais dos diodos, em adição à média de varreduras efetuada na aquisição de um espectro. Tanto as intensidades dos sinais como os parâmetros empregados em uma determinação são armazenados no microcomputador principal em arquivos determinados pelo usuário.

No início de uma determinação, o programa requisita que uma medida de referência seja efetuada para o processamento dos sinais. Isto feito,

o programa indica a solução (padrão ou amostra) que deve ser apresentada para injeção no analisador. O processamento dos dados é feito em tempo real e os resultados mostrados no monitor de vídeo do computador. Uma curva de calibração é construída com os valores de absorbância dos padrões e, após a detecção do último padrão, o ajuste da curva é efetuado pelo método dos mínimos quadrados e os valores da calibração apresentados (coeficientes linear, angular e de correlação). Desta forma, assim que uma amostra atinge o detector, o valor de absorbância e o de concentração, calculado a partir da calibração, são apresentados em forma de tabela. Este "relatório" mostrado no vídeo do microcomputador pode, a critério do usuário, ser enviado para uma impressora.

Os controles de injeção e detecção (padrão e amostra) são realizados através de contadores independentes, pois várias amostras podem ser processadas simultaneamente no analisador de fluxo monossegmentado. No entanto, o programa computacional não necessita do número de amostras que deverão ser analisadas, permitindo que uma determinação seja interrompida a qualquer momento. Assim, uma vez dada a instrução de interrupção, o analisador continua em operação até que a última amostra injetada atinja o detector.

## **VI.2. Soluções para Avaliação do Analisador**

As soluções de permanganato de potássio foram preparadas a partir de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, filtrada em algodão de fibra de vidro antes do uso. As soluções padrão de Cr(VI) foram preparadas na faixa de 0,200 a 1,400 mg L<sup>-1</sup>, por diluição apropriada de uma solução estoque de

1000 mg L<sup>-1</sup>. A solução de difenilcarbazida 0,25 % (m/v) foi preparada em ácido acético 25 % (v/v). Solução de ácido sulfúrico 2,0 mol L<sup>-1</sup>.

## **VI.3. Resultados e Discussão**

### **VI.3.1. Interação Instrumento-Usuário**

O programa de controle do analisador foi escrito com a mesma filosofia empregada no desenvolvimento do espectrofotômetro, onde a interação com o usuário ocorre através de menus mostrados no vídeo do microcomputador. Portanto, da mesma forma que a descrita no capítulo III, seção III.3.1, o programa computacional indica ao usuário as operações que devem ser efetuadas para que o analisador seja colocado em funcionamento, possibilitando, ainda, que o procedimento de varredura (tempo de integração constante ou variável) do arranjo de diodos seja escolhido.

Após estas operações preliminares, um menu principal é mostrado ao usuário, cujas opções permitem, como descrito, que o posicionamento da válvula amostradora seja efetuado, que o analisador e os módulos de adição sejam preenchidos, respectivamente, com fluido transportador e reagentes, que os parâmetros de análise e do espectrofotômetro sejam determinados e, finalmente, que a análise da amostra seja iniciada. Embora o preenchimento inicial do analisador com o fluido transportador possa ser feito automaticamente, a presença de bolhas de ar deve ser verificada visualmente pelo usuário e estas, se existirem, devem ser retiradas antes de se iniciar uma determinação.

Quando a análise da amostra é iniciada, um espectro de referência é requisitado pelo programa. Neste caso, a prova em branco deve ser injetada,

sendo adicionados todos os reagentes necessários para se efetuar a determinação. Quando a amostra atinge o detector, o funcionamento da bomba peristáltica é interrompido, um espectro é obtido e os valores das intensidades dos sinais dos diodos (3, 5 ou 9, dependendo da largura de banda escolhida) são mostrados na tela de vídeo. Desta forma, o usuário pode ajustar o "zero" do espectrofotômetro, variando o tempo de integração, para utilizar toda a faixa dinâmica do conversor analógico/digital (valor máximo de 255). Após a obtenção da prova em branco, os padrões e amostras são requisitados para injeção no analisador. Para garantir que as injeções sejam efetuadas em intervalos regulares, o programa produz um sinal sonoro ("bip") ininterrupto sempre que a solução tiver que ser trocada para amostragem.

Finalmente, o usuário define, antes da obtenção da prova em branco, o nome principal do arquivo, a partir do qual são criados outros, com extensões *prm*, *std* e *cfa*, onde são armazenados os parâmetros de análise, as concentrações das soluções padrão e as intensidades dos sinais obtidos, respectivamente.

### **VI.3.2. Avaliação do analisador**

Os experimentos para a avaliação do analisador foram realizados empregando-se uma configuração similar à mostrada na Figura VI.6, na qual o reator 1 foi retirado e o reator 2 consistiu de uma bobina de PTFE de 1,50 m de comprimento e 1,6 mm de diâmetro interno. A vazão do fluido transportador (água) foi fixada em  $2,00 \text{ mL min}^{-1}$ , fornecendo um tempo de residência de 90 s, após o segundo módulo de adição de reagentes. As bolhas de ar anterior e posterior à amostra do monossegmento foram de 90 e 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

A principal limitação do analisador, como citado anteriormente, está relacionada com a presença de pequenas bolhas de ar dentro do reator, as quais podem tanto eliminar o sincronismo do módulo de adição de reagentes como causar um erro na contagem de amostras que atingem o detector. Desta forma, as sensibilidades dos sensores ópticos do analisador foram ajustadas, em função da vazão do fluido transportador ( $2,00 \text{ mL min}^{-1}$ ), tornando-os imunes às bolhas de até  $20 \mu\text{L}$ . Eventualmente, uma destas pequenas bolhas pode ficar presa na cela de detecção, mas, na maioria das vezes, é facilmente carregada pelas bolhas maiores do monossegmento.

Em algumas circunstâncias pode ficar difícil avaliar o desempenho do analisador isoladamente do espectrofotômetro multicanal empregado como detector. Neste sentido, inicialmente foram realizados alguns experimentos para a verificação do comportamento do módulo de adição de reagentes na ausência de reações químicas, com o mesmo fotômetro empregado no estudo da dispersão em MSFA [139], cujo sinal foi enviado a um registrador potenciométrico. A Tabela VI.1 mostra os resultados obtidos pela adição de uma solução de permanganato de potássio  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  à um monossegmento de  $300 \mu\text{L}$  de água, quando foram utilizadas diferentes vazões para o reagente. A mistura do reagente à amostra deve ocorrer conforme o modelo descrito na Figura V.2 ("bolus flow") e, visualmente, pode ser observada a homogeneidade da solução resultante, a qual foi confirmada pelo registro de um sinal similar ao mostrado na Figura V.3. O gráfico da altura do sinal analítico em função da vazão do reagente, mostrado na Figura VI.7, é linear até uma concentração de permanganato de potássio igual a  $2,19 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  ( $r = 0,9990$ ), sendo que o desvio ocorrido pode ser atribuído ao fotômetro empregado.

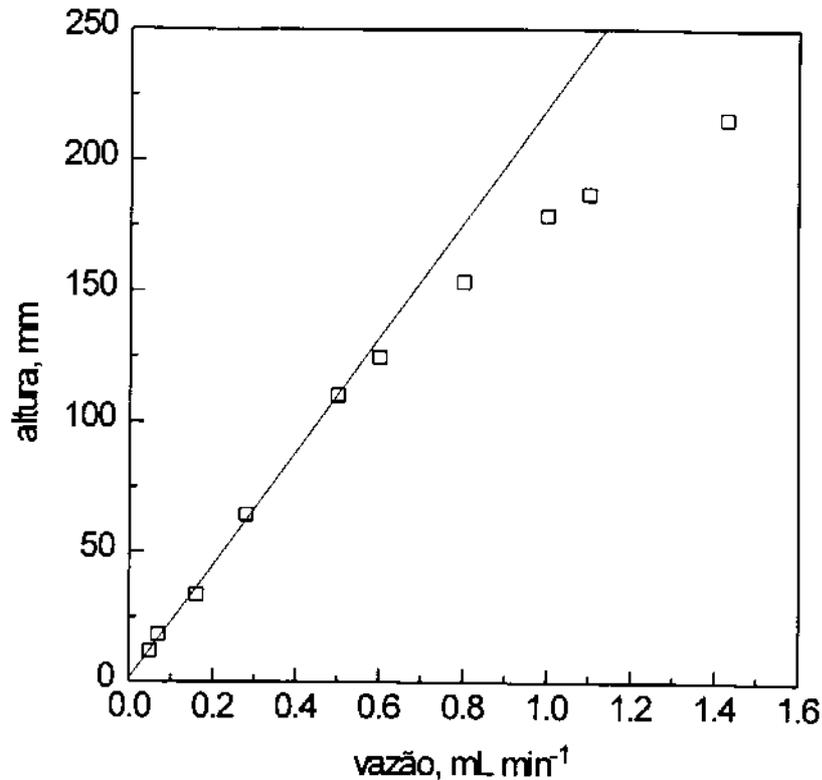
**Tabela VI.1.** Resultados obtidos com a adição de uma solução de permanganato de potássio  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a um monossegmento de  $300 \mu\text{L}$  de água (vazão do fluido transportador =  $2,00 \text{ mL min}^{-1}$ ).

vazão ( $\text{mL min}^{-1}$ )	altura (mm)*	$V_{\text{ad}}$ ( $\mu\text{L}$ )**	$C \times 10^4$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )**
0,05	$11,7 \pm 0,6$	8,4	0,27
0,07	$18,1 \pm 0,3$	11,8	0,38
0,16	$33,6 \pm 1,9$	27,0	0,83
0,28	$64,3 \pm 1,5$	47,2	1,36
0,50	$110,1 \pm 1,1$	84,3	2,19
0,60	$124,5 \pm 0,9$	101,1	2,52
0,80	$153,3 \pm 2,0$	134,8	3,10
1,00	$178,7 \pm 2,1$	168,5	3,60
1,10	$187,0 \pm 2,3$	185,4	3,82
1,43	$215,8 \pm 1,6$	241,0	4,45

(\*) média de 5 determinações  $\pm$  estimativa do desvio padrão.

(\*\*) o volume adicionado de  $\text{KMnO}_4$  e a concentração final da solução foram estimados a partir do tempo no qual a válvula solenóide permanecia aberta para a adição do reagente (10,1 s).

O desempenho do analisador foi também avaliado através da reação de cromo (VI) com difenilcarbazida (DFC) em meio ácido. As concentrações dos reagentes (DFC 0,25 % e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e suas respectivas vazões ( $0,07$  e  $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ ) foram determinadas a partir do método manual [157] e da vazão do fluido transportador ( $2,00 \text{ mL min}^{-1}$ ). Os monossegmentos contendo  $300 \mu\text{L}$  de solução padrão foram injetados a uma frequência de  $60 \text{ amostras h}^{-1}$  e as soluções de ácido sulfúrico e DFC adicionadas consecutivamente através dos dois módulos de adição. O espectrofotômetro multicanal foi empregado como detector e as medidas de absorvância, em  $540 \text{ nm}$ , foram obtidas a partir da média das intensidades dos



**Figura VI.7.** Curva obtida com a adição de uma solução de  $\text{KMnO}_4$   $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em um monossegmento de  $300 \mu\text{L}$  de água.

sinais de 5 varreduras. A Tabela VI.2 mostra os resultados de uma calibração, cujas medidas foram efetuadas em triplicata, empregando-se uma largura de banda de 3 nm (isto é, média de 9 diodos).

Os resultados mostrados nesta tabela indicam que, nas condições empregadas, não existe intercontaminação significativa entre as amostras, comprovada pela injeção de uma prova em branco após o padrão de Cr(VI) de  $1,400 \text{ mg L}^{-1}$ . A precisão das medidas de absorvância, avaliada pelas estimativas dos desvios padrão, concorda com a obtida na avaliação do espectrofotômetro na ausência de reações (capítulo III, seção III.3.2), atestando o bom desempenho do analisador. A curva de calibração construída com os dados da Tabela VI.2 (excetuando-se a prova em branco) se mostrou linear até

pelo menos  $1,400 \text{ mg L}^{-1}$  ( $r = 0,9997$ ), com coeficientes linear e angular iguais a 0,0078 e 0,2880, respectivamente. A sensibilidade e a linearidade obtidas concordam com aquelas obtidas por Pasquini [120], em um analisador monossegmentado não-automático. As curvas de calibração obtidas através de um única injeção dos padrões e/ou através das medidas de absorbância com uma largura de banda de 1 nm (média de 3 diodos) não apresentaram diferenças significativas da curva aqui descrita.

**Tabela VI.2.** Valores de absorbância obtidos na reação de soluções padrão de Cr(VI) com DFC em meio ácido.

<b>C (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A(média) ± s</b>
<b>0,200</b>	0,0599	0,0608	0,0626	$0,0611 \pm 0,0014$
<b>0,400</b>	0,1242	0,1250	0,1235	$0,1242 \pm 0,0008$
<b>0,600</b>	0,1815	0,1827	0,1835	$0,1826 \pm 0,0010$
<b>0,800</b>	0,2381	0,2408	0,2409	$0,2399 \pm 0,0015$
<b>1,000</b>	0,2991	0,2993	0,2991	$0,2992 \pm 0,0001$
<b>1,200</b>	0,3479	0,3578	0,3551	$0,3536 \pm 0,0051$
<b>1,400</b>	0,4073	0,4046	0,4088	$0,4069 \pm 0,0021$
<b>0,000</b>	0,0006	0,0008	0,0034	$0,0016 \pm 0,0016$

A injeção de 300  $\mu\text{L}$  de amostra, como efetuada no experimento descrito, consumiu 7,5  $\mu\text{L}$  da solução de ácido sulfúrico e 12  $\mu\text{L}$  da solução de DFC. Por outro lado, quando apenas 100  $\mu\text{L}$  de amostra foram injetados, o consumo destes reagentes diminuiu para 2,5 e 4,0  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Entretanto, a sensibilidade permaneceu constante apesar destas alterações e a estimativa do desvio padrão das medidas de absorbância para a injeção de 10 replicatas de uma solução de Cr(VI) de  $1,000 \text{ mg L}^{-1}$  aumentou de 0,0016 para 0,0031. O fato da sensibilidade obtida ser independente do volume de amostra

injetado é consequência da adição de reagentes ocorrer somente na amostra do monossegmento. A quantidade adicionada de reagente é sempre proporcional ao tamanho da amostra, sendo que a adição é efetuada a uma razão determinada apenas pelas vazões do fluido transportador e reagentes. Naturalmente, é esperado que a precisão das medidas seja prejudicada com a diminuição do volume da amostra. Apesar da baixa molhabilidade dos materiais do analisador (PTFE e acrílico das janelas da cela de detecção), existem conexões que possuem um pequeno volume morto, onde o fluido transportador e a amostra podem ficar estagnados, necessitando, portanto, de uma "etapa" de limpeza que compromete a precisão das medidas quando o volume de amostra é diminuído.

Finalmente, a frequência de amostragem foi aumentada para 120 h<sup>-1</sup> e as vazões do fluido transportador e reagentes foram dobradas, pela alteração da velocidade da bomba peristáltica. A curva de calibração obtida através da injeção de 100 µL das soluções padrão de Cr(VI) apresentou a mesma sensibilidade que as anteriores e a injeção de 10 replicatas de um padrão contendo 1,000 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) forneceu uma estimativa de desvio padrão de 0,0051. Novamente a sensibilidade não foi alterada, pois a proporção na qual ocorreu a mistura de amostra e reagentes foi mantida constante e o tempo de permanência da amostra no analisador foi suficiente para que a reação se completasse.

## **VI.4. Conclusões**

O analisador automático de fluxo monossegmentado desenvolvido apresentou um bom desempenho, trazendo novas perspectivas para a MSFA.

de adição e que os módulos utilizados possam ser reinicializados individualmente.

Finalmente, o bom desempenho do analisador é fundamentado na estabilidade do monossegmento. Neste aspecto, o uso de reatores de PTFE na análise de amostras aquosas com baixa viscosidade parece garantir esta estabilidade, contribuindo, ainda, para uma pequena dispersão da amostra, minimizando uma possível intercontaminação.

Provavelmente a mais significativa destas perspectivas seja a possibilidade de se realizar reações sequenciais, sem descaracterizar o monossegmento, uma vez que os reagentes são adicionados apenas à amostra.

O módulo automático de adição de reagentes trouxe uma série de vantagens ao analisador construído. Como discutido, a sensibilidade se tornou independente do volume de amostra injetado, sendo determinada apenas pela razão das vazões do reagente e do fluido transportador. Além do mais, este módulo permite que o consumo de reagentes seja menor que nos outros sistemas de análises em fluxo, pois não são continuamente adicionados ao analisador. Entretanto, traz como desvantagens a necessidade de se empregar reagentes com concentrações relativamente altas e vazões bastante baixas. Em primeiro lugar, o reagente deve ser adicionado à uma vazão baixa para que não seja alterado de forma significativa o tempo de residência da amostra no analisador, principalmente nos casos em que a reação não se completa. Como consequência, devem ser empregadas soluções reagentes com altas concentrações, que podem comprometer a durabilidade dos cabos de bombeamento e que, em casos especiais, podem ser limitadas pelas solubilidades destes reagentes.

O desempenho do analisador pode ser melhorado através da utilização tanto de uma bomba peristáltica cuja velocidade possa ser controlada pelo microcomputador como de um amostrador automático. A experiência adquirida com a construção e a operação deste analisador, permite afirmar que o desempenho também pode ser melhorado com o desenvolvimento de um programa computacional capaz de realizar o ajuste automático da prova em branco e com a construção de outro circuito eletrônico, onde o sensor óptico empregado para retorno da válvula de injeção seja separado do primeiro módulo

## VII. APLICAÇÃO DO ANALISADOR A AMOSTRAS DE INTERESSE CLÍNICO

---

O analisador automático de fluxo monossegmentado foi aplicado à determinação de glicose, creatinina e uréia em amostras de plasma ou soro sanguíneos\*. A escolha recaiu sobre estas substâncias pois, certamente, constam na maioria dos pedidos de exames médicos. Por exemplo, o Serviço de Bioquímica Clínica do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital da UNICAMP realiza, mensalmente, cerca de 50000 determinações (envolvendo 22 substâncias), das quais 7000 são de glicose, 5500 de uréia e 7000 de creatinina, o que significa aproximadamente 40 % de toda a demanda.

Para que o analisador se tornasse um instrumento dedicado às determinações das referidas substâncias, foram necessárias algumas modificações no programa computacional, nos reatores e no sistema de amostragem.

No programa computacional, os procedimentos para a operação do analisador foram mantidos da mesma forma como a descrita no capítulo VI. Entretanto, o programa foi modificado com relação aos parâmetros de análise, sendo, neste caso, apenas necessário que o operador indique qual a substância a ser determinada (dentre as 3 mostradas no monitor), para que, automaticamente, sejam definidos pelo microcomputador o comprimento de onda a ser monitorado e os reagentes a serem adicionados. O programa deve ser alimentado, como anteriormente, com o número de padrões e respectivas concentrações, número de replicatas e largura de banda a ser monitorada.

---

\* o plasma é um fluido claro e amarelado obtido através da centrifugação do sangue total, ao qual foi previamente adicionado um anti-coagulante. O soro sanguíneo é o fluido obtido a partir da coagulação do sangue total e diferencia-se do plasma devido a ausência de fibrinogênio e proteínas da coagulação [158].

Os reatores de PTFE foram trocados por outros de vidro, uma vez que os monossegmentos contendo amostras de soro ou plasma não se mantiveram estáveis com o uso do primeiro material. Este fato pode ser explicado pela qualidade das amostras analisadas, que possuem grandes quantidades de proteínas, cujas interações com uma superfície hidrofóbica (PTFE) são maiores que com uma hidrofílica (vidro).

Finalmente, foi incorporado à válvula amostradora um sistema de diluição. Este procedimento de diluição foi necessário pois além das substâncias a serem determinadas estarem em altas concentrações no sangue, os métodos de determinação empregados são relativamente sensíveis. Além disto, não haveria muito sentido em se desenvolver um analisador capaz de processar 90 amostras por hora, as quais deveriam ser diluídas manualmente.

## **VII.1. Sistema de Diluição**

Os sistemas em fluxo possibilitam o desenvolvimento de métodos de análise bastante rápidos, pois empregam altas frequências de amostragem, normalmente da ordem de 120 a 240 h<sup>-1</sup>. Entretanto, esta rapidez nas análises não inclui as etapas prévias de tratamento da amostra, onde um procedimento de diluição pode ser necessário.

Na análise por injeção em fluxo, a diluição da amostra ocorre devido a sua dispersão no fluido transportador. Os processos mais simples consistem na diminuição do volume de amostra injetada e no aumento do diâmetro e/ou comprimento do tubo do reator. Entretanto, a dispersão conseguida desta maneira, com a conseqüente diluição, pode não ser suficiente para ajustar o sinal analítico de amostras relativamente concentradas. Neste

sentido, vários procedimentos têm sido descritos na literatura para se realizar diluições em analisadores FIA, os quais incluem sistemas em confluência [149], de reamostragem da zona dispersa [159,160], com divisão de fluxo [151,161], com bombeamento diferencial [162], de diluição em cascata [163], com pré-válvula [164], de diálise [165] e de diluição eletrônica [166].

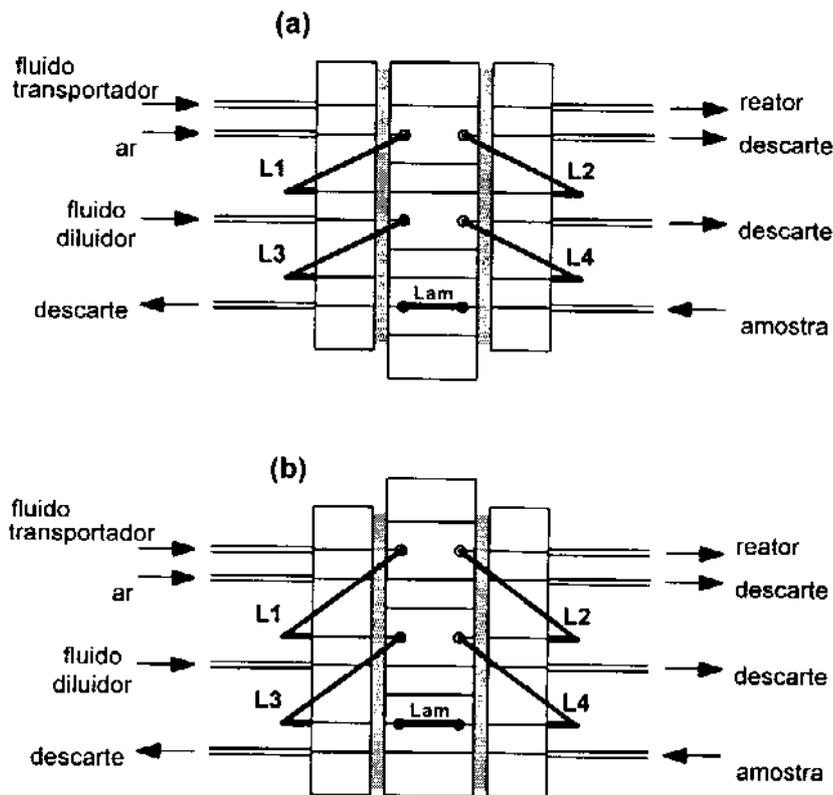
Estes procedimentos de diluição utilizados nos sistemas FIA estão baseados em gradientes de concentração, gerados através da injeção da amostra e/ou padrão em um fluido transportador. Todavia, estes gradientes são, até o momento, incompatíveis com os analisadores de fluxo monossegmentado, nos quais a amostra permanece entre duas bolhas de ar, em uma solução praticamente homogênea, sofrendo uma dispersão mínima. Ademais, o uso de configurações simples para a diluição de amostras em fluxo, tais como os sistemas em confluência, é inviável pois destroem a integridade do monossegmento. Neste sentido, foi desenvolvido um procedimento de diluição em sistemas de fluxo monossegmentado, que emprega uma válvula amostradora de 3 canais [96] e que permite que a diluição seja efetuada simultaneamente com a injeção da amostra, sem a necessidade de se gerar gradientes de concentração.

### **VII.1.1. Descrição do Sistema**

O sistema de diluição desenvolvido utiliza mais duas alças, semelhantes às de ar, que contêm o fluido diluidor. A Figura VII.1 mostra um diagrama da configuração necessária para que seja efetuada esta diluição.

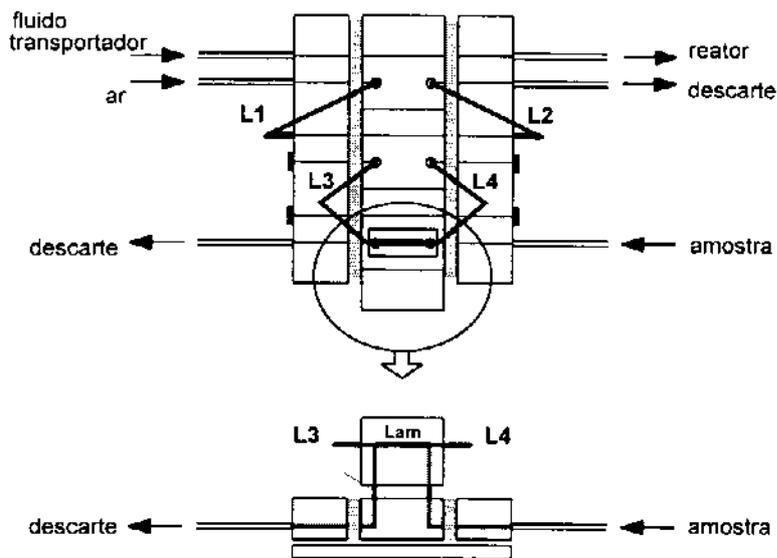
Com a válvula amostradora na posição de amostragem, as alças L1 e L2, as alças L3 e L4 e a alça Lam são preenchidas com ar, fluido diluidor e

amostra, respectivamente. Quando a válvula é comutada para a posição de injeção, o fluido transportador conduz o monossegmento constituído de ar/fluido diluidor/amostra/fluido diluidor/ar (L2/L4/Lam/L3/L1, nesta ordem) para o reator do analisador. O fluido transportador também pode ser utilizado para a diluição da amostra e, neste caso, a entrada do fluido diluidor e a respectiva saída para descarte podem ser fechadas. Embora pareça ser um cuidado desnecessário, principalmente se tubos de PTFE forem empregados, a alça de amostragem pode ser limpa com maior eficiência caso a alça de diluição L4 seja a menor possível. Desta forma, as escolhas dos volumes das alças de diluição L3 e de amostragem Lam podem ser feitas de acordo com a diluição desejada.



**Figura VII.1.** Diagrama do sistema de diluição com amostragem convencional: válvula nas posições de (a) amostragem e (b) injeção.

O volume da alça de amostragem Lam é também determinado pelo "volume morto" do injetor proporcional, isto é, o volume devido às perfurações efetuadas para a conexão dos tubos de PTFE. Em algumas circunstâncias este volume é relativamente alto e uma diluição significativa pode ser obtida somente com o aumento da alça de diluição. Entretanto, o aumento de volume do monossegmento acarreta um maior consumo de reagentes no analisador, como discutido no capítulo VI. Para contornar este problema, foi também desenvolvido um sistema para amostragem hidrodinâmica [167], que possibilita a injeção de amostras com volumes menores que 10  $\mu\text{L}$ . Neste caso, necessariamente, o fluido transportador deve ser empregado para a diluição da amostra, devendo permanecer estático durante a amostragem. A Figura VII.2 mostra este sistema e, no detalhe, a "alça" de amostragem, que, na verdade, é um pequeno bloco de acrílico, no qual foram feitos orifícios de 0,5 mm de diâmetro. O volume de amostra injetado é determinado pelo comprimento de um destes orifícios, eliminando o volume morto que existe no corpo do injetor.



**Figura VII.2.** Diagrama do sistema de diluição com amostragem hidrodinâmica (válvula na posição de amostragem).

## VII.1.2. Avaliação do Sistema de Diluição

A configuração descrita na avaliação do analisador também foi utilizada, com pequenas alterações, para se verificar o desempenho do sistema de diluição, isto é, vazão do fluido transportador (água) de  $2,00 \text{ mL min}^{-1}$ , reator de PTFE de 1,5 m, frequência de amostragem de  $90 \text{ h}^{-1}$  e alças de ar L1 e L2 com 50 e  $90 \mu\text{L}$ , respectivamente. O volume da alça de diluição L4 foi fixado em  $50 \mu\text{L}$ , sendo empregado o próprio transportador como fluido diluidor.

Inicialmente foi verificada a homogeneidade do monossegmento, através da injeção de  $20 \mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{KMnO}_4$   $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  em um monossegmento de  $400 \mu\text{L}$ . Neste experimento foi utilizada a amostragem convencional ( $20 \mu\text{L}$  é o menor volume que pode ser amostrado com este sistema) e o volume da alça de diluição L3 foi igual a  $330 \mu\text{L}$ . A Tabela VII.1 relaciona as medidas de absorbância efetuadas em  $525 \text{ nm}$  e em diferentes pontos do monossegmento, que foram realizadas alterando-se a posição do sensor óptico de detecção de amostra (mostrado na Figura VI.5).

**Tabela VII.1.** Valores de absorbância obtidos em vários pontos do monossegmento.

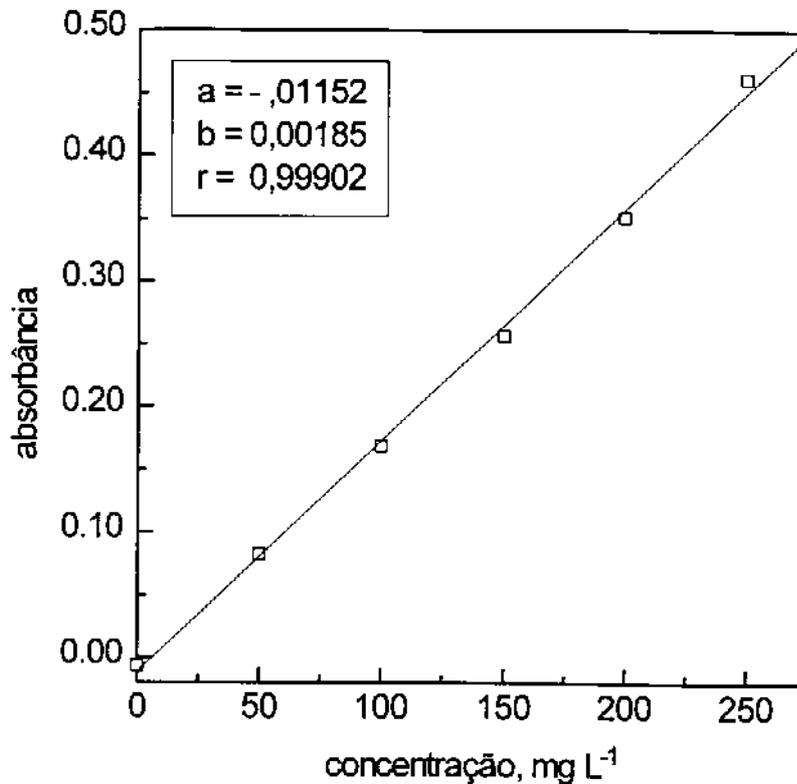
localização	$(A \pm s)^1$
início	$0,388 \pm 0,007$
2º	$0,379 \pm 0,003$
3º	$0,398 \pm 0,003$
4º	$0,402 \pm 0,005$
5º	$0,400 \pm 0,006$
final	$0,399 \pm 0,006$
manual <sup>2</sup>	$0,400 \pm 0,005$

(1) média  $\pm$  estimativa do desvio padrão de 10 replicatas.

(2) medidas efetuadas no centro do monossegmento.

Os resultados mostrados nesta tabela permitem concluir que o monossegmento é homogêneo, sendo que os menores valores de absorbância, obtidos quando as medidas foram feitas no início do monossegmento, podem ser consequência do processo de limpeza da cela de fluxo. Além disto, a injeção de 400  $\mu\text{L}$  da solução estoque de permanganato de potássio, diluída manualmente 20 vezes, indica que a amostra praticamente não sofre dispersão e que a precisão das medidas não está relacionada com a homogeneidade do monossegmento.

O sistema de diluição foi também avaliado através da reação, em meio ácido, de Cr(VI) com difenilcarbazida. Basicamente, foi empregada a mesma configuração descrita anteriormente, exceto que foram injetadas soluções padrão de Cr(VI) de 50, 100, 150, 200 e 250  $\text{mg L}^{-1}$ . A Figura VII.3 mostra a curva de calibração obtida com estes padrões, diluídos cerca de 150 vezes, através da injeção de 2,5  $\mu\text{L}$  em um monossegmento de 380  $\mu\text{L}$  (volume total das alças de diluição L3 e L4), o que demonstra a eficiência do sistema desenvolvido. A injeção de 10 replicatas da solução de Cr(VI) de 100  $\text{mg L}^{-1}$  forneceu um resultado de  $(101,5 \pm 2,3) \text{ mg L}^{-1}$ , sugerindo que existe uma pequena intercontaminação entre as amostras, verificada com a obtenção de uma concentração de 7,6  $\text{mg L}^{-1}$  para a prova em branco injetada logo após o padrão de 250  $\text{mg L}^{-1}$ . Esta contaminação pode ser proveniente da própria amostragem hidrodinâmica, onde existe uma interface de contato entre a amostra e o fluido diluidor. Entretanto, é menos significativa quando as soluções injetadas possuem concentrações semelhantes e seu efeito sobre o resultado final pode ser minimizado com a injeção dos padrões e/ou amostras em triplicata.



**Figura VII.3.** Curva de calibração de Cr(VI) obtida com diluição dos padrões de 150 vezes (amostragem hidrodinâmica).

### VII.1.3. Conclusões

O sistema desenvolvido é bastante simples e eficiente para a diluição de amostras em análise em fluxo monossegmentado, melhorando o desempenho dos métodos baseados em MSFA, uma vez que elimina o procedimento de diluição manual.

Alguns aspectos do sistema de diluição desenvolvido necessitam ser investigados com detalhes, pois podem ampliar o seu escopo de aplicações. Por exemplo, as alças L3 e L4 podem ser empregadas para a adição de

reagentes à amostra (com conseqüente diluição), eliminando a amostragem por bombeamento diferencial, que tem sido frequentemente utilizada [115-119]. Por outro lado, caso não seja desejável que a amostra sofra uma grande diluição, as alças L3 e L4 podem ser empregadas para amostrá-la enquanto que o reagente pode ser adicionado através de Lam. Além do mais, a alça Lam pode ser utilizada para a adição de padrões sobre a solução problema amostrada através de L3 e L4. Da mesma forma, este sistema pode ser usado para a realização de titulações em análise em fluxo monossegmentado. A viabilidade destas possíveis aplicações deverá ser investigada num futuro próximo e, se confirmada, o sistema poderá ser chamado de "dupla amostragem" ao invés de sistema de diluição.

Finalmente, a amostragem hidrodinâmica proposta também pode ser empregada em análise por injeção em fluxo, através da eliminação das alças de ar L1 e L2. A principal vantagem que pode ser obtida com este sistema está relacionada com a eliminação da segunda bomba peristáltica, como descrito por Ruzicka e Hansen [167].

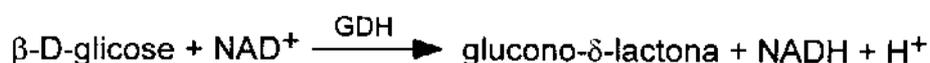
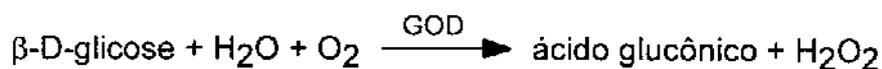
## **VII.2. Glicose, Creatinina e Uréia**

As determinações de glicose, creatinina e uréia são as mais solicitadas nos exames médicos pois, normalmente, estas substâncias possibilitam uma avaliação do estado clínico geral de um paciente. A concentração de glicose é mantida no sangue dentro de certos níveis, regulados pela insulina e por vários hormônios (tiroxina, por exemplo), que atuam no sentido de diminuí-la e aumentá-la, respectivamente. A diabetes é a principal doença decorrente de um alto nível de glicose no sangue, indicando deficiências

no metabolismo de carboidratos. Por outro lado, uma baixa concentração de glicose (hipoglicemia) raramente pode ser associada a alguma doença grave. As concentrações de uréia e creatinina no sangue são indicadores das funções renais e suas relações podem caracterizar diferentes enfermidades [168].

Muito embora os analisadores automáticos atualmente empregados nos laboratórios de grande porte sejam descontínuos [144-147], vários trabalhos relacionados às determinações de glicose, creatinina e uréia têm sido descritos na literatura. Nestes trabalhos, citados a seguir, estão frequentemente envolvidos métodos em fluxo que, além do baixo custo e simplicidade, possibilitam uma alta frequência de amostragem e são, portanto, alternativas viáveis aos analisadores discretos, em especial para os pequenos laboratórios de análises clínicas.

Os métodos de determinação de glicose em plasma, soro ou sangue total são geralmente baseados em reações enzimáticas, nas quais são empregadas, por exemplo, *glicose-oxidase* (GOD) [EC 1.1.3.4]\* ou *glicose-desidrogenase* (GDH) [EC 1.1.1.47] e que podem ser expressas pelas seguintes equações [168]:



A enzima GDH tem sido empregada na construção de eletrodos quimicamente modificados, sendo a determinação de glicose efetuada através da detecção amperométrica do NADH formado [101,102]. A *glicose-oxidase*

---

\* a GOD é altamente específica para  $\beta$ -D-glicose e a enzima mutarotase pode ser usada para transformar o isômero  $\alpha$  no  $\beta$  [168].

também tem sido utilizada na construção de biossensores amperométrico [169] e espectrofotométrico [170], os quais, respectivamente, monitoram o peróxido de hidrogênio ou o produto formado através da reação enzimática deste peróxido com reagentes específicos. Por sinal, estas determinações espectrofotométricas de glicose são as mais comuns, utilizando a reação do peróxido de hidrogênio com um ou mais reagentes, catalisada pela enzima *peroxidase*, conforme a equação [153]:

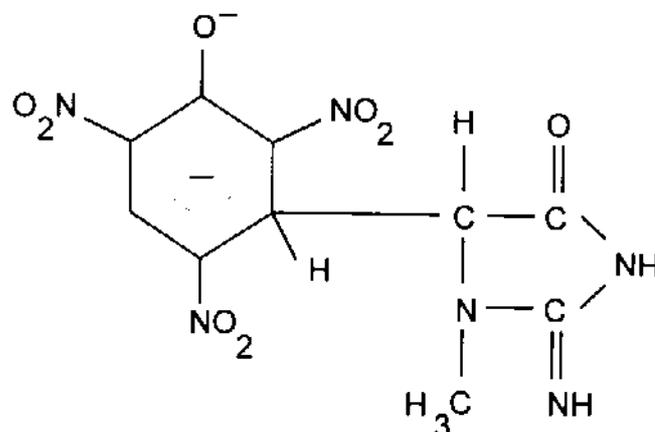


onde  $\text{DH}_2$  é um doador de hidrogênio e o produto formado  $\text{D}$  é um cromóforo. Por exemplo, Toei tem utilizado a reação de peróxido de hidrogênio com fenol e 4-aminoantipirina para a determinação de glicose em sistemas FIA com parada de fluxo [171] e com fluxo reverso [172,173]. Esta mesma reação, com o uso de 2,4-diclorofenol em substituição ao fenol, tem sido empregada por Malcome-Lawes e colaboradores [153] em um analisador de fluxo controlado por computador e por Hsieh e Crouch [127] em um sistema de fluxo contínuo segmentado com parada de fluxo. Embora nestas metodologias tenham sido usadas soluções de *glicose-oxidase* para se efetuar a reação com a glicose, esta enzima tem sido frequentemente imobilizada em biorreatores para sistemas FIA [174-176].

A determinação enzimática da creatinina está baseada na sua reação com a *creatinina iminohidrolase* ou *creatininase* [EC 3.5.4.21] (CIH), a qual pode ser descrita pela seguinte equação [168]:

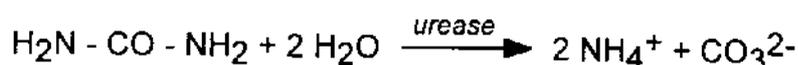


seguida da detecção do íon amônio formado. Alguns métodos de análise por injeção em fluxo têm sido descritos na literatura, empregando reatores que contêm esta enzima imobilizada [177-178]. Entretanto, tais métodos sofrem interferência do íon amônio endógeno (presente no sangue), o qual necessita ser removido ou medido antes da determinação da creatinina. Apesar de menos específica e sofrer uma série de interferências (acetona, ácidos pirúvico, hipúrico e ascórbico, glicose, guanidina, cefalosporina, proteínas, bilirrubina), a reação da creatinina com o ácido picrico em meio alcalino (reação de Jaffé), é a mais utilizada nos laboratórios de análises clínicas. Embora esta reação seja conhecida desde 1886, a estrutura do produto ainda não foi exatamente determinada, sendo que tem sido proposta a formação de um aduto 1:1 entre a creatinina e o íon picrato (complexo de Janovsky) [168]:



Esta reação também tem sido ainda estudada em seus aspectos cinéticos [179], comparada com outras metodologias mais recentes [180] e frequentemente empregada em sistemas FIA [181-183], em analisadores discretos [184] e de fluxo monossegmentado [116], sendo nestes dois últimos para a determinação de creatinina em urina.

As determinações de uréia em soro sanguíneo frequentemente empregam sua reação enzimática com a *urease* [EC 3.5.1.5]:



O íon amônio formado e as variações de pH ou de condutância, que são proporcionais à quantidade do analito na amostra, têm sido os parâmetros medidos em várias metodologias de análise por injeção em fluxo. As variações de pH ocorridas na reação têm sido determinadas com indicadores ácido-base [185,186] e eletrodo de vidro enzimático [187] e as variações de condutância medidas diferencialmente com duas celas [188] ou com uma única cela, após a permeação da amônia, através de uma membrana de PTFE, para um fluido aceptor de água desionizada [189]. A determinação do íon amônio tem sido efetuada por potenciometria, empregando-se eletrodo enzimático [190] e por espectrofotometria, envolvendo seu acoplamento oxidativo com hipoclorito e salicilato de sódio em meio alcalino [191]. A determinação não-enzimática da uréia também tem sido realizada, através de sua reação com o-ftalaldeído e naftiletilenodiamina, com detecção espectrofotométrica [192]. É importante salientar que, em vários dos trabalhos citados têm sido utilizados biorreatores, com a *urease* imobilizada natural [189] ou quimicamente [175,186,188,191].

Nesta tese, as determinações de glicose, creatinina e uréia em plasma e soro sanguíneos foram realizadas empregando-se metodologias comuns aos laboratórios de análises clínicas. Desta forma, como explicitado anteriormente, os métodos manuais foram adaptados ao analisador contínuo, com o objetivo de se investigar a viabilidade do seu uso em laboratórios de pequeno porte.

## VII.2.1. Experimental

O analisador automático foi empregado conforme a configuração mostrada na Figura VI.6. Em todas as determinações a frequência de amostragem foi mantida em  $90 \text{ h}^{-1}$ , a vazão do fluido transportador fixada em  $2,00 \text{ mL min}^{-1}$  e os reatores, de vidro, foram dimensionados para fornecerem tempos de residência de 2,0 e 6,5 minutos para os reatores 1 e 2, respectivamente. As bolhas de ar do monossegmento foram de  $90 \mu\text{L}$  (primeira) e  $50 \mu\text{L}$  (segunda) e o volume da alça de diluição frontal foi fixado em  $50 \mu\text{L}$ .

As medidas de absorvância foram obtidas através da média de 5 varreduras e com largura de banda de 3 nm (média de 9 diodos). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

### VII.2.1.1. Glicose

Na determinação de glicose foram utilizados reagentes Merck (método GOD-PAP, *glicose oxidase/peroxidase*). O fluido transportador foi uma solução tampão PIPES  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,2, obtido com a diluição da solução Merck (produto nº 14144) com água desionizada, na proporção de 1:4 (v/v), contendo estabilizadores e detergentes não especificados pelo fabricante. O reagente foi preparado pela diluição de 1,25 mL do reativo Merck (produto nº 14143) em 50 mL do tampão Merck, obtendo-se uma solução de *glicose oxidase*  $\geq 60 \text{ KU L}^{-1}$ \*, *peroxidase*  $\geq 30 \text{ KU L}^{-1}$ , *mutarotase*  $\geq 0,5 \text{ KU L}^{-1}$ , ácido 4-hidroxibenzoico  $6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e 4-aminoantipirina (p-aminofenazona)  $1,0 \times$

---

\* uma unidade internacional (U) é a quantidade de enzima que catalisa a conversão de  $1 \mu\text{mol}$  de substrato por minuto, sob as condições específicas de um método [158].

$10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Esta solução foi adicionada a uma vazão de 0,16 mL min<sup>-1</sup>, através do segundo módulo de adição. As soluções padrão de β-D-glicose foram preparadas em água desionizada, na faixa de 20 a 400 mg dL<sup>-1</sup>, a partir do reagente de grau analítico. Os padrões e as amostras de plasma (5,0 μL amostrados hidrodinamicamente) foram diluídos em 220 μL do fluido transportador (1ª alça = 50 μL e 2ª alça = 170 μL), conforme o procedimento descrito na seção VII.1.1. As medidas de absorbância foram feitas em 510 nm.

### VII.2.1.2. Creatinina

A determinação de creatinina foi realizada através da reação de Jaffé. Foi empregado um fluido transportador de água desionizada. As soluções de hidróxido de sódio 4,0 mol L<sup>-1</sup> (vazão de 0,16 mL min<sup>-1</sup>) e de ácido pícrico  $5,5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> (vazão de 0,28 mL min<sup>-1</sup>) foram adicionadas através dos módulos 1 e 2, respectivamente. As soluções padrão de creatinina foram preparadas em ácido clorídrico 0,10 mol L<sup>-1</sup>, na faixa de 0,2 a 2,4 mg dL<sup>-1</sup>, a partir do reagente de grau analítico. As amostras de soro sanguíneo foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 5 % (mistura 1:1, v/v). As soluções padrão e as amostras (100 μL) foram diluídas em 105 μL do fluido transportador (1ª alça = 50 μL e 2ª = 55 μL). O produto da reação foi monitorado em 500 nm.

### VII.2.1.3. Uréia

O método de Berthelot foi usado na determinação de uréia. Uma solução contendo cloreto de sódio 0,9 %, tampão fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 7,2 e

Brij 30 (polioxietileno-4 lauril éter)  $1,0 \times 10^{-3} \%$  (v/v) foi empregada como fluido transportador. Uma solução de *urease*  $44 \text{ kU L}^{-1}$  foi adicionada através do módulo 1, com vazão igual a  $0,16 \text{ mL min}^{-1}$ . Uma solução contendo fenol 6,0 % e nitroprussiato de sódio 1,0 % e outra de hipoclorito de sódio 1,0 % em hidróxido de sódio  $4,0 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionadas através do módulo 2, com vazões de  $0,16 \text{ mL min}^{-1}$ . As soluções padrão de uréia foram preparadas em água desionizada, na faixa de 20 a  $240 \text{ mg dL}^{-1}$ , a partir do reagente de grau analítico. As amostras de soro sanguíneo foram desproteinizadas com ácido tricloroacético 5 % e os padrões diluídos com este ácido na mesma proporção (1:1 v/v). A amostragem foi realizada da mesma forma que no caso da determinação da glicose ( $5,0 \mu\text{L}$  de amostra em  $220 \mu\text{L}$  de solução transportadora). A absorbância foi monitorada em 620 nm.

## VII.2.2. Resultados e Discussão

Com o objetivo de facilitar a operação do instrumento, os métodos manuais para a determinação de creatinina, glicose e uréia foram adaptados ao sistema automático de maneira que estas substâncias pudessem ser determinadas com mínimas alterações no analisador. Idealmente, a mesma configuração do sistema deveria possibilitar a determinação destas três substâncias de interesse. Desta forma, as condições empregadas (em especial, diluição da amostra e tempo de residência) em cada determinação não refletem, a rigor, as condições ótimas que poderiam ser obtidas caso fossem realizadas independentemente. Por exemplo, o primeiro reator foi mantido na determinação de glicose, embora o reagente tenha sido adicionado apenas no segundo ponto de adição. Convém salientar que este procedimento não altera a frequência de

amostragem, mas apenas aumenta o tempo necessário para que a primeira amostra atinja o detector. As adaptações dos métodos manuais foram realizadas tendo em vista os parâmetros de sensibilidade e de linearidade, muitas vezes limitados pelo espectrofotômetro multicanal empregado como detector. Embora, como será visto adiante, os níveis de glicose, creatinina e uréia presentes no sangue e aceitos como normais se encontrem em uma faixa relativamente estreita, as concentrações destas substâncias nas amostras apresentam uma dispersão muito grande. Neste sentido, os procedimentos descritos na seção anterior consideram tanto a linearidade quanto a sensibilidade, sendo que esta última foi algumas vezes prejudicada em função da primeira. Finalmente, as determinações, embora enzimáticas, foram realizadas à temperatura ambiente e não a 37 °C, como frequentemente recomendado.

A utilização de reatores de vidro foi necessária para a estabilidade do monossegmento, principalmente no caso da determinação da creatinina. Apesar da desproteinização, a adição de ácido pícrico à amostra induzia a formação de um precipitado, provavelmente devido às proteínas remanescentes, que ficava aderido às paredes do reator de PTFE. Entretanto, com o uso de reatores de vidro, este precipitado era solubilizado após a homogeneização do monossegmento. Desta forma, este reator foi mantido em todos os procedimentos, muito embora a glicose pudesse ser determinada em reatores de PTFE (esta viabilidade não foi verificada no caso da uréia). Como consequência, o grau de intercontaminação entre as amostras aumentou e a precisão das medidas diminuiu. Por exemplo, a determinação de creatinina em solução aquosa utilizando reatores de PTFE apresentou uma intercontaminação desprezível e a injeção de 6 replicatas de um padrão de 2,00 mg dL<sup>-1</sup> forneceu um resultado de (1,993 ± 0,014) mg dL<sup>-1</sup>. Por outro lado, com o emprego de

reatores de vidro a intercontaminação foi de 2,5 % e a injeção de 10 replicatas do padrão de 1,60 mg dL<sup>-1</sup> forneceu um resultado de (1,674 ± 0,061) mg dL<sup>-1</sup>. Estes resultados podem ser explicados em função das diferentes molhabilidades dos reatores; o vidro, sendo facilmente molhado por soluções aquosas, retém um filme sobre sua superfície que contribui com o aumento da dispersão das amostras e, conseqüentemente, com o aumento da intercontaminação e a diminuição da precisão.

O grau de intercontaminação entre as amostras foi avaliado com uma prova em branco (água) injetada após a solução padrão mais concentrada utilizada na construção da curva de calibração. Em todas as três metodologias, foram obtidos valores equivalentes a cerca de 2,5 % das concentrações destes padrões. Entretanto, o processamento em triplicata de padrões e amostras, como realizado durante as determinações, minimiza os efeitos causados por esta intercontaminação.

A determinação de glicose em plasma foi realizada pelo método GOD-PAP, através da reação do peróxido de hidrogênio (produzido a partir da reação catalisada pela *glicose-oxidase*) com a 4-aminoantipirina e ácido 4-hidroxi-benzóico para formar a N-(4-antipiril) p-benzoquinona imina, que possui coeficiente de absorvidade molar máximo em 510 nm. Os valores normais de glicose no plasma encontram-se na faixa de 75 a 115 mg dL<sup>-1</sup>.

A precisão do método, avaliada com a injeção de 10 replicatas de uma solução padrão de 80 mg dL<sup>-1</sup>, foi de 1,8 %. As condições utilizadas nas determinações possibilitaram a obtenção de uma curva de calibração linear até uma concentração de glicose igual a 400 mg dL<sup>-1</sup>, que pode ser expressa pela seguinte equação:

$$A = (0,00956 \pm 0,0184) + (0,00182 \pm 0,00008) \times C_p \quad (r = 0,997)$$

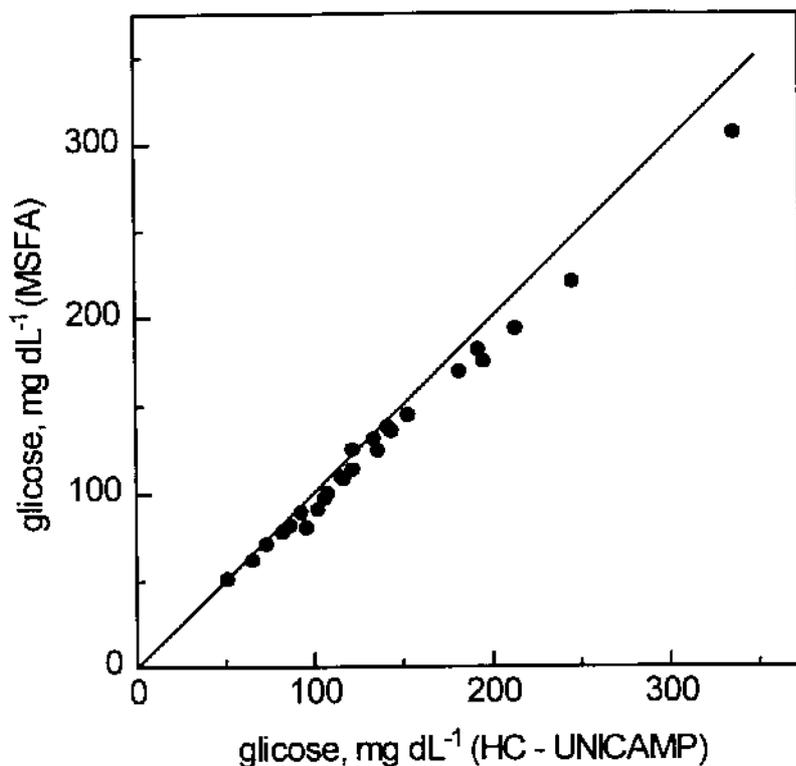
Esta linearidade é menor que a obtida pelo Hospital de Clínicas da UNICAMP ( $600 \text{ mg dL}^{-1}$ ), que emprega o mesmo método ( $300 \mu\text{L}$  do reagente Merck adicionados a  $3 \mu\text{L}$  de plasma) em um analisador automático discreto (Selectra). Por outro lado, o analisador de fluxo monossegmentado consome uma quantidade menor de reagente por determinação, equivalente a cerca de 60 % da gasta pelo Selectra. A Figura VII.4 mostra uma comparação entre os resultados obtidos por estes dois analisadores, que podem ser correlacionados, através do método dos mínimos quadrados, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{MSFA} = (4,72 \pm 2,09) + (0,895 \pm 0,014) \times \text{HC} \quad (r = 0,997)$$

Uma avaliação da curva obtida permite concluir que, a despeito da alta correlação entre os valores, existem desvios sistemáticos constantes ( $+4,72 \text{ mg dL}^{-1}$ ) e proporcionais ( $-10,5 \%$ ) nos resultados obtidos com o analisador de fluxo monossegmentado, quando são tomados como referência aqueles fornecidos pelo analisador Selectra. Além do mais, o teste t-pareado [18] indica que existem diferenças significativas entre estes resultados ao nível de confiança de 95 %.

O método de Jaffé para a determinação de creatinina é baseado na formação de um composto vermelho alaranjado (complexo de Janovsky), produzido na reação desta espécie com picrato alcalino, que pode ser medido em  $500 \text{ nm}$ . Os valores normais de creatinina no soro sanguíneo encontram-se em uma faixa de concentração de  $0,5$  a  $1,2 \text{ mg dL}^{-1}$ .

No desenvolvimento desta metodologia, assim como nas outras, as concentrações iniciais dos reagentes e a diluição da amostra foram determinadas com base nos métodos de referência (manuais ou automáticos). O analisador Cobas-Mira, do Hospital de Clínicas da UNICAMP, emprega uma



**Figura VII.4.** Comparação entre os resultados de 25 determinações de glicose em plasma, obtidos com os analisadores Selectra (HC) e MSFA (a reta traçada relaciona valores iguais).

única solução de hidróxido de sódio  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  e ácido pícrico  $3,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  na determinação de creatinina ( $200 \mu\text{L}$  de reagente adicionados à  $10 \mu\text{L}$  de amostra, diluída com  $30 \mu\text{L}$  de água, sendo a medida de absorvância realizada após 2 minutos). Entretanto, no analisador contínuo, o uso destes reagentes nas proporções adequadas para que fossem mantidas no monossemento as mesmas concentrações que no método de referência, resultou em uma sensibilidade extremamente baixa (a absorvância do padrão de  $2,40 \text{ mg dL}^{-1}$  foi menor que 0,02, após a reação ter se processado por 4 minutos). Desta forma, foi necessário empregar uma solução de ácido pícrico concentrada, dobrando o consumo deste reagente com relação ao método de

referência (o consumo de hidróxido de sódio foi praticamente o mesmo). É importante ressaltar este fato, uma vez que está relacionado com uma das principais limitações do analisador. A solução de ácido picrico empregada ( $5,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) é praticamente saturada e não pode ser misturada ao hidróxido, pois ocorre a precipitação do picrato de sódio. Sob certos aspectos, o uso de dois reagentes é uma desvantagem, a qual pode ser somada à necessidade de uma vazão de ácido picrico relativamente alta ( $0,28 \text{ mL min}^{-1}$ ). Esta vazão, como relatado, pode causar diferenças significativas nos sinais das últimas amostras processadas, caso as medidas não sejam efetuadas após a reação ter sido completada. Isto pode ocorrer pois as últimas amostras injetadas terão um tempo de residência um pouco maior, como consequência da interrupção da adição dos reagentes em intervalos de tempo regulares.

Enquanto o método de referência possui uma resposta linear até  $20,0 \text{ mg dL}^{-1}$ , a curva de calibração para a determinação de creatinina, obtida nas condições descritas na seção VII.2.1.2, apresentou-se linear até pelo menos  $2,00 \text{ mg dL}^{-1}$ , podendo a absorbância ser relacionada com a concentração de creatinina através da seguinte equação:

$$A = (-0,00468 \pm 0,00060) + (0,08422 \pm 0,00054) \times C_p \quad (r = 0,9999)$$

A precisão da metodologia, avaliada com a injeção de 10 replicatas de uma solução padrão de  $1,60 \text{ mg dL}^{-1}$ , foi de 3,6 %. A Figura VII.5 mostra uma comparação entre os resultados obtidos com os analisadores Cobas-Mira e de fluxo monossegmentado, cuja relação pode ser expressa pela seguinte equação:

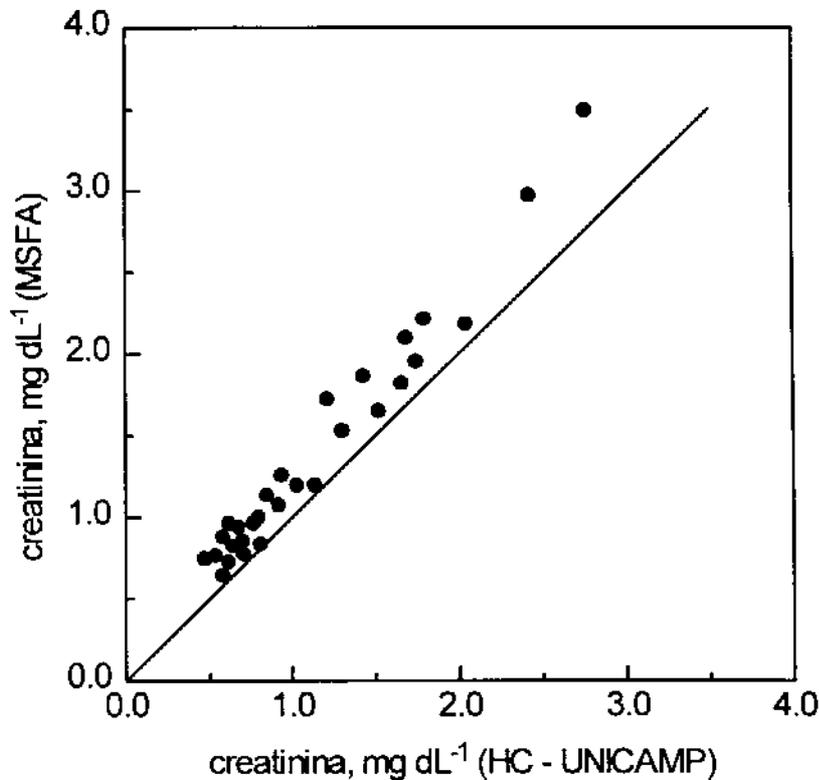
$$\text{MSFA} = (0,0785 \pm 0,054) + (1,155 \pm 0,043) \times \text{HC} \quad (r = 0,982)$$

Embora exista uma correlação razoável entre os resultados obtidos, o teste t-pareado indicou uma diferença significativa entre as duas metodologias, ao nível de confiança de 95 %, que pode ser atribuída principalmente ao desvio sistemático proporcional de + 15,5 %. Este desvio pode ser devido a interferentes, tais como glicose, ácidos ascórbico e pirúvico e proteínas (não eliminadas completamente na etapa de desproteinização), que podem formar complexos com o íon picrato. Além disto, alguns complexos são formados após 2 minutos, contribuindo, portanto, para estes desvios positivos [168]. Convém lembrar que na metodologia de referência as medidas foram realizadas após 2 minutos e que na metodologia proposta após 6,5 minutos. A diminuição do tempo de reação, conforme exposto, provavelmente diminuiria o desvio sistemático, mas este tempo foi mantido em razão da opção de se realizar as determinações das três substâncias de interesse com os mesmos reatores.

Como pode ser notado na Figura VII.5, foram analisadas amostras com concentrações de creatinina superiores a  $2,00 \text{ mg dL}^{-1}$ . Isto foi possível devido ao procedimento de desproteinização das amostras, no qual é adicionado ácido tricloroacético à amostra na proporção de 1:1 (v/v). Apesar de realizado com as amostras, os padrões não foram diluídos com este ácido, pois foram preparados em ácido clorídrico  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ .

A decomposição da uréia pela *urease* e a determinação do íon amônio formado pelo método de Berthelot foi o procedimento empregado para a determinação desta espécie em soro sanguíneo, cujos valores normais devem estar na faixa de  $20 \text{ a } 40 \text{ mg dL}^{-1}$ .

Inicialmente o método manual proposto pela Merck (produto nº 14315) foi adaptado ao analisador, possibilitando um menor consumo de reagentes (por exemplo, o consumo de *urease* foi reduzido à metade). O



**Figura VII.5.** Comparação entre os resultados de 29 determinações de creatinina em soro, obtidos com os analisadores Cobas-Mira (HC) e MSFA (a reta traçada relaciona valores iguais).

método teve um bom desempenho para a determinação de uréia em soluções aquosas, mas não forneceu resultados coerentes para as amostras de soro. Os experimentos realizados com as amostras sem a adição de *urease* indicaram que o hipoclorito de sódio pode degradar a matéria orgânica (proteínas e aminoácidos), produzindo íons amônio, o que resultaria em um erro positivo. Entretanto, esta degradação é dependente da concentração de hipoclorito e resultados menores que o esperado foram obtidos com o uso de soluções de hipoclorito diluídas. Enfim, as soluções concentradas deste reagente degradam a matéria orgânica, inserindo erros positivos nas determinações e soluções diluídas não contêm hipoclorito suficiente para que a reação de Berthelot ocorra

apropriadamente. Este problema pode ser consequência da reação com a *urease* ocorrer, no analisador, em um período relativamente curto (2 minutos), produzindo pequenas quantidades de amônio, uma vez que o método manual fornece resultados adequados (neste caso, esta reação é processada por 15 minutos a 37 °C).

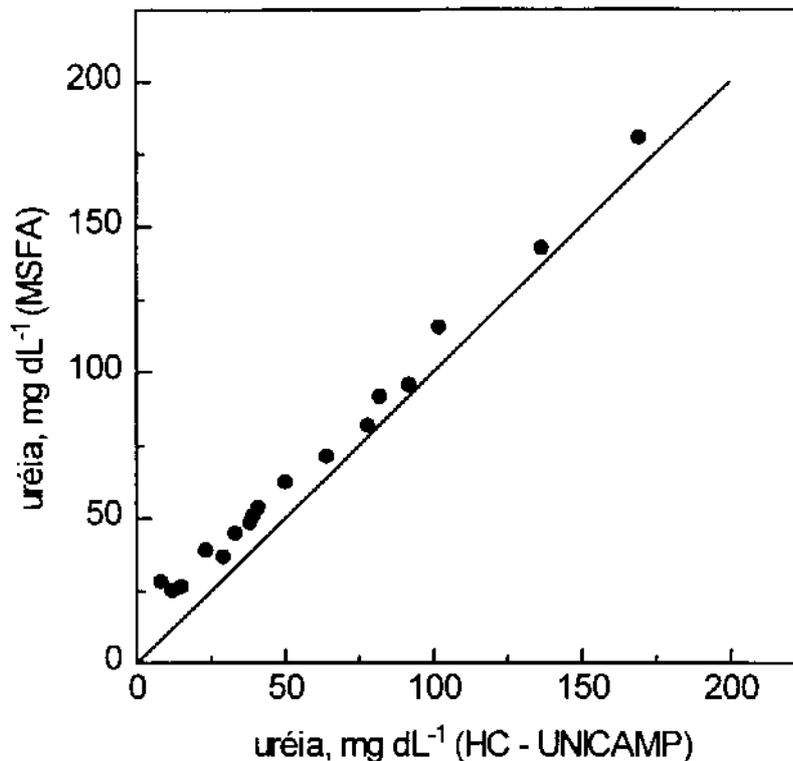
Em razão destes resultados, não foi possível adaptar diretamente o método manual da Merck, sendo necessário utilizar uma solução de *urease* mais concentrada (44 KU L<sup>-1</sup> contra 3,5 KU L<sup>-1</sup> do método manual), desproteinizar o soro com ácido tricloroacético 5 % e diluir os padrões, na mesma proporção, com esta solução. Nas condições apresentadas (seção VII.2.1.3), a precisão do método foi de 3,7 %, determinada através da injeção de 7 replicatas de uma solução padrão de 40 mg dL<sup>-1</sup> e a curva de calibração obtida foi linear até 200 mg dL<sup>-1</sup>, a qual pode ser representada pela seguinte equação:

$$A = (0,0010 \pm 0,0043) + (0,00218 \pm 0,00004) \times C_p \quad (r = 0,9992)$$

A Figura VII.6 mostra uma comparação dos resultados obtidos com o analisador monossegmentado e com o Cobas-Mira, no qual a uréia, degradada pela ação da *urease*, é determinada através da reação do ion amônio com 2-oxoglutarato e NADH, na presença de *glutarato desidrogenase* (o decréscimo da concentração de NADH é monitorada a 340 nm).

A correlação entre estes resultados pode ser expressa pela seguinte equação:

$$MSFA = (13,5 \pm 1,5) + (0,956 \pm 0,021) \times HC \quad (r = 0,996)$$



**Figura VII.6.** Comparação entre os resultados de 17 determinações de uréia em soro, obtidos com os analisadores Cobas-Mira (HC) e MSFA (a reta traçada relaciona valores iguais).

Novamente, apesar da boa correlação entre os resultados, o teste t-pareado indicou a existência de uma diferença significativa com um nível de confiança de 95 %, a qual pode ser atribuída principalmente ao desvio constante de + 13,5 mg dL<sup>-1</sup>, obtido nas determinações realizadas com o analisador de fluxo monosssegmentado. A injeção de 3 amostras de soro sanguíneo desproteinizado, com concentrações de uréia iguais a 29, 64 e 137 mg dL<sup>-1</sup> (resultados do HC - Unicamp), cujos processamentos foram realizados sem a adição de *urease*, forneceram sinais espectrofotométricos equivalentes ao desvio constante encontrado. Este "branco" da amostra pode ser devido, como anteriormente discutido, à ação do hipoclorito de sódio sobre as proteínas e/ou

aminoácidos não eliminados pelo ácido tricloroacético, gerando íons amônio. A interferência do íon amônio endógeno [177,178] foi descartada pois, além da alta diluição sofrida pela amostra, o soro não-desproteínizado forneceu um "branco" muito mais intenso quando comparado com o do desproteínizado.

Para finalizar, é necessário que seja salientado que os valores de referência (valores normais) podem variar em função tanto do método como do instrumento empregados nas determinações [168]. Portanto, as diferenças encontradas entre os resultados obtidos com o analisador de fluxo monossegmentado construído e pelo Hospital de Clínicas da Unicamp são perfeitamente aceitáveis, sendo, também, descritas na literatura com relativa frequência [146,175,185,186,192].

Com relação ao programa de controle do analisador, os resultados obtidos e os dados de interesse são armazenados em arquivos determinados pelo usuário, como discutido anteriormente. Da mesma forma que a descrita na seção VI.1.4, os resultados são apresentados, em tempo real, no vídeo do microcomputador na forma de um "relatório", mostrado na Figura VII.7, que pode ser, a critério do operador, enviado à uma impressora.

analyte: UREA file: URE403.CFA 07-20-1995 23:25:08  
 replicates: 3 bandwidth: 3 nm scans: 5 integration: 93 ms

STD	C (mg/dL)	A		SMP	A	C (mg/dL)
1	0.000E+00	0.0042	calibration	1	0.0063	2.525E+00
2	2.000E+01	0.0451		2	0.2526	1.157E+02
3	4.000E+01	0.0897	a = 0.00083	3	0.0620	2.812E+01
4	8.000E+01	0.1620	b = 0.00218	4	0.0789	3.587E+01
5	1.200E+02	0.2641	c = 0.99920	5	0.1179	5.380E+01
6	1.600E+02	0.3567		6	0.1562	7.137E+01
7	2.000E+02	0.4335		7	0.3124	1.431E+02
				8	0.3943	1.808E+02
				9	0.2808	1.286E+01
				10	0.1206	5.501E+01
				11	0.1372	6.246E+01
				12	0.0986	4.491E+01

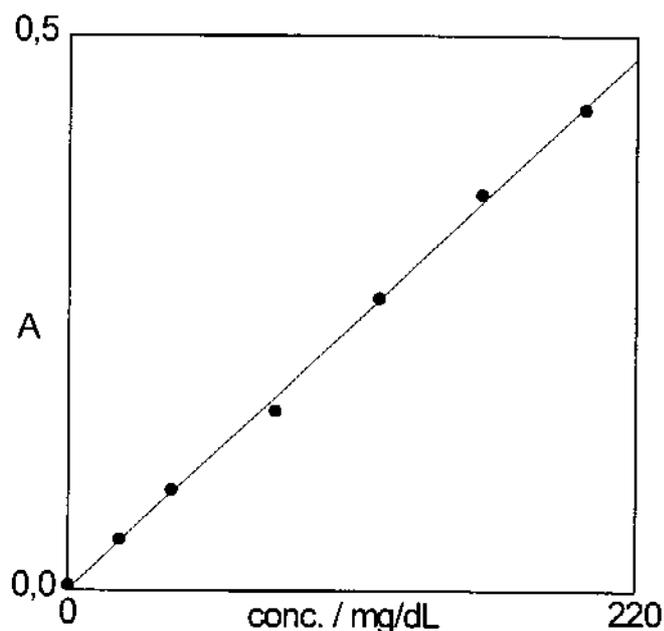


Figura VII.7. "Relatório" apresentado no vídeo do microcomputador no decorrer de uma determinação.

### VII.2.3. Conclusões e Perspectivas

O analisador de fluxo monossegmentado desenvolvido apresentou um bom desempenho para determinações de substâncias de interesse clínico, sendo uma alternativa de custo relativamente baixo quando comparado com os analisadores automáticos descontínuos normalmente utilizados pelos grandes laboratórios. Certamente este desempenho foi limitado tanto pela ausência de um controle de temperatura (e aquecimento a 37 °C) como pela necessidade de se empregar reatores de vidro. A construção de um banho (de ar) termostaticado controlado pelo microcomputador pode resolver facilmente os problemas provenientes do processamento das amostras na temperatura ambiente.

A desproteinização das amostras de soro para as determinações de creatinina e uréia é um procedimento que compromete tanto a precisão e a exatidão como a rapidez de todo o processo, sendo que a sua eliminação tornaria o analisador mais atraente para estas aplicações. A maneira de suplantar esta etapa de desproteinização seria através da adaptação de um sistema de diálise ao analisador, o qual, além de excluir as proteínas indesejáveis do soro e/ou plasma sanguíneos, automaticamente provocaria a diluição da espécie de interesse. A viabilidade do uso deste sistema de diálise deverá ser investigada e, provavelmente, será adaptado à válvula amostradora, em uma configuração semelhante à amostragem hidrodinâmica (Figura VII.2). Além das vantagens citadas acima, diluição do analito e eliminação da etapa de desproteinização, o sistema de diálise deverá possibilitar o emprego de reatores de PTFE, os quais deverão melhorar o desempenho do analisador.

A versatilidade do analisador poderá também ser melhorada caso seja possível armazenar no microcomputador as curvas de calibração relativas aos três analitos. Desta forma, poderá ser viável, com o desenvolvimento de um programa computacional adequado, a determinação "simultânea" destas substâncias em uma mesma amostra. Além do mais, este programa também poderá possibilitar que uma rotina de análise seja interrompida, isto é, que uma determinação de urgência seja realizada a qualquer instante. Talvez, com estas implementações viabilizadas, este analisador possa se tornar uma alternativa para os grandes laboratórios, competindo com os analisadores automáticos discretos.

## VIII. APÊNDICES

### VIII.1. Interface Serial RS232C

A interface de comunicação serial RS232C foi implementada através do CI 8251A. Os sinais de "clock" para sua operação foram gerados com os CIs 7490 e 7493, utilizando como base o "clock" da CPU 8085 (3,072 MHz). A transmissão de dados foi efetuada à taxa de 9600 bits/s. A comunicação também pode ser efetuada a 4800, 2400 ou 1200 bits/s, a partir dos pinos 9, 8 ou 11 do CI 7493, respectivamente. A Figura VIII.1 mostra o circuito eletrônico empregado para gerar estes sinais de "clock", que definem o "baud rate" da comunicação.

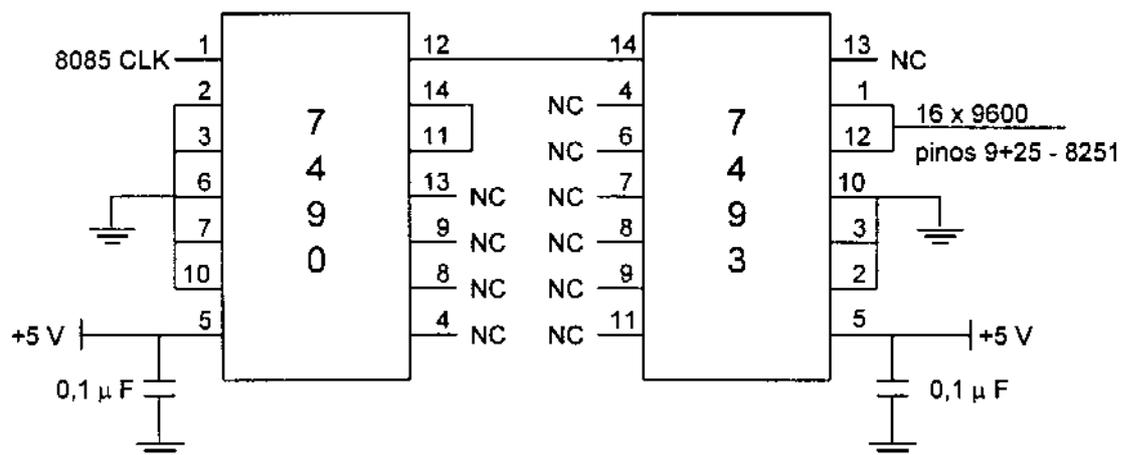


Figura VIII.1. Circuito eletrônico para a geração dos sinais de "clock" da interface de comunicação serial RS232C.

Na implementação da RS232C, foram empregados os CIs 1488 e 1489 do sistema mínimo, conectados diretamente ao CI 8251A. A Figura VIII.2 mostra o circuito eletrônico da interface.

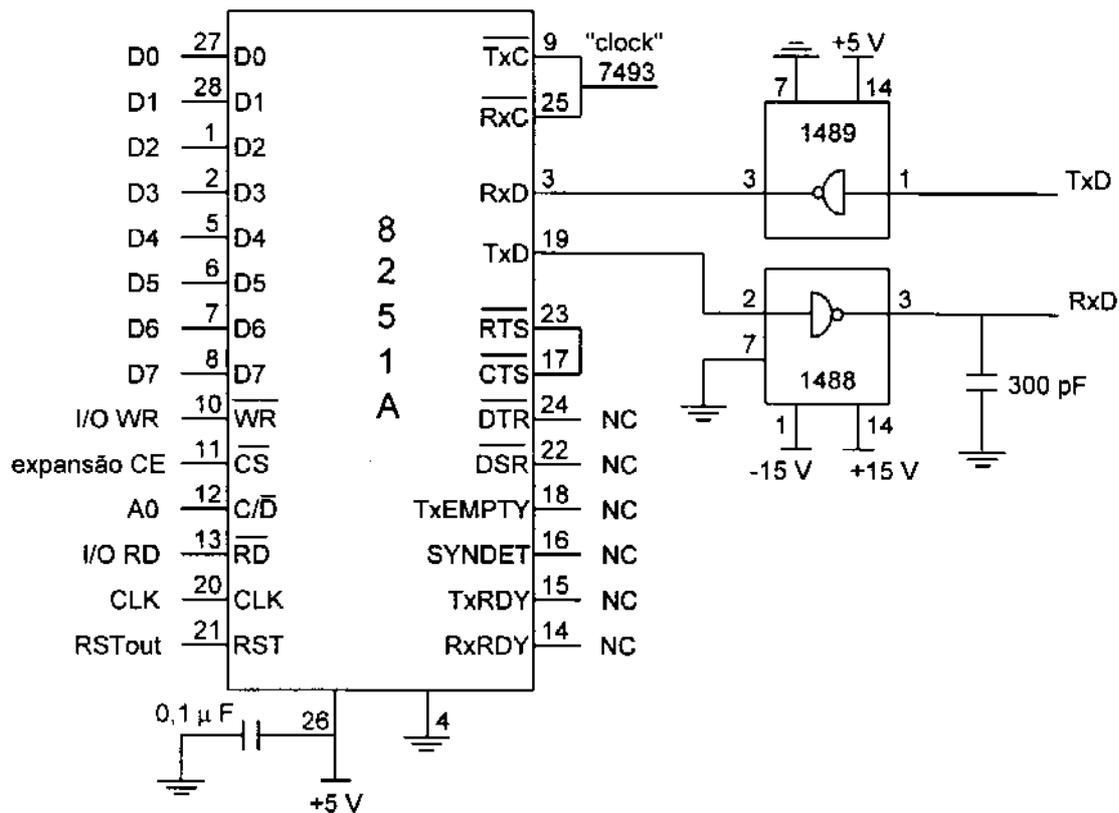


Figura VIII.2. Circuito eletrônico da interface de comunicação serial RS232C.

A interface foi programada para a transmissão e recepção de dados. O modo de operação empregado foi: 9600 bits/s, 8 bits por carácter, paridade desabilitada e 1 bit de parada (stop bit).

## VIII.2. Programa da EPROM do Sistema Mínimo

O programa mostrado na Listagem VIII.1, escrito em Assembler 8085, foi gravado na memória EPROM do sistema mínimo TSI 1020 e permite que outros programas sejam gravados na sua memória RAM através do microcomputador. O microcomputador comunica-se com o sistema mínimo após o envio de dois asteriscos ("\*\*" ou ASCII 2Ah - condição para desvio do programa) e outro asterisco é enviado ao microcomputador pelo sistema mínimo, após este ter realizado alguma tarefa.

---

### Listagem VIII.1. Programa da EPROM do sistema mínimo.

;Equates:

```

OUTPT EQU 02B7h    ; subrotina do monitor que mostra caracteres no mostrador
ORG 0800h          ; inicio do programa

```

; Início do programa

```

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 endereço apontado por HL

```

MENU: CALL ADDRMESS ; chama addrmess (configuracao do mostrador - endereco)
      LXI H, APDAS   ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
      CALL OUTPT     ; mostra PDAS no campo de enderecos
      CALL DATMESS   ; chama datmess (configuracao do mostrador - dado)
      LXI H, DPDAS   ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de dados
      CALL OUTPT     ; mostra '1 no campo de dados
ERRO: CALL INUSART   ; le usart
      CPI 2Ah        ; compara com asterisco * (42 em decimal, 2A em hexa)
      JNZ ERRO       ; se diferente, retorna para o menu
      CALL INUSART   ; le novamente a usart e o programa e desviado
      CPI 2Ah        ; para o endereco apontado por HL somente se
      JNZ ERRO       ; forem enviados dois asteriscos (*)
      CALL INIADD    ; chama iniadd (carrega par HL)
      PCHL           ; desvia programa para endereco apontado por HL

```

; **LOAD**: carrega programa no TSI 1020 através do microcomputador

```

LOAD: CALL ADDRESS      ; chama address (configuracao do mostrador - endereco)
      LXI H, ALOAD      ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
      CALL OUTPT        ; mostra LOAD no campo de enderecos
      CALL DATMESS      ; chama datmess (configuracao do mostrador - dado)
      LXI H, DLOAD      ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de dados
      CALL OUTPT        ; mostra Pr. no campo de dados
      CALL MODEDATA     ; chama modedata (formato dos dados a serem carregados)
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 ENDJOB        ; se sim, desvia para endjob (final de tarefa)

```

; **MODEDATA**: recebe o formato da mensagem a ser enviada (nº de bytes e 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 endereco 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 signicativo 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 binário 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 comunicação 8251 (usart):  
 ; 4E => clock = 16 x Baud, 8 bits/caracter, paridade desabilitada, 1 stop bit  
 ; 27 => transmissão e recepção.

```
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**: lê a usart (8085 recebe um caracter ascii enviado pelo micro).

```
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
```

; **OUTUSART**: escreve na usart (8085 envia um dado para o microcomputador).

```
OUTUSART: PUSH PSW        ; salva conteudo de A na pilha (caracter a ser enviado)
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
```

; **ENDJOB**: envia um asterisco (\*) para o microcomputador, comunicando que a tarefa foi realizada.

```
ENDJOB: MVI A, 2Ah        ; carrega A com asterisco (*)
          CALL OUTUSART    ; envia * para o microcomputador
          JMP MENU         ; retorna para o menu principal
```

; **ADDMESS**: parâmetros para a saída de caracteres no campo de endereços do mostrador.

```
ADDMESS: MVI A, 00h       ; mensagem no campo de enderecos
          MVI B, 00h       ; ponto decimal apagado
          RET              ; retorna
```

; **DATMESS:** parâmetros para saída de caracteres no campo de dados do  
;mostrador.

```
DATMESS: MVI A, 01h      ; mensagem no campo de dados
          MVI B, 00h      ; ponto decimal apagado
          RET              ; retorna
```

; Mensagens para o monitor

```
APDAS: DB 12h           ; mensagem do menu principal:
          DB 0Dh
          DB 0Ah         ; campo de enderecos: PDAS
          DB 05h         ;          12 = P, 0D = D, 0A = A, 05 = S
DPDAS: DB 83h           ; campo de dados: '1
          DB 13h         ;          83 = ' e 13 = 1

ALOAD: DB 11h           ; mensagem da subrotina load:
          DB 00h
          DB 0Ah         ; campo de enderecos: LOAD
          DB 0Dh         ;          11 = L, 00 = O, 0A = A, 0D = D
DLOAD: DB 12h           ; campo de dados: Pr.
          DB 44h         ;          12 = P e 44 = r.

END
```

### VIII.3. Programas de Controle do Espectrofotômetro

Os programas computacionais listados a seguir foram escritos (em Assembler 8085) para controle do espectrofotômetro multicanal. O programa mostrado na Listagem VIII.2 emprega o procedimento 1 de varredura, no qual o tempo de integração dos diodos é constante. Na Listagem VIII.3 são mostradas as alterações necessárias para que seja implementado o procedimento 2 de varredura, no qual o tempo de integração dos diodos é variável. Estes programas são enviados pelo microcomputador ao sistema mínimo através de pares de caracteres ASCII (0 a F), cujos arquivos-fonte são mostrados na Listagem VIII.4.

---

**Listagem VIII.2.** Programa de controle do espectrofotômetro com o procedimento 1 de varredura.

;Equates:

ADDRESS	EQU 08A7h	; subrotina do programa principal
DATMESS	EQU 08ACh	; idem
DLOAD	EQU 08BBh	; idem
ENDJOB	EQU 089Fh	; idem
ERRO	EQU 081BH	; idem
INIADD	EQU 085Ah	; idem
INUSART	EQU 0889h	; idem
MENU	EQU 0809h	; idem
MODEDATA	EQU 0852h	; idem
OUTPT	EQU 02B7h	; subrotina do monitor
OUTUSART	EQU 0893h	; subrotina do programa principal
RECEIVE	EQU 0863h	; idem
ORG	3000h	; inicio do programa

; **RUNSPEC:** obtem os espectros através do arranjo de diodos, possibilitando  
 ; alterar os parâmetros, limpar as memórias onde estes espectros serão  
 ; armazenados e enviar estes espectros para o microcomputador.

RUNSPEC: CALL ADDRESS	; configuracao do mostrador - endereco
LXI H, ASPEC	; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
CALL OUTPT	; mostra SPEC no campo de enderecos
CALL DATMESS	; configuracao do mostrador - dado

```

LXI H, DSEND          ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT           ; mostra "no. de espectros" no campo de dados
MVI A, 02h           ; Pa = in (ler AD), Pb = out (ctr) e } configuracao
OUT 20h              ; Pc = in (final de conversao do AD) } da 8155
MVI A, 29h           ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1
OUT 22h              ; inicializacao de controle da matriz de diodos e AD
JMP ERRO             ; espera endereço para onde o programa deve ser desviado

```

; **PARAMETERS:** altera os parâmetros do espectrofotômetro:  
 ; - nº de varreduras para se obter um espectro (até 05): averagenumber  
 ; - tempo de integração (mínimo de 03h e máximo de FFh): scantime  
 ; - intervalo de tempo entre os espectros (0.5 a 6500 s): intervaltime  
 ; - intervalo de tempo para se iniciar a obtenção de dados (0 a 6500 s): initialtime

PARAMETERS:

```

CALL DATMESS         ; configuracao do mostrador - dado
LXI H, DLOAD         ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT          ; mostra Pr. no campo de dados
CALL INIADD          ; endereço inicial (par HL) onde se encontram os parametros
CALL RECEIVE         ; recebe 1a. variavel - averagenumber
MOV M,A              ; coloca o valor em DSEND = mensagem do mostrador
ADI 01h              ; soma 1 ao no. de espectros: 1o. espectro e perdido
INX H                ; incrementa o endereço da memoria
MOV M,A              ; coloca o valor no contador de espectros
MVI B, 05h           ; contador para os 3 outros parametros
NEXTPAR: INX H       ; incrementa o endereço da memoria
CALL RECEIVE         ; recebe variaveis : scantime se B = 05
MOV M,A              ; intervaltime: + sig. se B = 04 e -sig. se B = 03
DCR B                ; initialtime: +sig. se B = 02 e -sig. se B = 01, armazenado-as
JNZ NEXTPAR         ; sequencialmente a partir do endereço recebido em iniadd
CALL ENDJOB2        ; envia um asterisco para o microcomputador
JMP RUNSPEC         ; retorna para o menu de RUNSPEC

```

; **CLEAR:** limpa as memórias do 8085 onde serão armazenados os espectros

```

CLEAR: CALL ADDRESS  ; configuracao do mostrador - endereço
LXI H, ACLEAR        ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
CALL OUTPT           ; mostra CLEA no campo de enderecos
CALL DATMESS         ; configuracao do mostrador - dado
LXI H, DCLEAR        ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT           ; mostra R. no campo de dados
LXI H, 3200h         ; carrega HL com endereço 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 40h              ; se = 40, toda a memoria foi limpa
JM CMEMO             ; se nao, continua limpando
CALL ENDJOB2        ; envia um asterisco para o micrcomputador
JMP RUNSPEC         ; retorna para o menu de RUNSPEC

```

; **RUN:** controla o arranjo de diodos para leitura e armazenamento dos espectros  
;na memória apontada por HL

```

RUN: CALL ADDRESS      ; configuracao do mostrador - endereco
    LXI H, ARUN        ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
    CALL OUTPT         ; mostra READ no campo de enderecos
    CALL DATMESS       ; configuracao do mostrador - dado
    LXI H, DSEND       ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
    CALL OUTPT         ; mostra "no. de espectros" no campo de dados
    LXI H, AVERAGE     ; carrega HL com o end. inicial onde estao as variaveis do programa
    MOV D, M           ; carrega contador D com o no. de espectros contido em HL (via
                        ; micro)
    INX H              ; incrementa o endereco da memoria
    MOV E, M           ; } carrega contador E com tempo para a conversao do AD (3 a FF)
    LXI H, 3200h       ; carrega HL com o endereço inicial dos espectros
SCAN: LXI B, 0200h     ; carrega BC com 1 espectro
    MVI A, 2Dh         ; wr=1, rd=0, s=1, c=1, r=0, en=1
    OUT 22h           ; levanta linha de start do PDA
    MVI A, 25h         ; wr=1, rd=0, s=1, c=0, r=0, en=1
    OUT 22h           ; abaixa a linha de clock do PDA
    MVI A, 21h         ; wr=1, rd=0, s=0, c=0, r=0, en=1
    OUT 22h           ; abaixa linha de start: pulso perdido
DIODE: MVI A, 29h     ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } pulso de
    OUT 22h           ; levanta a linha de clock      } clock que
    MVI A, 21h         ; wr=1, rd=0, s=0, c=0, r=0, en=1 } coloca o
    OUT 22h           ; abaixa a linha de clock      } diodo
    MVI A, 29h         ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } para se fazer
    OUT 22h           ; levanta a linha de clock      } leitura via AD
    MVI A, 28h         ; wr=0, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } pulso
    OUT 22h           ; abaixa a linha de write do AD  } negativo
    MVI A, 29h         ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } no write
    OUT 22h           ; levanta a linha de write do AD } do ADC
    PUSH D             ; salva o conteudo dos registradores D e E
TIME: DCR E           ; } conversao do AD, minimo = 03h e maximo = FFh =>
    JNZ TIME          ; } pode ser alterado atraves do microcomputador
    POP D              ; retorna os valores dos registradores D e E
    IN 21h             ; leitura do AD
    MOV M,A            ; coloca o valor lido na memoria apontada por HL
    INX H              ; incrementa endereco da memoria
    MVI A, 39h        ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=1, en=1
    OUT 22h           ; levanta a linha de reset do PDA
    DCX B              ; decrementa par BC (contador dos diodos)
    MOV A,B            ; verifica se todos os diodos foram lidos
    ORA C              ; (ora = 1, se A ou C = 1)
    JNZ DIODE         ; se nao, retorna para ler outro diodo
    DCR D              ; decrementa D para verificar no. de espectros obtidos
    JNZ SCAN          ; se nao terminou, obtem outro espectro
    CALL ENDJOB2      ; envia asterisco para o microcomputador
    JMP RUNSPEC       ; retorna para RUNSPEC

```

; **SEND:** envia dados (espectros) para o microcomputador

```

SEND: CALL ADDRESS    ; configuracao do mostrador - endereco
    LXI H, ASEND       ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
    CALL OUTPT         ; mostra SEDA no campo de enderecos
    CALL DATMESS       ; configuracao do mostrador - dado
    LXI H, DSEND       ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
    CALL OUTPT         ; mostra "no. de espectros" no campo de dados

```

```

CALL MODEDATA      ; chama modedata (formato dos dados a serem enviados)
TBYTE: CALL TRANSMIT ; chama transmit (envia um byte para micro)
INX H              ; incrementa o endereço da memória (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 não, retorna para enviar outro byte
CALL ENDJOB2       ; se sim, envia asterisco para o microcomputador
JMP RUNSPEC        ; retorna para o menu RUNSPEC

```

; **TRANSMIT:** o byte existente na memória apontada por HL é enviado ao microcomputador como um caracter ASCII.

```

TRANSMIT: MOV A,M      ; conteúdo da memória apontada por HL e colocada em A
CALL OUTUSART         ; byte colocado em A e enviado ao microcomputador
RET                   ; retorna

```

; **TIMEDEL:** decrementa intervalo de tempo entre os espectros e para iniciar a obtenção de espectros, contendo as subrotinas INTERDEL e INITIDEL.

```

INTERDEL: CALL ADDRESS ; chama address (configuracao do mostrador - endereço)
LXI H, AINTER          ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
CALL OUTPT             ; mostra DELA no campo de enderecos
CALL DATMESS          ; chama datmess (configuracao do mostrador - dado)
LXI H, DINTER         ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT             ; mostra Y. no campo de dados
LXI H, INTERVAL       ; carrega HL com endereço do intervalo de tempo entre espectros
MOV B,M               ; carrega B com byte mais significativo
INX H                 ; incrementa HL
MOV C,M               ; carrega C com byte menos significativo
WAIT: CALL TIMEDEL    ; decrementa 0,1 segundo
DCX B                 ; decrementa contador de tempo
MOV A,B               ; verifica se terminou
ORA C                 ; (ora = 1 se A ou C = 1)
JNZ WAIT              ; se não terminou, continua esperando
CALL ENDJOB2          ; se terminou, envia asterisco para microcomputador
JMP RUNSPEC           ; retorna para RUNSPEC

```

```

INITIDEL: CALL ADDRESS ; chama address (configuracao do mostrador - endereço)
LXI H, AINITI          ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
CALL OUTPT             ; mostra DELA no campo de enderecos
CALL DATMESS          ; chama datmess (configuracao do mostrador - dado)
LXI H, DINITI         ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT             ; mostra Y. no campo de dados
LXI H, INITIAL        ; carrega HL com endereço do intervalo de tempo inicial
MOV B,M               ; carrega B com o byte mais significativo
INX H                 ; incrementa HL
MOV C,M               ; carrega C com o byte menos significativo
JMP WAIT              ; inicia contagem de tempo

```

```

TIMEDEL: LXI D, 2C01h ; carrega par DE como contador
DECRE: DCX D          ; decrementa par DE
MOV A,E              ; move conteúdo de E para A
CPI 00h              ; verifica se terminou o contador E
JNZ DECRE            ; se não, continua contando
MOV A,D              ; move conteúdo de D para A

```

```

CPI 00h           ; verifica se terminou o contador D
JNZ DECRE        ; se nao, continua contando.
RET              ; retorna

```

; **ENDJOB2:** envia um asterisco para o microcomputador, comunicando que a  
; tarefa foi realizada e retorna

```

ENDJOB2: MVI A, 2Ah       ; carrega A com asterisco (*)
          CALL OUTUSART    ; envia * para o microcomputador
          RET              ; retorna

```

; **CALSPEC:** mostra mensagem de calibração do PDAS

```

CALSPEC: CALL ADDRESS    ; chama address (configuracao do mostrador - endereco)
          LXI H, ACAL      ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
          CALL OUTPT       ; mostra CAL no campo de enderecos
          CALL DATMESS     ; chama datmess (configuracao do mostrador - dado)
          LXI H, DCAL      ; carrega HL com endereco inicial da mensagem do campo de dado
          CALL OUTPT       ; mostra SP no campo de dados
          JMP ERRO         ; espera endereco para onde o programa deve ser desviado

```

; Mensagens para o monitor e parâmetros

```

ASEND: DB 05h           ; mensagem da subrotina send
          DB 0Eh
          DB 0Dh
          DB 0Ah         ; campo de enderecos: SEDA
DSEND: DB 00h
AVRMESS: DB 05h        ; campo de dados: no. de espectros (default = 5)

```

; Parâmetros

```

AVERAGE: DB 07h        ; contador do numero de espectros (default = 7)
SCANTIME: DB 03h        ; tempo de integracao do espectro (default = 3)
INTERVAL: DB 00h        ; intervalo de tempo entre espectros (default = 0)
          DB 00h         ; maximo de FFFFh.
INITIAL: DB 00h         ; intervalo de tempo inicial para obtencao de dados
          DB 00h         ; (default = 0), maximo de FFFFh.

```

```

ASPEC: DB 05h           ; mensagem da subrotina spec
          DB 12h
          DB 0Eh
          DB 0Ch         ; campo de enderecos: SPEC
                          ; campo de dados: no. de espectros

```

```

ACLEAR: DB 0Ch          ; mensagem da subrotina clear
          DB 11h
          DB 0Eh
          DB 0Ah         ; campo de enderecos: CLEA
DCLEAR: DB 14h          ; campo de dados: R.
          DB 24h

```

```

ARUN: DB 14h           ; mensagem da subrotina run

```

```

DB 0Eh
DB 0Ah
DB 0Dh          ; campo de enderecos: READ
                ; campo de dados: no. de espectros

AINTER: DB 0Dh          ; mensagem da subrotina interdel
        DB 0Eh
        DB 11h
        DB 0Ah          ; campo de enderecos: DELA
DINTER: DB 0A0h
        DB 01h          ; campo de dados: Y1.

AINITI: DB 0Dh          ; mensagem da subrotina initidel
        DB 0Eh
        DB 11h
        DB 0Ah          ; campo de enderecos: DELA
DINITI: DB 0A0h
        DB 0C0h          ; campo de dados: Yo.

ACAL: DB 0Ch          ; mensagem da subrotina calspec
       DB 0Ah
       DB 11h
       DB 15h          ; campo de enderecos: CAL
DCAL: DB 05h
       DB 12h          ; campo de dados: SP

END

```

---

**Listagem VIII.3.** Programa de controle do espectrofotômetro com o procedimento 2 de varredura (as sub-rotinas que não listadas são idênticas às da Listagem VIII.2).

;Equates:

; **RUNSPEC:** obtêm os espectros através do arranjo de diodos, possibilitando  
; alterar os parâmetros, limpar as memórias onde estes espectros serão  
; armazenados e enviar estes espectros para o microcomputador.

; **PARAMETERS:** altera os parâmetros do espectrofotômetro:  
; - nº de varreduras para se obter um espectro (até 05): averagnumber  
; - tempo de integração inicial (01h a FFFFh): baseline  
; - tempo de integração (mínimo de 03h e máximo de FFh): scantime  
; - intervalo de tempo entre os espectros (0.5 a 6500 s): intervaltime  
; - intervalo de tempo para se iniciar a obtenção de dados (0 a 6500 s): initialtime

PARAMETERS:  
CALL DATMESS ; configuracao do mostrador - dado

```

LXI H, DLOAD      ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT        ; mostra Pr. no campo de dados
CALL INIADD       ; endereço inicial (par HL) onde se encontram os parametros
MVI B, 0Ah        ; carrega B com 8 bytes (2 parametros c/ 1 byte e 3 par. c/ 2 bytes)
NEXTPAR: CALL RECEIVE
                  ; BA=P1 (avrness), B9=P2 (average), B8=P3+sig, B7=P3-sig (l.
                  ; base)
MOV M,A          ; B6 = P4+sig, B5 = P4-sig (scantime)
INX H            ; B4 = P5+sig, B3 = P5-sig (interval)
DCR B           ; B2 = P6+sig, B1 = P6-sig (initial)
JNZ NEXTPAR     ; parametros armazenados sequencialmente a partir de HL
CALL ENDJOB2    ; envia um asterisco para o microcomputador
JMP RUNSPEC     ; retorna para o menu de RUNSPEC

```

; **CLEAR:** limpa as memórias do 8085 onde serão armazenados os espectros

; **RUN:** controla o arranjo de diodos para leitura e armazenamento dos espectros  
;na memória apontada por HL

```

RUN: CALL ADDRESS ; configuracao do mostrador - endereco
LXI H, ARUN      ; carrega HL com end. inicial da mensagem do campo de enderecos
CALL OUTPT       ; mostra READ no campo de enderecos
CALL DATMESS     ; configuracao do mostrador - dado
LXI H, DSEND     ; carrega HL com endereço inicial da mensagem do campo de dados
CALL OUTPT       ; mostra "no. de espectros" no campo de dados
LXI H, AVERAGE  ; carrega HL com o end. inicial onde estao as variaveis do programa
MOV A, M         ; carrega A com o no. de espectros contido em HL (feito via micro)
STA 30DAh       ; transfere numero de espectros para contador
INX H           ; incrementa HL
MOV A,M         ; carrega A com delay para corrigir linha base
STA 3092h       ; transfere 1o. byte (+ sig.) do delay inicial
INX H           ; incrementa HL
MOV A,M         ; carrega A com delay para corrigir linha base
STA 3091h       ; transfere 2o. byte (- sig.) do delay inicial
LXI H, 3200h    ; carrega HL com o endereço inicial dos espectros
SCAN: PUSH H    ; salva HL na pilha
LXI H, SCANTIME ; carrega HL com endereço do tempo de varredura
MOV D, M        ; } carrega par DE com tempo para a conversao
INX H           ; } do AD (entre 0003 e FFFF)
MOV E, M        ; } carrega 1o. +sig., depois -sig.
POP H           ; retorna HL
CALL RESSET     ; reseta a matriz de diodos
LXI B, 0001h    ; carrega BC com delay inicial para corrigir linha base
LBCOR: DCX B    ; (default = 1 , maximo = FFFF)
MOV A,B        ;
ORA C          ; verifica o tempo de integracao
JNZ LBCOR     ; retorna se nao terminou
LXI B, 0200h   ; carrega BC com 1 espectro
MVI A, 2Dh    ; wr=1, rd=0, s=1, c=1, r=0, en=1
OUT 22h       ; levanta linha de start do PDA
MVI A, 25h    ; wr=1, rd=0, s=1, c=0, r=0, en=1
OUT 22h       ; abaixa a linha de clock do PDA
MVI A, 21h    ; wr=1, rd=0, s=0, c=0, r=0, en=1
OUT 22h       ; abaixa linha de start: pulso perdido
DIODE: MVI A, 29h ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } pulso de
OUT 22h       ; levanta a linha de clock } clock que
MVI A, 21h    ; wr=1, rd=0, s=0, c=0, r=0, en=1 } coloca o
OUT 22h       ; abaixa a linha de clock } diodo

```

```

MVI A, 29h           ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } para se fazer
OUT 22h             ; levanta a linha de clock   } leitura via AD
MVI A, 28h           ; wr=0, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } pulso
OUT 22h             ; abaixa a linha de write do AD } negativo
MVI A, 29h           ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } no write
OUT 22h             ; levanta a linha de write do AD } do ADC
PUSH D              ; salva o conteudo dos registradores D e E
TIME: DCX D          ; } conversao do AD, minimo = 03h e maximo = FFFFh
MOV A,D             ; } pode ser alterado atraves do microcomputador
ORA E               ; verifica o tempo de integracao
JNZ TIME            ; se nao terminou, retorna
POP D               ; retorna os valores dos registradores D e E
IN 21h              ; leitura do AD
MOV M,A             ; coloca o valor lido na memoria apontada por HL
INX H               ; incrementa endereco da memoria
MOV A,B             ; move B para A
CPI 00h             ; compara com zero. Se = zero, metade da varredura foi efetuada
CZ ICRTIME          ; entao, incrementa tempo de conversao do AD
MVI A, 39h           ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=1, en=1
OUT 22h             ; levanta a linha de reset do PDA
DCX B               ; decrementa par BC (contador dos diodos)
MOV A,B             ; verifica se todos os diodos foram lidos
ORA C               ; (ora = 1, se A ou C = 1)
JNZ DIODE           ; se nao, retorna para ler outro diodo
MOV A,H             ; move contador de espectros H para A
CPI 40h             ; verifica se terminou (40h = 5 espectros - default)
JM SCAN             ; se nao terminou, obtem outro espectro
CALL ENDJOB2        ; envia asterisco para o microcomputador
JMP RUNSPEC         ; retorna para RUNSPEC

```

**; RESET:** reinicializa ("reset") o arranjo de diodos

```

RESET: LXI B, 0200h ; carrega BC com 1 espectro
MVI A, 2Dh          ; wr=1, rd=0, s=1, c=1, r=0, en=1
OUT 22h             ; levanta linha de start do PDA
MVI A, 25h          ; wr=1, rd=0, s=1, c=0, r=0, en=1
OUT 22h             ; abaixa a linha de clock do PDA
MVI A, 21h          ; wr=1, rd=0, s=0, c=0, r=0, en=1
OUT 22h             ; abaixa linha de start: pulso perdido
RDIODE: MVI A, 29h  ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } pulso de
OUT 22h             ; levanta a linha de clock   } clock que
MVI A, 21h          ; wr=1, rd=0, s=0, c=0, r=0, en=1 } coloca o
OUT 22h             ; abaixa a linha de clock   } diodo
MVI A, 29h          ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=0, en=1 } para se fazer
OUT 22h             ; levanta a linha de clock   } leitura via AD
MVI A, 39h          ; wr=1, rd=0, s=0, c=1, r=1, en=1
OUT 22h             ; levanta a linha de reset do PDA
DCX B               ; decrementa par BC (contador dos diodos)
MOV A,B             ; verifica se todos os diodos foram lidos
ORA C               ; (ora = 1, se A ou C = 1)
JNZ RDIODE          ; se nao, retorna para ler outro diodo
RET                 ; retorna

```

**; ICRTIME:** incrementa o tempo de conversao do AD

```

ICRTIME: INX D       ; incrementa contador DE
RET                 ; retorna

```

- ; **SEND:** envia dados (espectros) para o microcomputador
- ; **TRANSMIT:** o byte existente na memória apontada por HL é enviado ao microcomputador como um caracter ASCII.
- ; **TIMEDEL:** decrementa intervalo de tempo entre os espectros e para iniciar a obtenção de espectros, contendo as subrotinas INTERDEL e INITDEL
- ; **ENDJOB2:** envia um asterisco para o microcomputador, comunicando que a tarefa foi realizada e retorna
- ; **CALSPEC:** mostra mensagem de calibração do PDAS

; Mensagens para o monitor e parâmetros

; Parâmetros

AVERAGE: DB 40h	; contador do numero de espectros (default = 7)
BASELINE: DB 00h	; delay para correcao da linha base
DB 01h	; default = 1 , maximo = FFFF
SCANTIME: DB 00h	; tempo de integracao do espectro (default = 3)
DB 03h	; maximo de FFFFh
INTERVAL: DB 00h	; intervalo de tempo entre espectros (default = A)
DB 0Ah	; maximo de FFFFh.
INITIAL: DB 00h	; intervalo de tempo para intervalo de tempo entre
DB 00h	; espectros (default = 0), maximo de FFFFh.

---

#### Listagem VIII.4. Programas de controle do espectrofotômetro em códigos hexadecimais.

- Procedimento 1 (pdaspr01.hex):

```
:20300000CDA708216731CDB702CDAC08215F31CDB7023E02D3203E29D322C31B08CDAC0847
:2030200021BB08CDB702CD5A08CD630877C6022377060523CD63087705C23330CD4031C3DE
:203040000030CDA708216B31CDB702CDAC08216F31CDB702210032160072237CFE40FA59AE
:2030600030CD4031C30030CDA708217131CDB702CDAC08215F31CDB70221613156235E21C7
:2030800000320100023E2DD3223E25D3223E21D3223E29D3223E21D3223E29D3223E28D3AA
:2030A000223E29D322D51DC2A630D1DB2177233E39D3220B78B1C2913015C28230CD4031B7
:2030C000C30030CDA708215B31CDB702CDAC08215F31CDB702CD5208CDE830231B7AB3C25D
:2030E000D830CD4031C300307ECD9308C9CDA708217531CDB702CDAC08217931CDB702212C
:20310000633146234ECD2F310B78B1C20531CD4031C30030CDA708217B31CDB702CDAC088A
:20312000217F31CDB70221653146234EC3053111012C1B7BFE00C232317AFE00C23231C974
:203140003E2ACD9308C9CDA708218131CDB702CDAC08218531CDB702C31B08050E0D0A0013
:203160000507030000000005120E0C0C110E0A1424140E0A0D0D0E110AA0010D0E110AA0BC
:07318000C00C0A1115051235
:00000001FF
```

- Procedimento 2 (pdaspr02.hex):

```
:20300000CDA70821B331CDB702CDAC0821A831CDB7023E02D3203E29D322C31B08CDAC08B2
:2030200021BB08CDB702CD5A08060ACD6308772305C22B30CD8931C30030CDA70821B731F4
:20304000CDB702CDAC0821BB31CDB702210032160072237CFE40FA5130CD8931C30030CD5C
:20306000A70821BD31CDB702CDAC0821A831CDB70221AA317E32DA30237E329230237E32ED
:203080009130210032E521AD3156235EE1CDE4300101000B78B1C293300100023E2DD32281
:2030A0003E25D3223E21D3223E29D3223E21D3223E29D3223E28D3223E29D322D51B7AB384
:2030C000C2BD30D1DB21772378FE00CC0A313E39D3220B78B1C2A8307CFE40FA8530CD8964
:2030E00031C300300100023E2DD3223E25D3223E21D3223E29D3223E21D3223E29D3223E53
:2031000039D3220B78B1C2F330C913C9CDA70821A431CDB702CDAC0821A831CDB702CD52AB
:2031200008CD3131231B7AB3C22131CD8931C300307ECD9308C9CDA70821C131CDB702CDCE
:20314000AC0821C531CDB70221AF3146234ECD78310B78B1C24E31CD8931C30030CDA70885
:2031600021C731CDB702CDAC0821CB31CDB70221B13146234EC34E3111012C1B7BFE00C2FC
:203180007B317AFE00C27B31C93E2ACD9308C9CDA70821CD31CDB702CDAC0821D131CDB7F2
:2031A00002C31B08050E0D0A00054000010003000A000005120E0C0C110E0A1424140E0AE0
:1331C0000D0D0E110AA0010D0E110AA0C00C0A111505122F
:00000001FF
```

## VIII.4. Programa de Controle do Sistema Mínimo

Este programa foi escrito em QuickBasic 4.5 e possibilita que o microcomputador IBM-PC controle o sistema mínimo TSI 8085 e, portanto, o espectrofotômetro. A Listagem VIII.5 mostra apenas as rotinas principais e alguns menus para que se possa verificar como este programa foi estruturado.

### Listagem VIII.5. Programa de controle do sistema mínimo.

```

***** PHOTODIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER - 1 *****
menu:
  CLS
  LOCATE 8, 20: PRINT "* PHOTODIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER *"
  LOCATE 10, 21: PRINT "This program allows to control PDAS."
  LOCATE 11, 21: PRINT "Press following keys on PDAS board"
  LOCATE 12, 21: PRINT "to initiate comunication:"
  LOCATE 13, 21: PRINT "1. <INICIO PROG>"
  LOCATE 14, 21: PRINT "2. <0> <8> <0> <0>"
  LOCATE 15, 21: PRINT "3. <EXE>"
  LOCATE 16, 21: PRINT "Then, press <ENTER> to connect PDAS."
  LOCATE 19, 27: PRINT "Press <ESC> to exit"

chooseprogram:
  CLS
  LOCATE 8, 20: PRINT "* PHOTODIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER *"
  LOCATE 12, 18: PRINT "Press <1> to load non-correcting baseline program"
  LOCATE 14, 18: PRINT "Press <2> to load correcting baseline program"
  LOCATE 19, 27: PRINT "Press <ESC> to exit"

' valores "default" das variáveis (parâmetros)

IF flagprog% = 1 THEN      ' integração constante
  averagenumber% = 5: averagenumber$ = "05" ' espectro é média de "averagenumber" varreduras
  scantime = 44: scantime$ = "03"          ' tempo de varredura de um espectro
ELSEIF flagprog% = 2 THEN ' integração variável
  averagenumber% = 5: averagenumber$ = "40": avrmess$ = "05"
  scantime = 294: scantime$ = "0003"
  b1cor = 12.7: b1cor$ = "0002"           ' correção da linha base
END IF

specnumber% = 1: specnumber$ = "01"       ' número de espectros
intervaltime = 1: intervalttime$ = "000A" ' intervalo de tempo entre espectros
initialtime% = 0: initialtime$ = "0000"   ' intervalo de tempo para iniciar obtenção de espectros

```

' endereços para comunicação com o sistema mínimo:

```
load$ = "082F": menu$ = "0809": parameter$ = "301D": read$ = "3600": runspec$ = "3000"
IF flagprog% = 1 THEN
  calibration$ = "3146": clear$ = "3042": intervaldelay$ = "30ED"
  initialdelay$ = "3114": run$ = "3067": send$ = "30C3"
  'iniadd$ = "3160" (subrotina parameters1)
ELSEIF flagprog% = 2 THEN
  calibration$ = "318F": clear$ = "303A": intervaldelay$ = "3136"
  initialdelay$ = "315D": run$ = "305F": send$ = "310C"
  'iniadd$ = "31A9" (subrotina parameters2)
END IF
```

loadprogram: ' carrega programa principal no sistema mínimo

```
CLOSE #1
OPEN "COM1:9600,N,8,1,RS,CD0,CS0,DS0,RB32000,TB32000" FOR RANDOM AS #1
OPEN program$ FOR INPUT AS #2
n% = 0 ' n% = numero de linhas do arquivo
WHILE NOT EOF(2)
  n% = n% + 1
  LINE INPUT #2, lin$(n%)
WEND
endbyte$ = MID$(lin$(n% - 1), 2, 2) ' número de bytes da última linha do arquivo *.hex
endbyte% = HEXTODEC(endbyte$) ' transforma nª de bytes de hexa para decimal
numbytes% = 32 * (n% - 2) + endbyte%
numbytes$ = FOURHEX$(numbytes%)
adress$ = MID$(lin$(1), 4, 4)
CALL password: PRINT #1, load$; PRINT #1, numbytes$; PRINT #1, adress$;
FOR i% = 1 TO (n% - 2)
  lin$(i%) = MID$(lin$(i%), 10, 64)
  PRINT #1, lin$(i%);
NEXT i%
lin$(n% - 1) = MID$(lin$(n% - 1), 10, (endbyte% * 2))
PRINT #1, lin$(n% - 1);
CLOSE #2
CALL endjob
```

' envio dos valores "default" para o sistema mínimo.

```
CALL password: PRINT #1, parameter$; CALL parameters(flagprog%): CALL endjob
CALL password: PRINT #1, menu$;
```

comunication: ' menu principal de comunicação

```
CLS
LOCATE 8, 20: PRINT "SPECTROPHOTOMETER COMMUNICATION MENU"
LOCATE 10, 22: PRINT "Press <C> to Calibrate PDAS"
LOCATE 12, 22: PRINT "Press <R> to Run spectrum"
LOCATE 14, 22: PRINT "Press <D> to Display spectrum"
LOCATE 16, 22: PRINT "Press <ESC> to go back to main menu"
```

calmenu: ' calibração do espectrofotômetro

```
CALL password: PRINT #1, calibration$;
CLS
LOCATE 8, 20: PRINT "CALIBRATION OF PHOTODIODE ARRAY SPECTROPHOTOMETER"
```

```
LOCATE 10, 20: PRINT "Press <ALT+S> to set up PDAS internal parameters"
LOCATE 12, 20: PRINT "Press <R> to Run calibration spectrum"
LOCATE 14, 20: PRINT "Press <ESC> to return"
```

pdascal:

```
CALL setnumbytes(numbytes$, numbytes%)
CALL readspec(run$, send$, numbytes$, read$, mspec%())
CALL password: PRINT #1, calibration$;
FOR n% = 1 TO 512          ' média de varreduras para obtenção do espectro
  mspec!(n%) = (mspec%(n%) / averagenumber%)
NEXT n%
CALL graphic              ' mostra espectro na tela (não consta nesta listagem)
OPEN spectrum$ FOR BINARY AS #4      ' salva espectro de calibração
FOR n% = 1 TO 512
  PUT #4, , mspec!(n%)
NEXT n%
CLOSE #4
```

' escolha de pares diodo x comprimento de onda para calibração

```
OPEN wavediod$ FOR OUTPUT AS #3
datacount% = 0: n% = 1
LOCATE 22, 5: PRINT "Press "; upchr$, " ", downchr$, " ", rightchr$, " or "; leftchr$, " to choose diode"
```

```
LOCATE 23, 5: PRINT "Press <ENTER> to select diode (2 to 10) and input respective wavelength"
```

```
LOCATE 24, 5: PRINT "Press <W> to Wavelength calibration"; SPC(20);
```

```
LOCATE 25, 5: PRINT "Press <ESC> to return";
```

diodekey:

```
dkey$ = " ": WHILE dkey$ = " ": dkey$ = INKEY$: WEND
PSET (n%, mspec!(n%))          ' move cursor gráfico sobre o espectro
FOR p% = 1 TO 5: PRESET (n%, p%): NEXT p%
SELECT CASE dkey$
  CASE moveup$: n% = n% + 10
  CASE movedown$: n% = n% - 10
  CASE moveright$: n% = n% + 1
  CASE moveleft$: n% = n% - 1
  CASE enter$: GOTO wavelength
  CASE IS = "w", "W"
```

datacount10:

```
datatot% = datacount%
IF datatot% < 2 GOTO diodekey
VIEW: WINDOW
CLOSE #3
GOTO wavecal
CASE escape$
  VIEW: WINDOW
  CLOSE #3
  GOTO calmenu
CASE ELSE: GOTO diodekey
```

```
END SELECT
```

```
LOCATE 3, 71: PRINT SPC(10);
```

```
IF n% > 512 THEN n% = n% - 512
```

```
IF n% < 0 THEN n% = n% + 512
```

```
IF n% = 0 THEN n% = n% + 1
```

```
IF n% < 10 THEN LOCATE 3, 32: PRINT SPC(4);
```

```
LOCATE 3, 32: PRINT n%          ' mostra número do diodo
```

```

LOCATE 3, 50: PRINT USING "###.##"; mspec!(n%) ' mostra intensidade do sinal
PRESET (n%, mspec!(n%)) ' move cursor gráfico sobre o espectro
FOR p% = 1 TO 5: PSET (n%, p%): NEXT p%
GOTO diodekey
wavelength:
  datacount% = datacount% + 1
inwave: ' entrada do comprimento de onda relativo ao diodo
  LOCATE 3, 71: PRINT SPC(60);
  LOCATE 3, 71: LINE INPUT "", wave$
  diode(datacount%) = n%
  wave(datacount%) = VAL(wave$)
  PRINT #3, datacount%; diode(datacount%); wave(datacount%)
  IF datacount% = 10 THEN GOTO datacount10
  GOTO diodekey
wavecal: ' mostra os pares escolhidos diodo/comprimento de onda
  CLS
  OPEN wavediod$ FOR INPUT AS #3
  LOCATE 8, 26: PRINT "CALIBRATION DATA FOR PDAS"
  LOCATE 10, 22: PRINT "data"; SPC(5); "diode"; SPC(5); "wavelength (nm)"
  dataline% = 10
  WHILE NOT EOF(3)
    dataline% = dataline% + 1
    INPUT #3, datacount%, diode(datacount%), wave(datacount%)
    LOCATE dataline%, 23: PRINT USING "##"; datacount%;
    PRINT SPC(7); : PRINT USING "###"; diode(datacount%);
    PRINT SPC(10); : PRINT USING "###.##"; wave(datacount%)
  WEND
  CLOSE #3

  LOCATE dataline% + 2, 24: PRINT "Press 1 to"; datatot%; "to delete data" ' não consta nesta listagem
  LOCATE dataline% + 3, 24: PRINT "Press <C> to calibration calcule";
  LOCATE dataline% + 4, 24: PRINT "Press <ESC> to return";

calcule:
  OPEN wavediod$ FOR INPUT AS #3
  WHILE NOT EOF(3)
    INPUT #3, datacount%, diode(datacount%), wave(datacount%)
  WEND
  CLOSE #3
  CALL leastsq(datacount%, diode(), wave(), angcof, lincof, corr)
  firstdiode = lincof + angcof
  lastdiode = lincof + (angcof * 512)
  resolution = (lastdiode - firstdiode) / 512
  LOCATE dataline% + 2, 4:
  PRINT "range = "; : PRINT USING "###.##"; lastdiode; : PRINT " to "; :
  PRINT USING "###.##"; firstdiode; : PRINT " nm"; SPC(3); :
  PRINT "resol. = "; : PRINT USING "#.###"; ABS(resolution); : PRINT " nm/diode"; SPC(3); :
  PRINT "correl. = "; : PRINT USING "#.#####"; ABS(corr);
  OPEN leastsqu$ FOR OUTPUT AS #3
  PRINT #3, firstdiode; lastdiode; resolution; corr
  CLOSE #3
  OPEN paramter$ FOR OUTPUT AS #3
  PRINT #3, specnumber%; intervaltime; initialtime%; averagenumber%; scantime; blcor
  CLOSE #3

```

```
CALL password: PRINT #1, menu$;
GOTO comunicacion
```

runpdas:

```
CLS
LOCATE 8, 30: PRINT "RUN SPECTRA IN PDAS"
LOCATE 10, 22: PRINT "Press <S> to Set up PDAS parameters"
LOCATE 12, 22: PRINT "Press <R> to Run spectra"
LOCATE 14, 22: PRINT "Press <B> to run Blank spectrum"
LOCATE 16, 22: PRINT "Press <ESC> to go back to comunicacion menu"
```

```
CALL password: PRINT #1, runspec$;
CALL password: PRINT #1, clear$;      ' limpa memória do espectrofotômetro
CALL endjob
```

setup: 'ajusta parâmetros do espectrofotômetro

```
CLS
LOCATE 8, 20: PRINT "SET UP SPECTROPHOTOMETER PARAMETERS"
CALL password: PRINT #1, parameter$;
LOCATE 10, 12: PRINT "1. Number of spectra (1 to 255) = "; specnumber%
LOCATE 11, 12: PRINT "2. Elapsed time between spectrum (1.0 to 6500 s) = "; intervaltime; "s"
LOCATE 12, 12: PRINT "3. Elapsed time to initiate data collection (0 to 6500 s) = "; initialtime%; "s"
LOCATE 14, 20: PRINT "Press <1> to <3> to change these parameters"
LOCATE 15, 20: PRINT "Press <ESC> to return"
```

setdown: 'ajusta parâmetros "internos" do espectrofotômetro

```
CLS
LOCATE 8, 20: PRINT "SET UP SPECTROPHOTOMETER INTERNAL PARAMETERS"
CALL password: PRINT #1, parameter$;
LOCATE 10, 12: PRINT "1. Number of spectra for average (1 to 5) = "; averagenumber%
IF flagprog% = 1 THEN
  LOCATE 11, 12: PRINT "2. Time to scan a single spectrum (44 to 628 ms) = "; scantime; "ms"
  LOCATE 13, 20: PRINT "Press <1> or <2> to change these parameters"
  LOCATE 14, 20: PRINT "Press <ESC> to return"
ELSEIF flagprog% = 2 THEN
  LOCATE 11, 12: PRINT "2. Time to scan a single spectrum (294 to 1314 ms) = "; scantime; "ms"
  LOCATE 12, 12: PRINT "3. Delay to correct baseline (12.7 to 535.1 ms) = "; blcor; "ms"
  LOCATE 14, 20: PRINT "Press <1> to <3> to change these parameters"
  LOCATE 15, 20: PRINT "Press <ESC> to return"
END IF
```

blank: 'obtem espectro de referência

```
CALL password: PRINT #1, parameter$;
CALL parameters(flagprog%): CALL endjob
```

iname:

```
CLS
LOCATE 8, 20: PRINT "SCANNING BLANK SPECTRUM IN PDAS"
LOCATE 10, 20: INPUT "File: ", blankname$
blankname$ = UCASE$(blankname$ + ".blk")
```

blank2:

```
CALL setnumbytes(numbytes$, numbytes%)
CALL readspec(run$, send$, numbytes$, read$, mspec%())
CALL password
PRINT #1, runspec$;
```

```

inv% = 513
FOR n% = 1 TO 512          ' cálculo da média das varreduras para obtenção do espectro
  inv% = inv% - 1
  bspec!(inv%) = mspec%(n%) / averagenumber%
NEXT n%
CALL graphic              ' mostra espectro na tela (não consta nesta listagem)
VIEW: WINDOW
OPEN blankname$ FOR BINARY AS #4
FOR n% = 1 TO 512
  PUT #4, , bspec!(n%)
NEXT n%
CLOSE #4
CALL password: PRINT #1, parameter$;: CALL parameters(flagprog%): CALL endjob
GOTO runpdas

```

```

runspectra:              ' obtem espectros
CLS
IF blankname$ = "" THEN
  LOCATE 10, 22: PRINT "BLANK SPECTRUM WAS NOT SCANNED"
  SLEEP
  GOTO runpdas
END IF
lenfile% = LEN(blankname$)
FOR if% = 1 TO lenfile%
  point$ = MID$(blankname$, if%, 1)
  IF point$ = "." THEN
    filename$ = MID$(blankname$, 1, if% - 1)
    EXIT FOR
  END IF
NEXT if%
paraname$ = UCASE$(filename$ + ".prm")
filename$ = UCASE$(filename$ + ".pda")
CALL setnumbytes(numbytes$, numbytes%)
LOCATE 8, 20: PRINT "SCANNING"; specnumber%; "SPECTRA IN PDAS"
OPEN paraname$ FOR OUTPUT AS #6
PRINT #6, specnumber%; intervaltime; initialtime%; averagenumber%; scantime; bcolor; firstdiode;
lastdiode; resolution
CLOSE #6
OPEN filename$ FOR BINARY AS #5
IF initialtime% > 0 THEN          ' intervalo de tempo antes do início da obtenção de espectros
  CALL password
  PRINT #1, initialdelay$;
  LOCATE 14, 20: PRINT "Waiting"; initialtime%; "s to initiate data collection"
  CALL endjob
END IF
LOCATE 14, 20: PRINT SPC(40);: LOCATE 14, 25: PRINT "Please, wait !"
s% = 0
LOCATE 11, 20: PRINT "Number of spectra obtained: "; s%
FOR s% = 1 TO specnumber%      ' obtem "specnumber" espectros
  CALL readspec(run$, send$, numbytes$, read$, mspec%())
  IF s% < specnumber% THEN
    CALL password
    PRINT #1, intervaldelay$;
  END IF

```

```

FOR n% = 512 TO 1 STEP -1      ' média de "averagenumber" varreduras para um espectro
  mspec!(n%) = mspec%(n%) / averagenumber%
  PUT #5, , mspec!(n%)      ' salva dados em arquivo determinado pelo usuário
NEXT n%
LOCATE 11, 48: PRINT s%
BEEP
IF s% < specnumber% THEN CALL endjob
NEXT s%
CLOSE #5
LOCATE 8, 20: PRINT "SPECTRA WERE RUN IN PDAS AND SAVED"
LOCATE 10, 20: PRINT "File: "; filename$
LOCATE 11, 20: PRINT "number of spectra: "; specnumber%; SPC(10);
LOCATE 13, 20: PRINT "Press <D> to Display these spectra" ' não consta nesta listagem
LOCATE 14, 20: PRINT "Press <K> to Kill this file and return" ' não consta nesta listagem
LOCATE 15, 20: PRINT "Press <ESC> to return"

```

```
END
```

```

SUB endjob      ' recebe um asterisco do sistema minimo
  ej$ = ""
  WHILE ej$ <> "*"
    ej$ = INPUT$(1, #1)
  WEND
END SUB

```

```

FUNCTION FOURHEX$(dec%)      ' transforma decimal em hexadecimal de 4 dígitos
  hec$ = HEX$(dec%)
  lenhec = LEN(hec$)
  IF lenhec < 4 THEN
    FOR i = lenhec TO 3
      hec$ = "0" + hec$
    NEXT
  END IF
  FOURHEX$ = hec$
END FUNCTION

```

```

FUNCTION HEXTODEC(as$)      ' transforma hexadecimal em decimal
  DIM c$(10), a(10)
  num = 0
  n = LEN(as$)
  FOR i = 1 TO n
    c$(i) = MID$(as$, i, 1)
    a(i) = VAL(c$(i))
    IF c$(i) = "A" THEN a(i) = 10
    IF c$(i) = "B" THEN a(i) = 11
    IF c$(i) = "C" THEN a(i) = 12
    IF c$(i) = "D" THEN a(i) = 13
    IF c$(i) = "E" THEN a(i) = 14
    IF c$(i) = "F" THEN a(i) = 15
    num = num + (16 ^ (n - i)) * a(i)
  HEXTODEC = num
  NEXT i
END FUNCTION

```

```

SUB parameters (flagprog%)      'envia parâmetros para o sistema mínimo
  IF flagprog% = 1 THEN
    iniadd$ = "3160" 'endereço inicial onde serão alocados os parâmetros
    PRINT #1, iniadd$; PRINT #1, average$;
    PRINT #1, scan$; PRINT #1, interval$;
    PRINT #1, initial$;
  ELSEIF flagprog% = 2 THEN
    iniadd$ = "31A9" 'endereço inicial onde serão alocados os parâmetros
    PRINT #1, iniadd$; PRINT #1, avrmess$;
    PRINT #1, average$; PRINT #1, blcor$;
    PRINT #1, scan$; PRINT #1, interval$;
    PRINT #1, initial$;
  END IF
END SUB

SUB password                    'envia dois asteriscos para o sistema mínimo
  PRINT #1, "***"; PRINT #1, "***";
END SUB

SUB readspec (run$, send$, numbytes$, read$, mspec%())      'obtenção de espectros
  DIM intspec%(512)
  CALL password
  PRINT #1, run$;      'sistema mínimo obtém dados
  CALL endjob: CALL password
  PRINT #1, send$;    'sistema mínimo envia dados para o microcomputador
  PRINT #1, numbytes$;
  PRINT #1, read$;
  ERASE mspec%
  FOR n% = 1 TO averagenumber%
    FOR m% = 1 TO 512
      int$ = INPUT$(1, #1)
      intspec%(m%) = ASC(int$)
      mspec%(m%) = mspec%(m%) + intspec%(m%)
    NEXT m%
  NEXT n%
  CALL endjob
END SUB

SUB setnumbytes (numbytes$, numbytes%)      'determina nº de bytes que o 8085 deve enviar ao micro
  numbytes$ = "": numbytes% = 0
  numbytes% = averagenumber% * 512
  numbytes$ = FOURHEX$(numbytes%)
END SUB

FUNCTION TWOHEX$(dec%)      'transforma decimal em hexadecimal de 2 dígitos
  dec$ = HEX$(dec%)
  lendec = LEN(dec$)
  IF lendec = 1 THEN dec$ = "0" + dec$
  TWOHEX$ = dec$
END FUNCTION

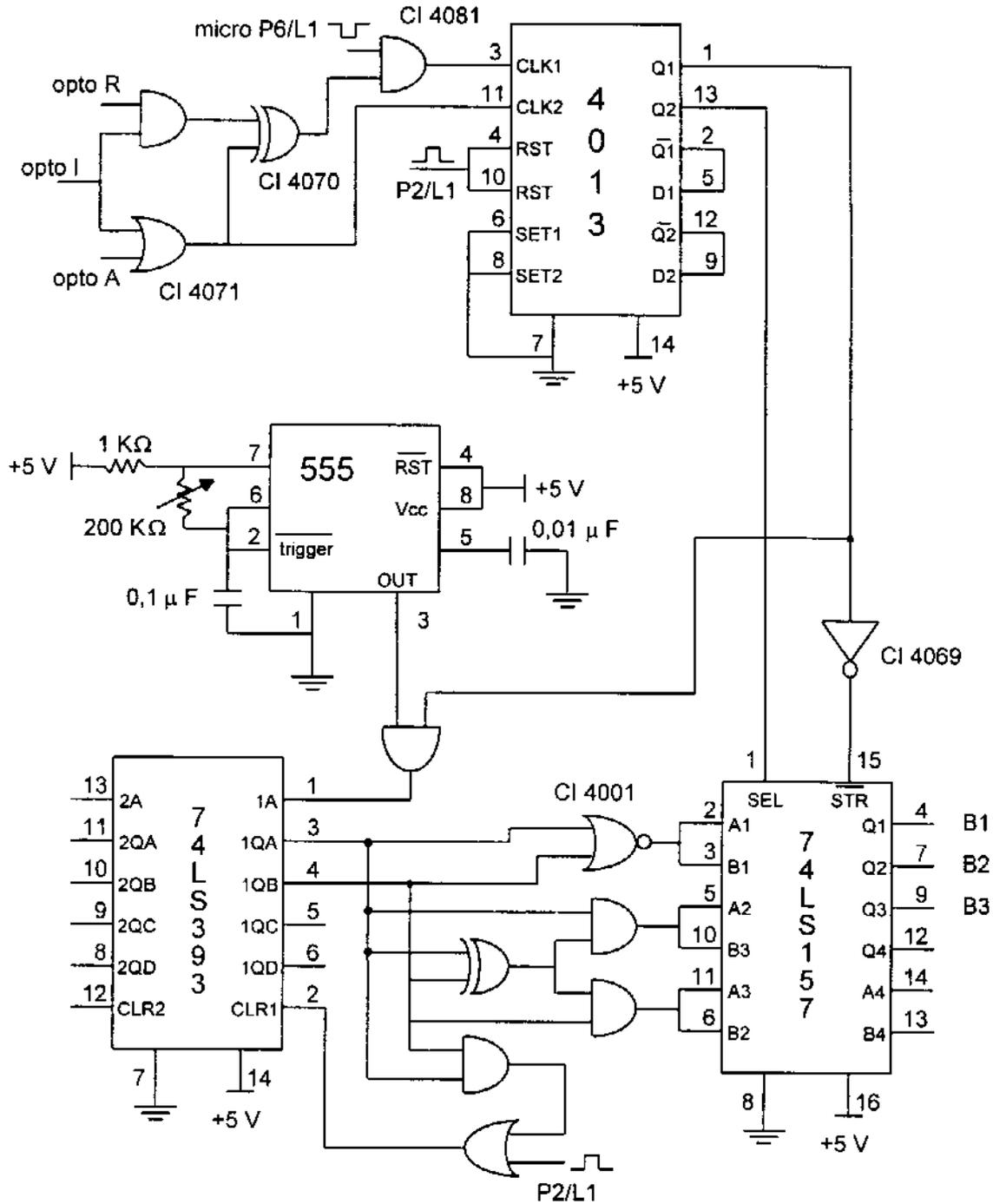
```

## VIII.5. Circuito Eletrônico da Válvula Amostradora

A Figura VIII.3 mostra o circuito eletrônico digital para o controle do motor de passo empregado na construção da válvula amostradora automática. Este circuito é basicamente constituído por um CI 4013 ("flip-flop" duplo, cujas saídas Q se alternam em 0 e 1, a cada transição de nível baixo para alto que pode ocorrer em cada entrada CLK), um CI 74LS393 (contador binário de 4 bits duplo), um CI 74LS157 (seletor de 2 entradas, onde caso  $\overline{STR} = 1$ , então  $Q_n = 0$  e caso  $\overline{STR} = 0$ , então  $Q_n = A_n$ , se  $SEL = 0$  ou  $Q_n = B_n$ , se  $SEL = 1$ ) e um CI 555 (temporizador, que gera os pulsos para o contador binário).

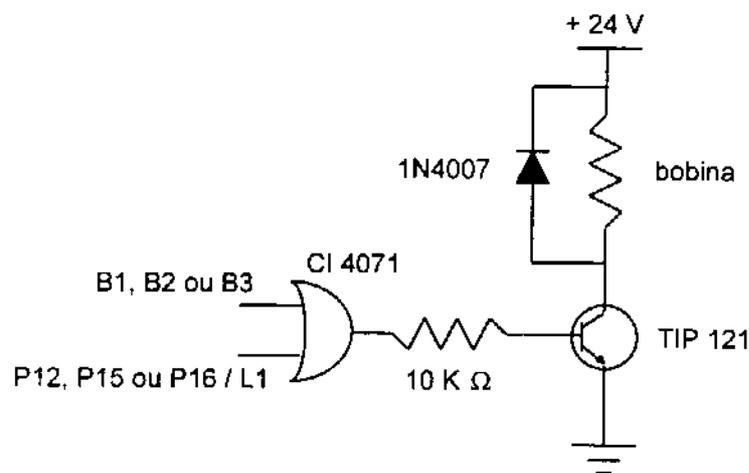
O microcomputador, antes do início de uma análise, reinicializa o circuito, aplicando um pulso positivo no "reset" do flip-flop e no "clear1" do contador, através do bit 0 (P2) do "latch" de controle L1 (Apêndice VIII.8, Figura VIII.10), colocando todas as saídas Q dos CIs 4013, 74LS393 e 74LS157 em nível baixo. Após o "reset", um pulso negativo é aplicado pelo microcomputador, através do bit 2 (P6) do "latch" L1, no "clock 1" do flip-flop, tornando sua saída  $Q_1 = 1$ . Desta forma, os pulsos gerados pelo CI 555 são aplicados na entrada 1A do contador binário, cujos sinais de saída, após selecionados pelo CI 74LS157 ( $SEL = 0$ ,  $Q_n = A_n$ ), acionam as bobinas B1, B2 e B3 do motor (nesta ordem), movendo a válvula para a posição de injeção. Quando a haste localizadora da válvula interrompe o opto I, um pulso é aplicado nos "clock 1" e "clock 2" do flip-flop, tornando as saídas do flip-flop  $Q_1 = 0$  ( $\overline{STR} = 1$  e, portanto,  $Q_n = 0$  - motor desligado) e  $Q_2 = 1$  ( $SEL = 1$ ). Quando, então, a primeira bolha de ar do monossegmento atinge o opto R, um outro pulso é gerado, tornando a saída do flip-flop  $Q_1 = 1$ , o que causa o acionamento das bobinas do motor na ordem B1, B3 e B2, retornando a válvula para a posição de amostragem.

Quando a haste localizadora da válvula interrompe o opto A, o circuito retorna ao estado inicial (nova injeção).



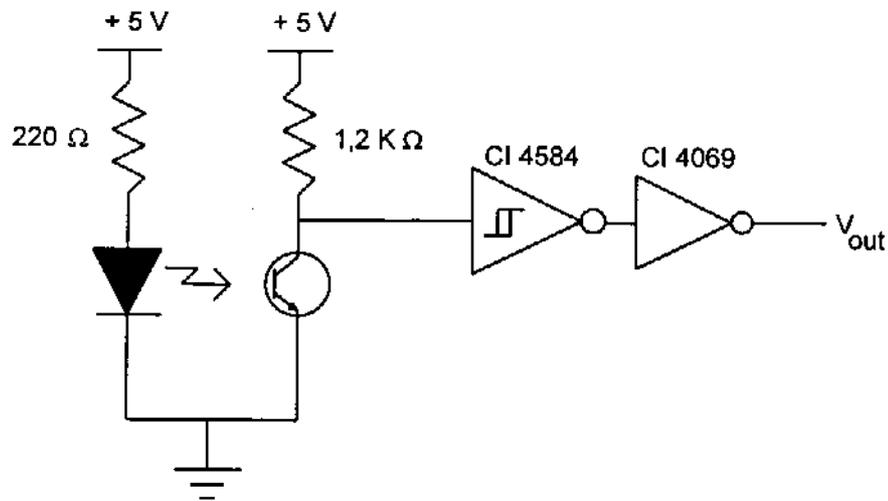
**Figura VIII.3.** Circuito eletrônico digital para controle do motor de passo da válvula amostradora automática.

A Figura VIII.4 mostra o circuito eletrônico para o acionamento de uma das bobinas do motor de passo. Estas bobinas podem ser acionadas diretamente pelo microcomputador, que emprega os bits 4 (P12), 5 (P15) e 6 (P16) do "latch" de controle L1 (Apêndice VIII.8, Figura VIII.10).



**Figura VIII.4.** Circuito eletrônico para acionamento das bobinas do motor de passo (B1, B2 e B3 correspondem, respectivamente, às saídas Q1, Q2 e Q3 do CI 74LS157, mostrado na Figura VIII.3).

A Figura VIII.5 mostra o circuito eletrônico para a extração de sinais dos sensores ópticos "A" e "I". A função do CI 4584 ("schmitt trigger") é tornar as transições de níveis geradas pelo sensor óptico rápidas o suficiente para que o flip-flop responda. Como o "schmitt trigger" inverte o sinal, foi empregado o CI 4069 para reinvertê-lo. Neste circuito, a saída  $V_{out}$  está em nível baixo quando o sensor não está interrompido e nível alto quando ocorre a interrupção. O microcomputador tem acesso ao estado dos sensores ópticos "A" e "I" através dos bits 0 (P3) e 1 (P4) do "latch" de controle L2 (Apêndice VIII.8, Figura VIII.11).



**Figura VIII.5.** Circuito eletrônico para extração de sinais dos sensores ópticos "A" e "I" da válvula amostradora automática.

O circuito eletrônico para extração de sinais do sensor óptico "R" é mostrado na Figura VIII.6 (Apêndice VIII.6), pois é também um dos sensores do primeiro módulo automático de adição de reagentes.

## VIII.6. Circuito Eletrônico do Módulo de Adição de Reagentes

A Figura VIII.6 mostra o circuito eletrônico necessário para se extrair os sinais lógicos dos sensores ópticos, cujos estados podem ser acessados pelo microcomputador através dos bits 2 (P7), 3 (P8), 4 (13) e 5 (P14) do "latch" de controle L2 (Apêndice VIII.8, Figura VIII.11), empregados na construção do módulo automático de adição de reagentes\*. O CI 741 é usado para se obter os níveis lógicos, pois a transição ar/solução não é suficiente para gerá-los. O resistor variável e o capacitor colocados após este CI têm a função de atrasar a resposta do sensor óptico, tornando-o imune à passagem de pequenas bolhas de ar. A saída  $V_{out}$  de cada circuito alimenta a entrada de "clock" de um flip-flop (CI 4013), para acionamento das válvulas solenóides conforme a passagem das bolhas de ar, como mostrado na Figura VIII.7.

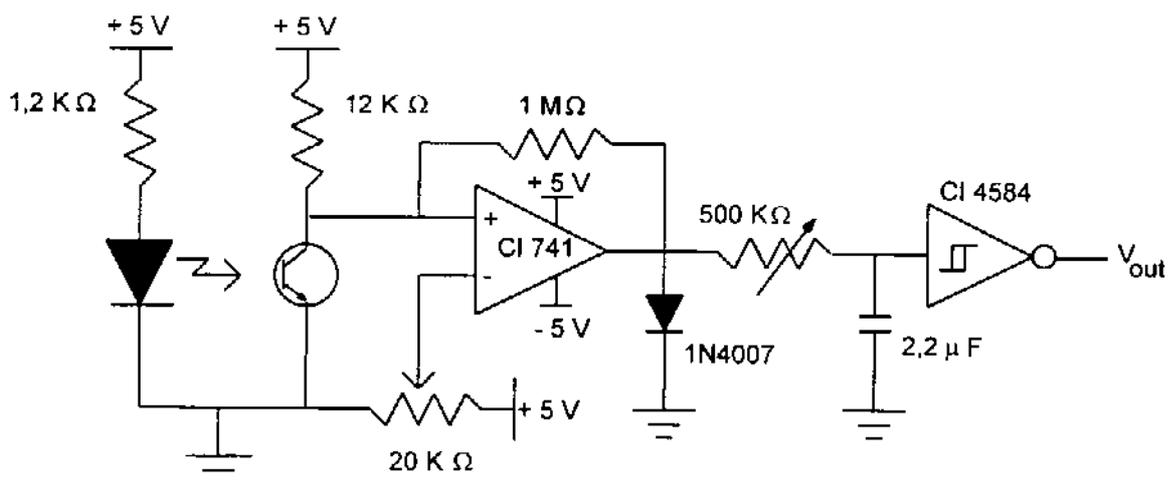


Figura VIII.6. Circuito eletrônico para extração de sinais dos sensores ópticos do módulo de adição de reagentes.

\* um circuito idêntico é empregado para a extração de sinais lógicos do sensor óptico empregado no sistema de detecção.

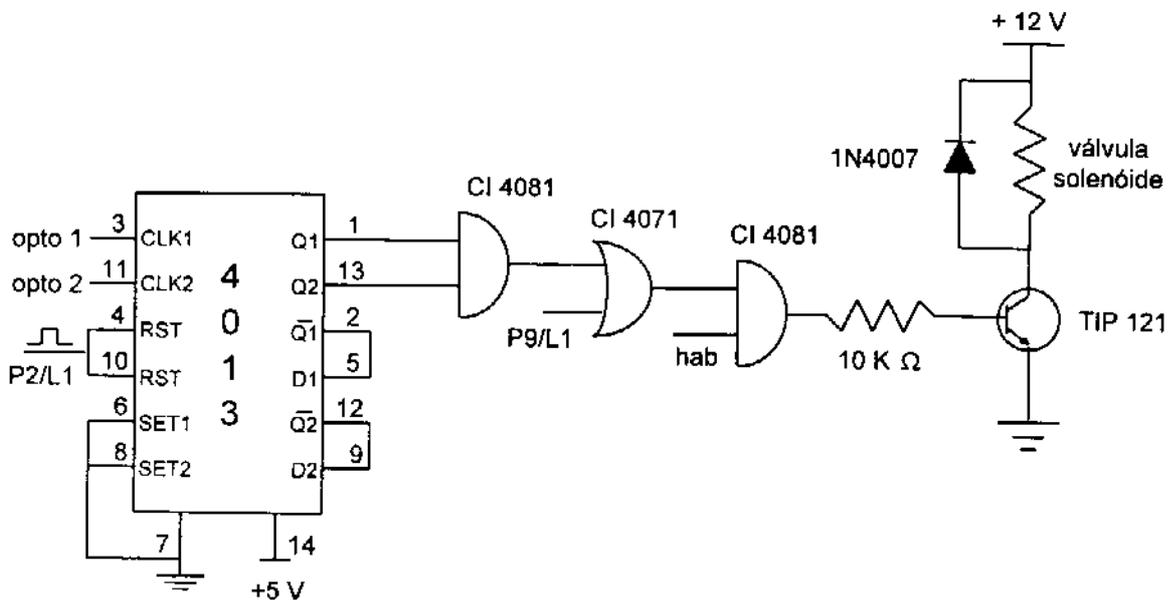
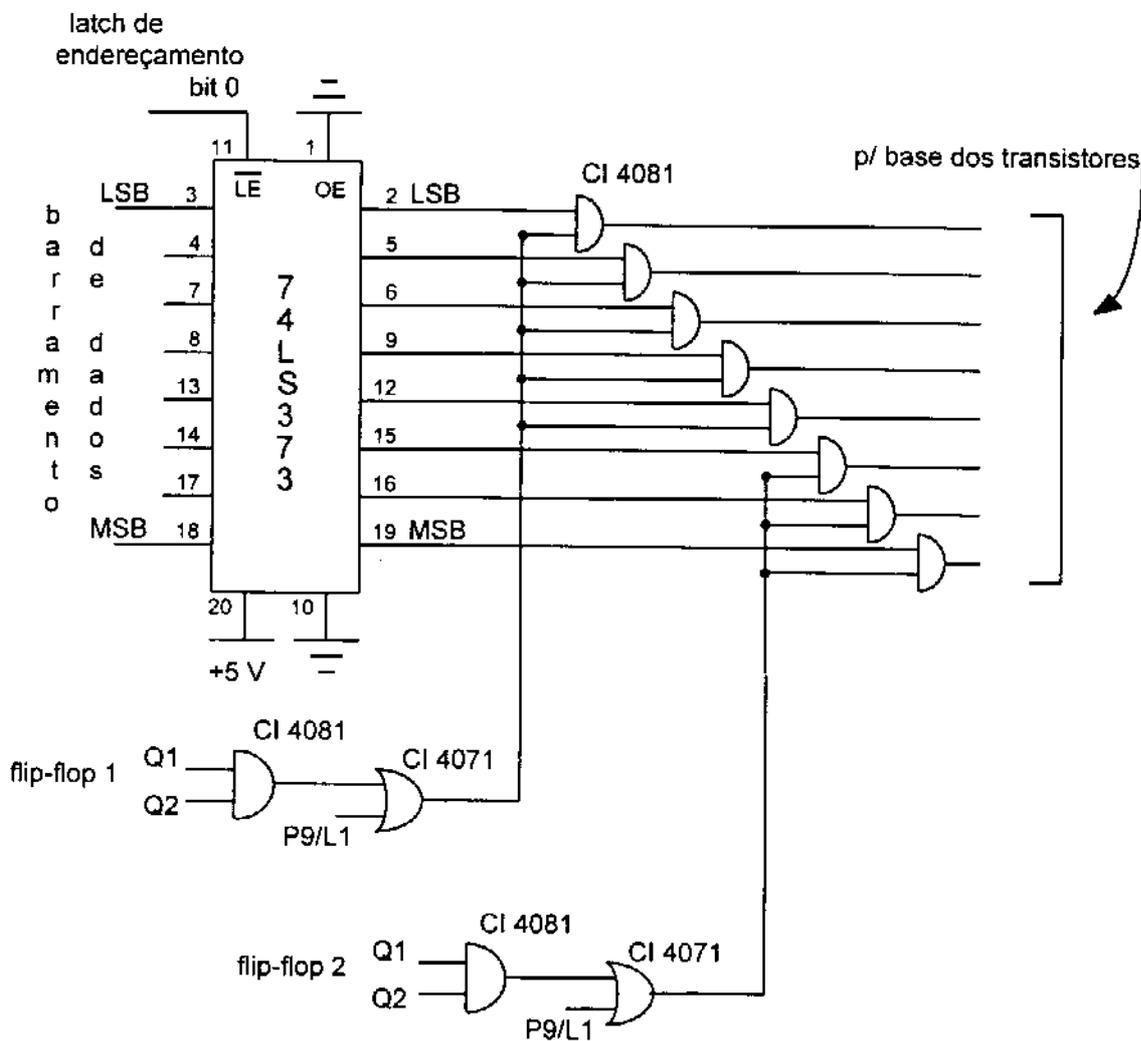


Figura VIII.7. Circuito eletrônico para acionamento das válvulas solenóides.

Com a reinicialização do circuito efetuada pelo microcomputador (pulso positivo no "reset" do CI 4013), as saídas Q1 e Q2 do flip-flop são colocadas em nível baixo. Quando a primeira bolha de ar do monossegmento atinge o "opto 1" do módulo, a saída Q1 torna-se igual a 1 e quando esta mesma bolha atinge o "opto 2", a saída Q2 torna-se igual a 1. Desta forma, a válvula solenóide é acionada, caso tenha sido habilitada pelo microcomputador. Quando a segunda bolha de ar do monossegmento atinge o "opto 1" do módulo, Q1 torna-se igual a 0, desligando a válvula solenóide. A passagem desta mesma bolha pelo "opto 2", também torna Q2 = 0, retornando o circuito para o estado inicial e, portanto, pronto para a adição de reagentes em outro monossegmento.

Embora os dois módulos de adição desenvolvidos tenham apenas dois e três pontos de adição, o circuito eletrônico permite habilitar até 5 válvulas para o primeiro módulo e 3 válvulas para o segundo. A Figura VIII.8 mostra o

circuito eletrônico empregado para estas habilitações, efetuadas através do "latch" de 8 bits CI 74LS373. O acionamento das válvulas pode ser feito pelo microcomputador, independentemente das bolhas de ar, através do bit 3 (P9) do "latch" de controle L1 (Apêndice VIII.8, Figura VIII.10).



**Figura VIII.8.** Circuito eletrônico para habilitação das válvulas solenóides dos módulos de adição de reagentes.

## VIII.7. Circuito Eletrônico do Sistema de Detecção

A Figura VIII.9 mostra o circuito eletrônico empregado para a extração de sinais do sensor óptico do sistema de detecção (idêntico ao do módulo de adição de reagentes) e para a identificação das bolhas de ar. O microcomputador pode efetuar esta identificação pela verificação dos estados do sensor óptico e do flip-flop através dos bits 6 (P17) e 7 (P18) do "latch" de controle L2 (Apêndice VIII.8, Figura VIII.11). Após a reinicialização do flip-flop, a passagem da primeira bolha de ar do monossegmento pelo sensor óptico (nível alto), torna a saída Q1 do CI 4013 igual a 1, indicando que a amostra está passando pela cela de detecção. Com a passagem da segunda bolha, Q1 = 0, o que prepara o circuito para detectar uma nova amostra, além de indicar que está passando fluido transportador pela cela.

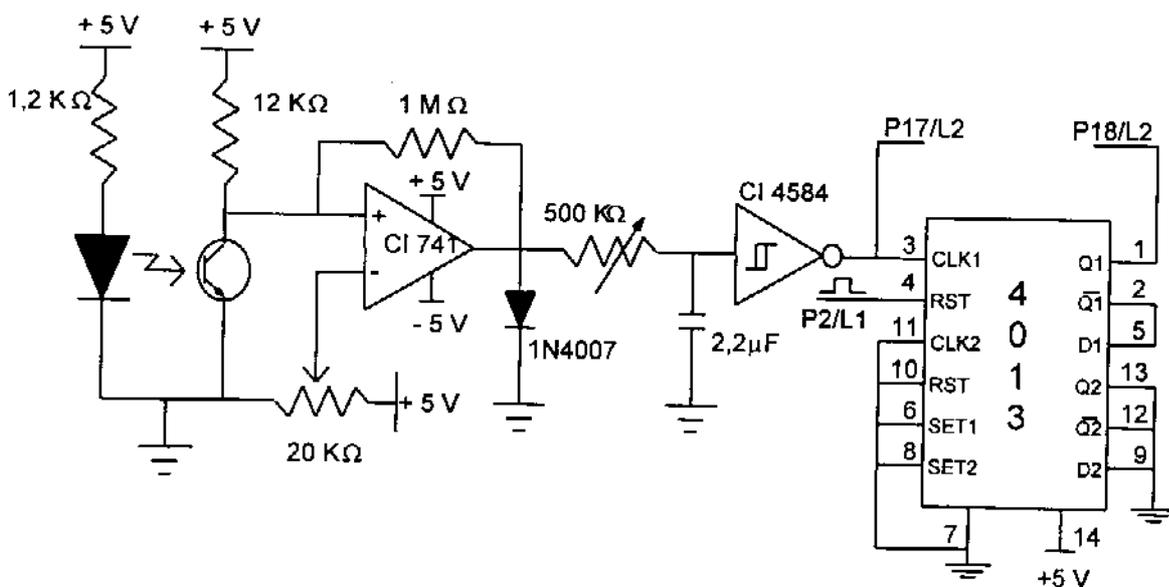


Figura VIII.9. Circuito eletrônico para extração de sinais do sensor óptico do sistema de detecção e identificação das bolhas de ar do monossegmento.

### VIII.8. Circuitos Eletrônicos de Controle

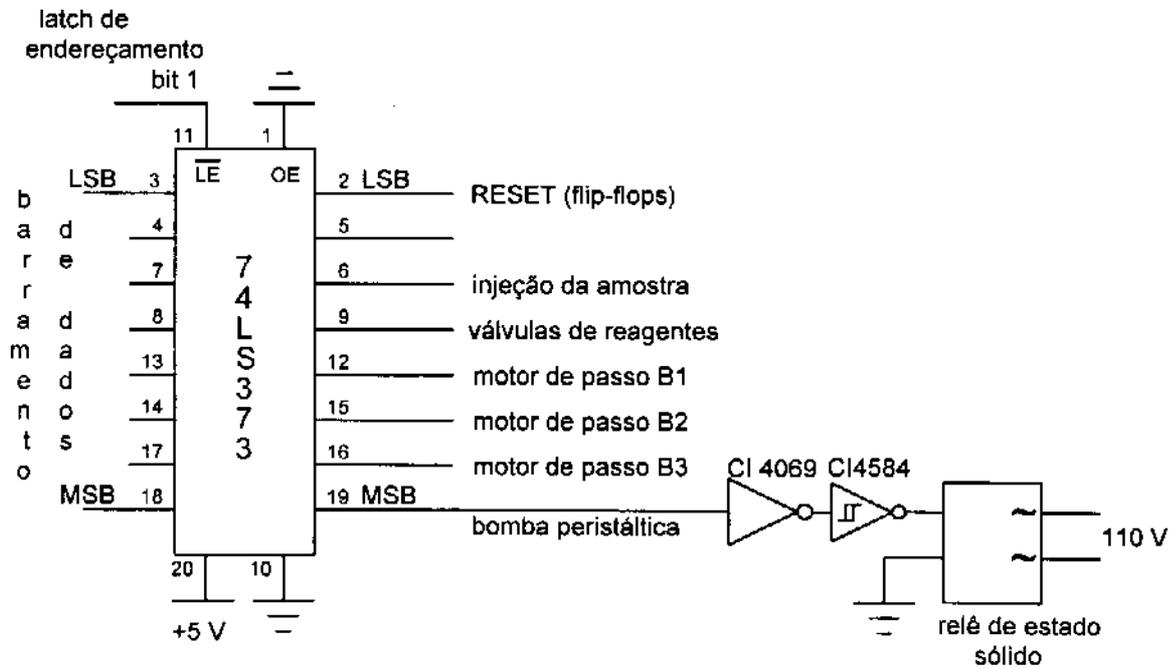


Figura VIII.10. Circuito eletrônico do "latch" de controle L1 (saída de dados).

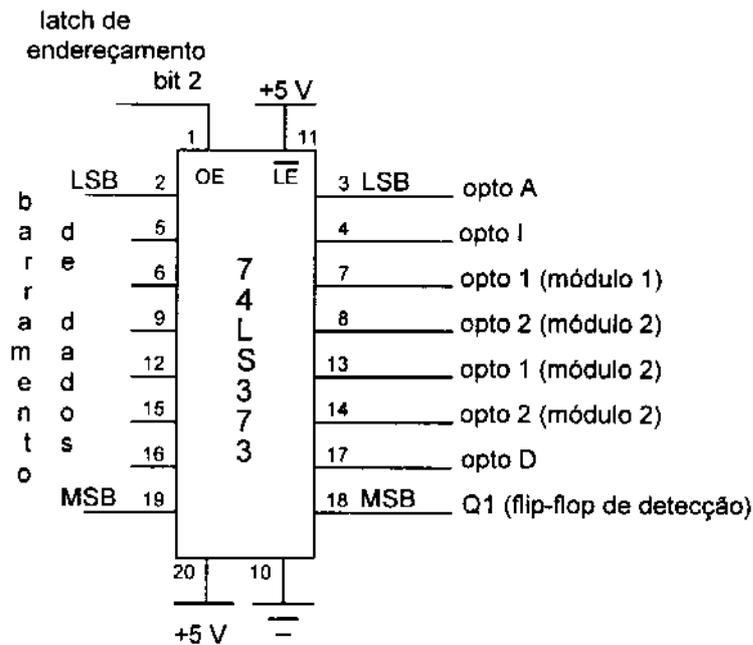


Figura VIII.11. Circuito eletrônico do "latch" de controle L2 (entrada de dados).

### VIII.9. Circuito Eletrônico da Porta do Usuário

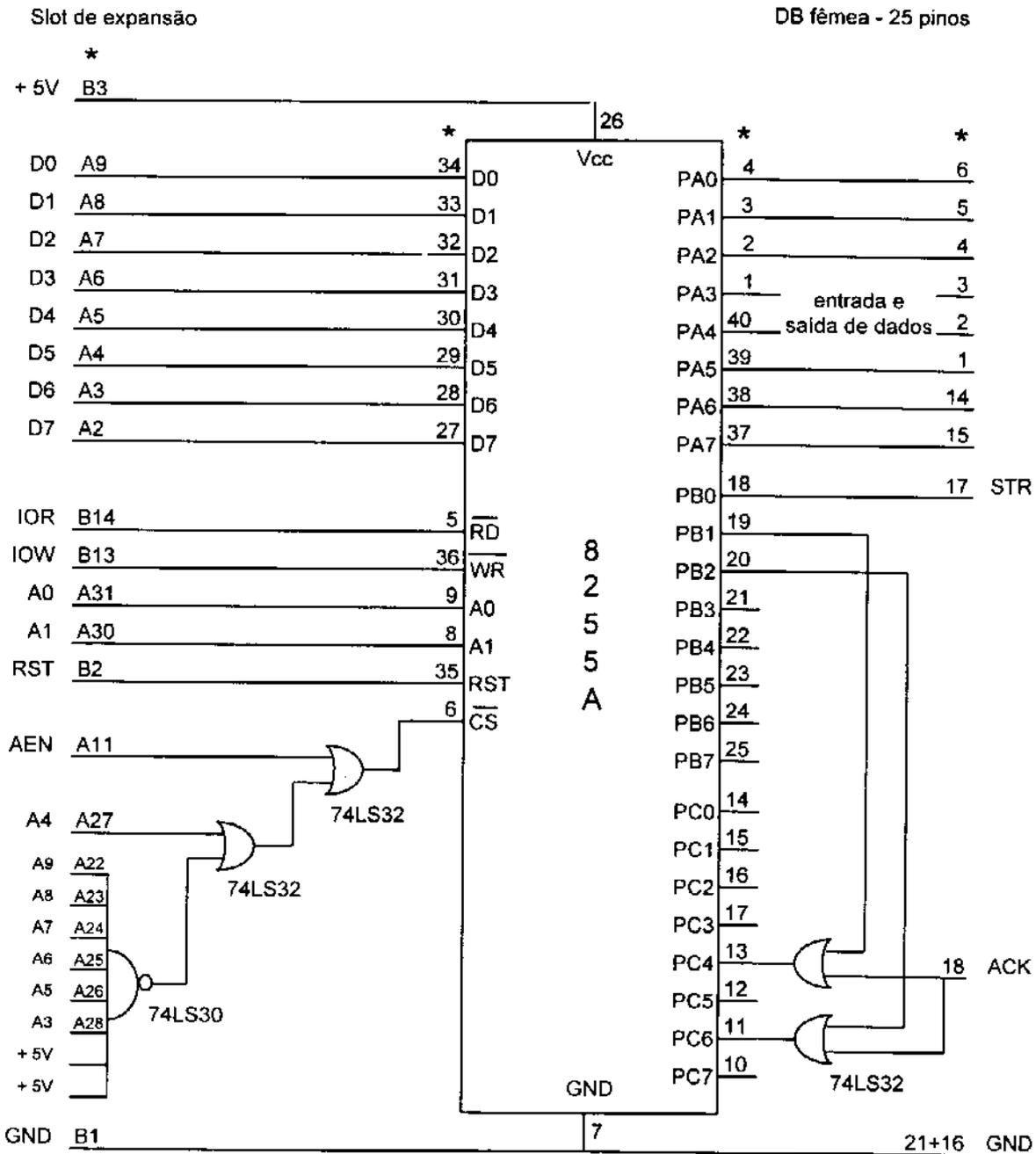


Figura VIII.12. Circuito eletrônico da porta do usuário (\* - pinagem, exceto das portas lógicas).

## VIII.10. Circuito Eletrônico de Decodificação de Endereços

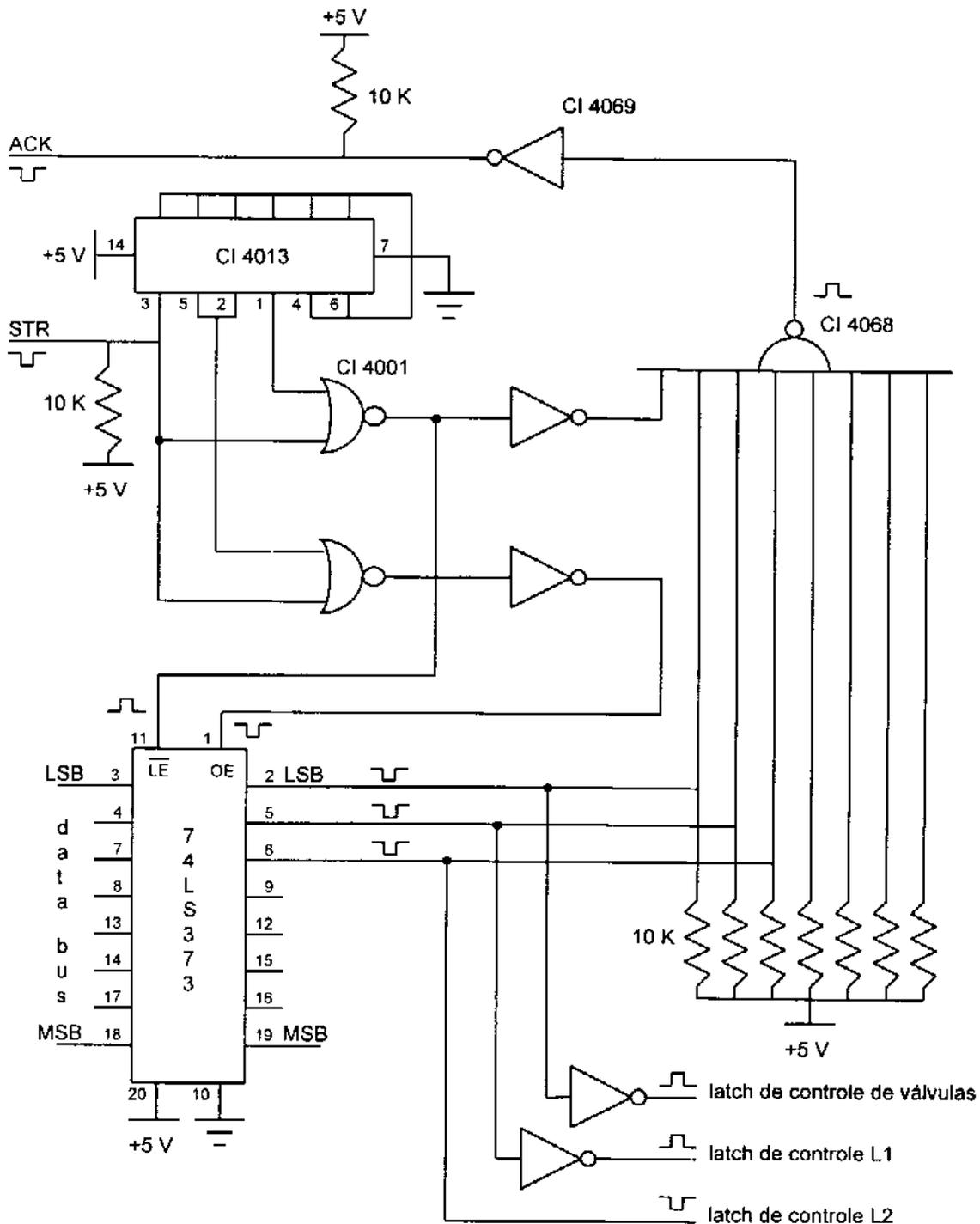


Figura VIII.13. Circuito eletrônico de decodificação de endereços da interface.

## VIII.11. Programa de Controle do Analisador

Este programa foi escrito em QuickBasic 4.5 e possibilita que o microcomputador IBM-PC controle o analisador e também o espectrofotômetro. A Listagem VIII.6 mostra apenas as rotinas principais e alguns menus para que se possa verificar como este programa foi estruturado. Várias rotinas são idênticas às mostradas na Listagem VIII.5 e, portanto, foram omitidas.

**Listagem VIII.6.** Programa de controle do analisador monossegmentado.

```

***** AUTOMATIC MONOSEGMENTED ANALYZER *****

' constantes relacionadas com o controle da interface

CONST contr% = 1003, pa% = 1000, pb% = 1001, pc% = 1002
CONST ohstr% = 3, oistr% = 2, ihstr% = 5, ilstr% = 4
CONST iack% = 32, oack% = 128, hil% = 255

CONST valv% = 254          ' latch de controle de valvulas
CONST mult% = 253         ' latch de reset, controle bomba, etc (L1)
CONST opto% = 251         ' latch de leitura de optos e amostra (L2)

CONST samp% = 1           ' opto A
CONST inje% = 2           ' opto I
CONST o1r1% = 4           ' opto 1 módulo 1
CONST o2r1% = 8           ' opto 2 módulo 1
CONST o1r2% = 16          ' opto 1 módulo 2
CONST o2r2% = 32          ' opto 2 módulo 2
CONST spec% = 64          ' opto D
CONST nsmp% = 128         ' contador de amostras (flip-flop)

CONST resethi% = 1, reseto% = 254 ' RESET
CONST pulsehi% = 4, pulselo% = 251 ' injeção da amostra
CONST reagton% = 8, reagtof% = 247 ' válvulas de reagentes
CONST smredon% = 16, smredof% = 239 ' motor de passo (B1)
CONST smoraon% = 32, smoraof% = 223 ' motor de passo (B2)
CONST smbroom% = 64, smbroof% = 191 ' motor de passo (B3)
CONST ppumpo% = 128, ppumpof% = 127 ' bomba peristáltica

CONST v1on% = 1, v1of% = 254      ' válvula 1, módulo 1
CONST v2on% = 2, v2of% = 253      ' válvula 2, módulo 1
CONST v3on% = 4, v3of% = 251      ' válvula 3, módulo 1
CONST v4on% = 8, v4of% = 247      ' válvula 4, módulo 1

```

```

CONST v5on% = 16, v5of% = 239      ' válvula 5, módulo 1
CONST v6on% = 32, v6of% = 223      ' válvula 1, módulo 2
CONST v7on% = 64, v7of% = 191      ' válvula 2, módulo 2
CONST v8on% = 128, v8of% = 127     ' válvula 3, módulo 2

```

' programação da porta de comunicação 8255

```

OUT contr%, 193 ' programa a 8255
OUT pa%, hil%
OUT pb%, ohstr%

```

CLS

```
CALL message(4, 0, 15, "AUTOMATIC MONOSEGMENTED ANALYZER")
```

```
CALL message(12, 0, 14, "TURN ON INTERFACE")
```

```
CALL instep
```

```
valvdata% = 0: CALL outdata(valv%, valvdata%) 'valvulas desabilitadas
```

```
multdata% = 0: CALL outdata(mult%, multdata%)
```

```
CALL outdata(mult%, multdata%)
```

```
multdata% = (multdata% OR resethi% OR smredon%)
```

```
CALL outdata(mult%, multdata%) 'reset dos flip-flops e posição do motor
```

```
FOR p% = 1 TO 100: NEXT
```

```
smp% = 16
```

```
multdata% = (multdata% AND resetlo% AND smredof%)
```

```
CALL outdata(mult%, multdata%)
```

mainmenu:

CLS

```
CALL message(5, 0, 10, "MAIN MENU")
```

```
CALL message(9, 0, 3, "1. Adjust sampling valve position")
```

```
CALL message(11, 0, 3, "2. Adjust reagent addition  ")
```

```
CALL message(13, 0, 3, "3. Adjust opto sensors  ")
```

```
CALL message(15, 0, 3, "4. Parameters of analysis  ")
```

```
CALL message(17, 0, 3, "5. Spectrophotometer set up  ")
```

```
CALL message(21, 0, 3, "6. Run analysis  ")
```

```
CALL message(lf%, 0, 7, "ESC to return")
```

valve: ' ajusta posição da válvula amostradora

CLS

```
CALL message(8, 0, 11, "ADJUST SAMPLING VALVE POSITION")
```

```
CALL message(13, 0, 2, "Manual adjust")
```

```
CALL message(15, 0, 2, "Automatic adjust")
```

```
CALL message(lf%, 0, 7, "ESC to return")
```

reagent: ' ajusta adição de reagentes

CLS

```
CALL message(8, 0, 11, "ADJUST REAGENT ADDITION")
```

```
CALL message(13, 0, 15, "Verify if addition of reagents is OK")
```

```
CALL message(lf%, 0, 7, "ESC to return")
```

```
multdata% = (multdata% OR resethi% OR reagton% OR ppumpo%)
```

```
CALL outdata(mult%, multdata%)
```

```
valvdata% = 255
```

```
CALL outdata(valv%, valvdata%)
```

```

sensor:          ' preenche analisador com fluido carregador
CLS
CALL message(8, 0, 11, "ADJUST OPTO SENSORS")
CALL message(16, 0, 15, "Filling analyzer with carrier fluid")
CALL message(18, 0, 15, "PLEASE, WAIT !")

multidata% = (multidata% OR resethi% OR ppumpo%)
CALL outdata(mult%, multidata%)
multidata% = (multidata% AND resetlo%)
CALL outdata(mult%, multidata%)
ten = TIMER
WHILE TIMER - ten < 10: WEND
DO
CALL indata(opto%, status%)
LOOP WHILE (status% AND (samp% + o1r1% + o2r1% + o1r2% + o2r2% + spec%)) > 1
ten = TIMER
WHILE TIMER - ten < 10: WEND
LOCATE 16, 10: PRINT SPC(60);
CALL message(18, 0, 2, "ANALYZER IS READY")
CALL message(if%, 0, 7, "ESC to return")

paranal:        ' define parâmetros de análise
CLS
CALL message(4, 0, 11, "PARAMETERS OF ANALYSIS")
CALL message(8, 25, 2, "Analyte: ")      ' espécie a ser determinada (analyte$)
CALL message(10, 25, 2, "Wavelength: ")  ' comprimento de onda (lambda!)
CALL message(12, 25, 2, "Replicates: ")  ' número de replicatas, 1 a 3 (replicate$)
CALL message(14, 25, 2, "Conc. unity: ")  ' concentração utilizada
CALL message(16, 25, 2, "Reagents: ")    ' reagentes adicionados
CALL message(18, 25, 2, "Std. conc.: ")  ' padrões (1 a 7) e concentrações
CALL message(if%, 0, 7, "ESC to return")

diode% = CINT((lambda! - firstdiode) / dispersion)  ' define diodo a ser monitorado

pdas:          ' ajusta parâmetros do espectrofotômetro
CALL message(8, 0, 11, "SPECTROPHOTOMETER SET UP")
CALL message(12, 25, 2, "Bandwidth (nm): ")  ' largura de banda (band%)
CALL message(14, 25, 2, "Scans for average: ")  ' varreduras p/ espectro c/o média
CALL message(16, 25, 2, "Time to scan one spectrum (ms): ")
IF flagprog% = 1 THEN      ' procedimento 1 de varredura
CALL message(18, 25, 2, "Verify baseline ")
ELSEIF flagprog% = 2 THEN  ' procedimento 2 de varredura
CALL message(18, 25, 2, "Delay to start scan (ms): ")
CALL message(20, 25, 2, "Verify baseline ")
END IF
CALL message(if%, 0, 7, "ESC to return")

analysis:
CLS
CALL password
PRINT #1, runspec$;
analysis1:
CALL message(8, 0, 11, "RUN ANALYSIS")
CALL message(13, 0, 2, "Reference spectrum"): CALL message(13, 31, 15, "R")

```

```
CALL message(15, 0, 2, "Start analysis"): CALL message(15, 33, 15, "S")
CALL message(if%, 0, 7, "ESC to return")
```

```
CALL outdata(valv%, valvdata%)          ' habilitação das válvulas
```

```
reference:                                'obtem sinais de referência
CALL message(14, 31, 11, "File:")
CALL message(18, 0, 15, "Place reference solution to fill loop")
CALL message(20, 0, 15, "Press ENTER to continue")
CALL message(18, 0, 2, "PLEASE, WAIT !")
CALL message(if%, 0, 7, "ESC to return")
multdata% = (multdata% OR pulsehi% OR ppumpo%)
CALL outdata(mult%, multdata%)
multdata% = (multdata% OR resethi%)
CALL outdata(mult%, multdata%)
multdata% = (multdata% AND resetlo%)
CALL outdata(mult%, multdata%)
wkey$ = ""
thirty = TIMER
DO
  wkey$ = INKEY$
LOOP UNTIL TIMER - thirty > 10 OR wkey$ = escape$
IF wkey$ = escape$ THEN
  multdata% = (multdata% AND ppumpof%)
  CALL outdata(mult%, multdata%)
  CLS
  GOTO analysis1
END IF
multdata% = (multdata% AND pulselo%)
CALL outdata(mult%, multdata%)
FOR p% = 1 TO 200: NEXT
multdata% = (multdata% OR pulsehi%)
CALL outdata(mult%, multdata%)
wkey$ = ""
DO
  CALL indata(opto%, status%)
  wkey$ = INKEY$
LOOP UNTIL (status% AND spec%) = 64 OR wkey$ = escape$
multdata% = (multdata% AND ppumpof%)
CALL outdata(mult%, multdata%)
IF wkey$ = escape$ THEN CLS : GOTO analysis1
ERASE bspec!
CALL readspec(run$, send$, numbytes$, read$, diode%, band%, bspec!())
LOCATE 18, 20: PRINT SPC(50);
v% = 0
DO
  v% = v% + 1
  diode$ = "D(" + LTRIM$(STR$(v%)) + ") = "
  IF flagprog% = 1 THEN lin% = 17
  IF flagprog% = 2 THEN lin% = 18
  CALL message(lin% + v% - band%, 10, 2, diode$)
  COLOR 3: LOCATE lin% + v% - band%, 17
  PRINT USING "###.##"; bspec!(v%); : PRINT SPC(20);
LOOP UNTIL v% = 2 * band% + 1
```

```

reference$ = name$ + "." + LEFT$(analyte$, 2) + LTRIM$(STR$(flagprog%))
rspec! = 0
FOR n% = 1 TO 2 * band% + 1
  rspec! = rspec! + bspec!(n%)
NEXT n%
rspec! = rspec! / (2 * band% + 1)
OPEN reference$ FOR OUTPUT AS #4
  PRINT #4, rspec!, band%, avrscan%, replicate$, scan!, delay!, DATES$
CLOSE #4
multidata% = (multidata% OR ppumpo%)
CALL outdata(mult%, multidata%)
multidata% = (multidata% AND resetlo%)
CALL outdata(mult%, multidata%)
flagref% = 1
RETURN

start:                                ' procedimento de análise
CLS
ERASE Asmptot!, Asmpmed!, Conc!
ERASE Asmp!
ERASE Astdtot!, Astdmed!, Astd!
intensity$ = name$ + ".CFA"
CALL message(1, 2, 11, "analyte:"): CALL message(1, 11, 10, UCASE$(analyte$))
CALL message(1, 30, 11, "file:"): CALL message(1, 36, 10, intensity$)
CALL message(2, 2, 11, "replicates:"): CALL message(2, 14, 10, replicate$)
CALL message(2, 20, 11, "bandwidth:"): CALL message(2, 31, 10, band$ + " nm")
CALL message(2, 45, 11, "scans:"): CALL message(2, 52, 10, avr$)
CALL message(2, 60, 11, "integration:"): CALL message(2, 73, 10, LTRIM$(STR$(scan! + delay!))+"ms")
CALL message(lf%, 13, 7, "F1 to inject")
CALL message(lf%, 61, 7, "F12 to stop")
label$ = "STD " + "C (" + unity$ + ")" + " A (AU)"
CALL message(5, 2, 15, label$)
label$ = "SMP " + "A (AU)" + " C (" + unity$ + ")"
CALL message(5, 50, 15, label$)
CALL message(7, 32, 15, "Calibration")
IF smax% > 0 THEN
  standard$ = name$ + ".std"
  OPEN standard$ FOR OUTPUT AS #6
  s% = 0
  DO
    s% = s% + 1
    COLOR 7: LOCATE 6 + s%, 2: PRINT s%
    COLOR 3: LOCATE 6 + s%, 6: PRINT USING "##.###^"; std!(s%);
    PRINT #6, std!(s%);
  LOOP UNTIL s% = smax%
  CLOSE #6
END IF
VIEW (40, 225)-(360, 395), , 15
CALL message(18, 3, 7, "A")
CALL message(19, 3, 7, "I")
CALL message(20, 3, 7, "a")
CALL message(21, 3, 7, "u")
CALL message(15, 2, 15, "1.0") 'escala
CALL message(lf% - 4, 18, 7, "conc./" + unity$)

```

```

CALL message(lf% - 4, 6, 15, "0.0")
CALL message(lf% - 5, 2, 15, "0.0")
COLOR 15: LOCATE lf% - 4, 38: PRINT USING "##.#####"; std!(smax%) * 1.1;
WINDOW (0, 1!)-(std!(smax%) * 1.1, 0)
OPEN intensity$ FOR OUTPUT AS #5
s% = 1                'contador de amostra para injeção
r% = 1                'contador de amostra para leitura de espectro
repinj% = 0: repread% = 0
flaginj% = 0: flagread% = 0
flagend% = 0
flagsamp% = 0
ON TIMER(7) GOSUB pulse: TIMER OFF: flagtime% = 0
ON KEY(1) GOSUB timetopulse: KEY(1) ON: flagkey% = 1
ON KEY(31) GOSUB stopanal: KEY(31) ON
CALL message(lf% - 2, 2, 7, "injection:")
CALL message(lf% - 2, 50, 7, "data read:")
DO
  FOR k% = 1 TO 15: wkey$ = INKEY$: NEXT
  IF flagend% = 0 THEN
    IF flaginj% = 0 THEN
      IF s% <= smax% THEN
        place$ = "PLACE STANDARD" + STR$(s%) + "  "
      ELSE
        place$ = "PLACE SAMPLE" + STR$(s% - smax%) + "  "
      END IF
      CALL message(lf% - 2, 13, 15, place$)
      BEEP
    END IF
  END IF
  IF flagsamp% = 0 THEN
    IF flagtime% = 1 THEN TIMER STOP
    CALL indata(opto%, status%)
    IF flagtime% = 1 THEN TIMER ON
    IF (status% AND samp%) = 1 THEN
      IF flagkey% = 0 THEN samptime = TIMER: flagsamp% = 1
      IF flaginj% = 2 THEN flaginj% = 0
    END IF
  END IF
  IF flagsamp% = 1 THEN
    IF TIMER - samptime > 13 THEN
      BEEP
      TIMER OFF: TIMER ON: flagtime% = 1
      flagsamp% = 2
    END IF
  END IF
  IF flagtime% = 1 THEN TIMER STOP
  CALL indata(opto%, status%)
  IF flagtime% = 1 THEN TIMER ON
  IF ((status% AND (spec% + nsmp%)) = 192) THEN flagread% = flagread% + 1
  IF flagread% = 1 THEN GOSUB readint
  IF flagtime% = 1 THEN TIMER STOP
  CALL indata(opto%, status%)
  IF flagtime% = 1 THEN TIMER ON
  IF (status% AND nsmp%) = 0 THEN flagread% = 0

```



```

KEY(1) STOP: KEY(31) STOP
CALL readspec(run$, send$, numbytes$, read$, diode%, band%, mspec!())
IF flagtime% = 1 THEN TIMER ON
KEY(1) ON: KEY(31) ON
repread% = repread% + 1
flagread% = flagread% + 1
IF repread% > VAL(replicate$) THEN
    repread% = 1
    r% = r% + 1
END IF
aspect! = 0
FOR n% = 1 TO 2 * band% + 1
    aspect! = aspect! + mspec!(n%)
NEXT n%
aspect! = aspect! / (2 * band% + 1)
PRINT #5, aspect!;
IF r% <= smax% THEN
    Astd!(r%, repread%) = (LOG((rspec! + 33.36) / (aspect! + 33.36))) / LOG(10!)
    Astdtot!(r%) = Astdtot!(r%) + Astd!(r%, repread%)
    COLOR 15: LOCATE lf% - 2, 61
    PRINT "Astd(" + LTRIM$(STR$(r%)) + ", " + LTRIM$(STR$(repread%)) + ") = ";
    PRINT USING "#.####"; Astd!(r%, repread%)
ELSE
    Asmp!(r% - smax%, repread%) = (LOG((rspec! + 33.36) / (aspect! + 33.36))) / LOG(10!)
    Asmptot!(r% - smax%) = Asmptot!(r% - smax%) + Asmp!(r% - smax%, repread%)
    COLOR 15: LOCATE lf% - 2, 61
    PRINT "Asmp(" + LTRIM$(STR$(r% - smax%)) + ", " + LTRIM$(STR$(repread%)) + ") = ";
    PRINT USING "#.####"; Asmp!(r% - smax%, repread%)
END IF

IF repread% = VAL(replicate$) THEN
    IF r% <= smax% THEN
        Astdmed!(r%) = Astdtot!(r%) / VAL(replicate$)
        COLOR 2: LOCATE 6 + r%, 19
        PRINT USING "#.####"; Astdmed!(r%)
        PSET (std!(r%), Astdmed!(r%)), 10
        CIRCLE (std!(r%), Astdmed!(r%), std!(smax%) / 150, 10
    ELSE
        Asmpmed!(r% - smax%) = Asmptot!(r% - smax%) / VAL(replicate$)
        COLOR 7
        IF r% - smax% <= 20 THEN
            LOCATE 6 + r% - smax%, 50
        ELSE
            LOCATE 6 + r% - smax% - 20, 50
        END IF
        PRINT (r% - smax%)
        COLOR 3
        IF r% - smax% <= 20 THEN
            LOCATE 6 + r% - smax%, 56
        ELSE
            LOCATE 6 + r% - smax% - 20, 56
        END IF
        PRINT USING "#.####"; Asmpmed!(r% - smax%)
    END IF
END IF

```

END IF

```
IF r% = smax% AND repread% = VAL(replicate$) THEN
  CALL leastsq(smax%, std!(), Astdmed!(), angcof!, lincof!, corr!)
  CALL message(9, 32, 3, "a = "): COLOR 2: PRINT USING "#.#####"; lincof!
  CALL message(10, 32, 3, "b = "): COLOR 2: PRINT USING "#.#####"; angcof!
  CALL message(11, 32, 3, "r = "): COLOR 2: PRINT USING "#.#####"; corr!
  plot! = std!(smax%) * angcof! + lincof!
  LINE (0, lincof!)-(std!(smax%), plot!), 11
END IF
```

```
IF r% > smax% AND repread% = VAL(replicate$) THEN
  Concl!(r% - smax%) = (Asmpmed!(r% - smax%) - lincof!) / angcof!
  COLOR 2
  IF r% - smax% <= 20 THEN
    LOCATE 6 + r% - smax%, 64
  ELSE
    LOCATE 6 + r% - smax% - 20, 64
  END IF
  PRINT USING "##.###^####"; Concl!(r% - smax%)
END IF
```

```
IF repread% = VAL(replicate$) AND (r% = s% - 1) THEN flagend% = 2
RETURN
```

END

```
SUB indata (ad%, di%) ' entrada de dados da interface
  OUT pb%, ohstr%
  OUT pa%, ad%
  OUT pb%, olstr%
  WHILE (INP(pc%) AND oack%) = 0: WEND
  OUT pb%, ohstr%
  OUT pb%, ihstr%
  OUT pb%, ilstr%
  WHILE (INP(pc%) AND iack%) = 0: WEND
  di% = INP(pa%)
  OUT pb%, ihstr%
END SUB
```

```
SUB instep ' inicialização da interface
  CLS
  IF iof% = 0 THEN EXIT SUB
tsend:
  FOR n% = 1 TO 3
    GOSUB send
  NEXT n%
  z% = 0
tag:
  IF (INP(pc%) AND oack%) > 0 THEN GOSUB send: GOTO ntest
  z% = z% + 1
  IF z% <= 100 THEN GOTO tag
  GOSUB send
  z% = 0
```

```

tag1:
  IF (INP(pc%) AND oack%) > 0 THEN GOSUB send: GOTO ntest
  z% = z% + 1
  IF z% <= 100 THEN GOTO tag1
fail1:
  BEEP
  CALL message(10, 0, 13, "INTERFACE NOT OPERATING! IS IT ON?")
  OUT contr%, 193 ' programa a 8255
  OUT pa%, hil%
  OUT pb%, ohstr%
  GOTO tsend
ntest:
  FOR n% = 1 TO 2
    GOSUB send
  NEXT n%
  IF (INP(pc%) AND oack%) > 0 THEN GOTO fail1 ELSE EXIT SUB
send:
  OUT pb%, ohstr%
  OUT pa%, hil%
  OUT pb%, olstr%
  OUT pb%, ohstr%
  RETURN
END SUB

SUB message (ly%, cx%, cor%, mess$)      ' mostra mensagem no video
  IF cx% = 0 THEN
    LOCATE ly%, 40 - INT((LEN(mess$) / 2)): COLOR cor%: PRINT mess$;
  ELSE
    LOCATE ly%, cx%: COLOR cor%: PRINT mess$;
  END IF
END SUB

SUB outdata (ad%, da%)                  ' saida de dados para a interface
  OUT pb%, ohstr%
  OUT pa%, ad%
  OUT pb%, olstr%
  WHILE (INP(pc%) AND oack%) = 0: WEND
  OUT pb%, ohstr%
  OUT pa%, da%
  OUT pb%, olstr%
  WHILE (INP(pc%) AND oack%) = 0: WEND
  OUT pb%, ohstr%
  OUT pa%, hil%
END SUB

SUB readspec (run$, send$, numbytes$, read$, diode%, band%, mspec!())  ' obtenção de espectro
  CALL password
  PRINT #1, run$;
  CALL endjob
  ndiode% = 2 * band% + 1
  address! = HEXTODEC!(read$)
  address! = address! + diode% - band% - 1
  ERASE mspec%
  FOR n% = 1 TO avrscan%

```

```
address$(n%) = HEX$(address! + n% * 512)
CALL password
PRINT #1, send$;
PRINT #1, numbytes$;
PRINT #1, address$(n%);
FOR m% = 1 TO ndiode%
  int$ = INPUT$(1, #1)
  intspec%(m%) = ASC(int$)
  mspec%(m%) = mspec%(m%) + intspec%(m%)
NEXT m%
CALL endjob
NEXT n%
FOR m% = 1 TO ndiode%
  mspec!(m%) = mspec%(m%) / avrscan%
NEXT m%
END SUB
```

```
SUB setnumbytes (numbytes$, band%)      ' determina o número de bytes a ser enviado pela 8085
  numbytes$ = ""
  numbytes$ = FOURHEX$((2 * band%) + 1)
END SUB
```

## IX. REFERÊNCIAS

---

- [1] M. Valcárcel, Analytical Chemistry - Today's Definition and Interpretation, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 343 (1992) 814-816.
- [2] J. Ruzicka and E.H. Hansen, Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis, *Analytica Chimica Acta*, 78 (1975) 145-157.
- [3] R.G. Brereton, Object Oriented Programming on Personal Computers, *The Analyst*, 119 (1994) 2149-2160.
- [4] D.C.M. Squirrell, The Why, When and Wherefore of Automatic Chemistry, *Analytical Proceedings*, 22 (1985) 79-80.
- [5] M. Crook, Robotics: Past, Present and Future, *Analytical Proceedings*, 30 (1993) 165-167.
- [6] L.A. Brunner, The Laboratory of the 1990s - Planning for Total Automation, *Journal of Automatic Chemistry*, 14 (1992) 43-45.
- [7] A. Truchaud, P. Schnipelski, H.L. Pardue, J. Place and K. Ozawa, Increasing the Biosafety of Analytical Systems in the Clinical Laboratory, *Journal of Automatic Chemistry*, 16 (1994) 67-70.
- [8] A.P. Zipp, Introduction to "The Microscale Laboratory", *Journal of Chemical Education*, 66 (1989) 956-957.
- [9] Z. Szafran, M.M. Singh and R.M. Pike, The Microscale Inorganic Laboratory. Safety, Economy, and Versatility, *Journal of Chemical Education*, 66 (1989) A263-A267.
- [10] H.M. Kingston and M.L. Kingston, Nomenclature in Laboratory Robotics and Automation, *Journal of Automatic Chemistry*, 16 (1994) 43-57.
- [11] G.G. Guilbault and M. Hjeln, Nomenclature for Automated and Mechanised Analysis, *Pure and Applied Chemistry*, 61 (1989) 1657-1664.

- 
- [12] R.J. Poppi, P.A.M. Vazquez and C. Pasquini, Fast Scanning Hadamard Spectrophotometer, *Applied Spectroscopy*, 46 (1992) 1822-1827.
- [13] W.D. Perkins, Fourier Transform - Infrared Spectroscopy, *Journal of Chemical Education*, 63 (1986) A5-A10.
- [14] D.A. Skoog and J.J. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, 4th. edition, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1992, pp. 109-113.
- [15] K.W. Busch and M.A. Busch, *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*, John Wiley, New York, 1990, chap. 15.
- [16] Y. Talmi, Spectrophotometry and Spectrofluorimetry with Self-Scanned Photodiode Array, *Applied Spectroscopy*, 36 (1982) 1-18.
- [17] K.W. Busch and M.A. Busch, *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*, John Wiley, New York, 1990, pp. 170-176.
- [18] J.C. Miller and J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1984.
- [19] Y. Talmi, Applications of TV-type Multichannel Detectors to Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 47 (1975) 658A-670A.
- [20] K.R. Brushwyler, L.D. Carter, G.M. Hieftje, Flow Injection Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry with a Multielement Photodiode-Array Spectrometer, *Applied Spectroscopy*, 44 (1990) 1438-1443.
- [21] R. Lobinski and Z. Marczenko, Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 23 (1992) 55-111.
- [22] F. Lázaro, A. Ríos, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, Diode Array Detectors in Hydrodynamic Analytical Systems, *Analisis*, 14 (1986) 378-388.

- [23] K.W. Busch and M.A. Busch, *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*, John Wiley, New York, 1990, pp. 452-462.
- [24] Y. Talmi and R.W. Simpson, Self-Scanned Photodiode Array: a Multichannel Spectrometric Detector, *Applied Optics*, 19 (1980) 1401-1414.
- [25] D.G. Jones, Photodiode Array Detectors in UV-VIS Spectroscopy: Part I, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 1057A-1073A.
- [26] R.B. Bilhorn, P.M. Epperson, J.V. Sweedler and M.B. Denton, Spectrochemical Measurements with Multichannel Integrating Detectors, *Applied Spectroscopy*, 41 (1987) 1125-1136.
- [27] W.E.L. Grossman, A Comparison of Optical Detectors for the Visible and Ultraviolet, *Journal of Chemical Education*, 66 (1989) 697-700.
- [28] P.W.J.M. Boumans and G. Brouwer, Studies of Photodiodes and Phototransistors as Detection Devices for Multichannel Emission Spectrometry, *Spectrochimica Acta*, 27B (1972) 247-255.
- [29] P.W.J.M. Boumans, R.F. Rumphorst, L. Willemsen and F.J. de Boer, Solid State System Matched to High-Gain Low-Noise d.c. and Lock-in Amplifiers for Use in Multichannel Emission Spectrochemical Analysis, *Spectrochimica Acta*, 28B (1973) 227-240.
- [30] E.G. Coddling and G. Horlick, Application of AND and Exclusive-Or (XOR) Logic Operations to the Identification of Elemental Emission Spectra Measured Using a Photodiode Array Direct Reading Spectrometer, *Applied Spectroscopy*, 27 (1973) 366-370.
- [31] G. Horlick and E.G. Coddling, Some Characteristics and Applications of Self-Scanning Linear Silicon Photodiode Arrays as Detectors of Spectral Information, *Analytical Chemistry*, 45 (1973) 1490-1494.

- 
- [32] J.T. Agnew, R.G. Franklin, R.E. Benn and A. Bazarian, Combustion Studies with the Orthicon Spectrograph, *Journal of the Optical Society of America*, 39 (1949) 409-410.
- [33] R.E. Benn, W.S. Foote and C.T. Chase, The Image Orthicon in Spectroscopy, *Journal of the Optical Society of America*, 39 (1949) 529-532.
- [34] M.A. Busch, K.W. Busch and B.B. Malloy, Two-Dimensional Multiple Entrance-Slit Vidicon Spectrometer for Simultaneous Multielement Analysis, *Talanta*, 37 (1990) 71-87.
- [35] K.W. Busch and M.A. Busch, *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*, John Wiley, New York, 1990.
- [36] R.E. Dessy, W.G. Nunn and C.A. Titus, Linear Photodiode Array Spectrometers as Detector Systems in Automated Liquid Chromatographs, *Journal of Chromatographic Science*, 14 (1976) 195-200.
- [37] R.E. Dessy, W.D. Reynolds, W.G. Nunn, C.A. Titus and G.F. Moler, New Mini-Computer Automated Linear Photodiode Array Spectrometer System for High-Resolution Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 126 (1976) 347-368.
- [38] M.J. Milano, S. Lam and E. Grushka, Rapid Scanning diode Array as a Multi-Wavelength Detector in Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 125 (1976) 315-326.
- [39] J.C. Miller, S.A. George and B.G. Willis, Multichannel Detection in High-Performance Liquid Chromatography, *Science*, 218 (1982) 241-246.
- [40] S.A. Borman, Photodiode Array Detectors for LC, *Analytical Chemistry*, 55 (1983) 836A-842A.
- [41] D.G. Jones, Photodiode Array Detectors in UV-VIS Spectroscopy: Part II, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 1207A-1214A.

- 
- [42] C. Marty, E. Lesellier, P. Saint-Martin, J.P. Moissonnier, C. Berset, Application de la Détection Visible à la Barrette de Photodiodes à l'analyse de Pigments Caroténoïdes par Chromatographie en Phase Liquide, *Analisis*, 18 (1990) 78-82.
- [43] A.F. Fell, T.Z. Woldemariam, P.A. Linley, G. Jian, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, Post-Column Continuous-Flow Analysis Combined with Reversed-Phase Liquid Chromatography and Computer-Aided Photodiode-Array Detection for the Characterization of Phloroglucinols by Second-Derivative Difference Spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 234 (1990) 89-95.
- [44] A. Yammamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa and M. Miyazaki, Real-Time Analysis of Multicomponent Chromatograms: Application to High-Performance Liquid Chromatography, *The Analyst*, 120 (1995) 377-380.
- [45] L. Anderson, T. Anfält, A. Granéli and M. Strandberg, Application of a Rapid Scanning Photodiode-Array Spectrophotometer to the Continuous Determination of Nickel and Cobalt, *Analytica Chimica Acta*, 109 (1979) 425-430.
- [46] J. Janata and J. Ruzicka, Combination of Flow Injection Analysis and Voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 139 (1982) 105-115.
- [47] F. Lázaro, A. Rios, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, Simultaneous Multiwavelength Detection in Flow Injection Analysis, *Analytica Chimica Acta*, 179 (1986) 279-287.
- [48] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arriba, M.J. Santos-Delgado and L.M. Polo-Díez, Simultaneous Flow-Injection Determination of o- and p-Nitrophenol Using a Photodiode-Array Detector, *Analytica Chimica Acta*, 258 (1992) 269-273.

- 
- [49] A. Gallardo Melgarejo, J.M. Cano Pavón and A. Ríos Castro, Flow-Injection Diode-Array: a Hybrid Approach to the Automation of Simultaneous Determinations of Metal Ions With Chromogenic Reagents, *Analytica Chimica Acta*, 241 (1990) 153-159.
- [50] M.J.P. Gerritsen, G. Kateman, M.A.J. van Opstal, W.P. van Bennekom and B.G.M. Vandeginste, Flow-Injection System With Photodiode Array Detection and Multivariate Data Evaluation for Quantifying Teniposide in Blood Plasma, *Analytica Chimica Acta*, 241 (1990) 23-30.
- [51] W. Lindberg, G.D. Clark, C.P. Hanna, D.A. Whitman, G.D. Christian and J. Ruzicka, A Simple and Robust Flow Injection Analysis Method for Determination of Free Acid and Metal Concentrations in Hydrolyzable Metal Solutions, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 849-852.
- [52] B. Fernández-Band, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, Flow-Injection Determination of Mixtures of Amines Immobilized in the Flow Cell of a Photometric Diode-Array Detector, *Analytica Chimica Acta*, 229 (1990) 177-182.
- [53] A.P. Wade, P.M. Shiundu and P.D. Wentzell, Automated Exploration and Exploitation of Flow-Injection Response Surfaces, *Analytica Chimica Acta*, 237 (1990) 361-379.
- [54] M. Agudo, J. Marcos, A. Rios and M. Valcárcel, Analytical Potential of Flow Gradients in Unsegmented Flow Systems, *Analytica Chimica Acta*, 239 (1990) 211-220.
- [55] B.R. Kowalski, J. Ruzicka and G.D. Christian, Flow Chemography - the Future of Chemical Education ?, *Trends in Analytical Chemistry*, 9 (1990) 8-13.

- 
- [56] M.C. Gutierrez, A. Gomez-Hens and D. Pérez-Bendito, Modular Stopped-Flow / Diode-Array Detection System for Simultaneous Kinetic Analysis, *Analytica Chimica Acta*, 225 (1989) 115-122.
- [57] M.C. Gutierrez, A. Gomez-Hens and D. Pérez-Bendito, Photometric Stopped-Flow Determinations of Butylated Hydroxyanisole [BHA], *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 334 (1989) 344-348.
- [58] J.M. Peña, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, Kinetic Wavelength-Pair Method as an Alternative Approach to Simultaneous Multi-Component Analysis, *Analytica Chimica Acta*, 244 (1991) 81-88.
- [59] A. Cladera, E. Gomes, J.M. Estela, V. Cerdà and J.L. Cerdà, Computer Method for the Simultaneous Kinetic Determination of Compounds in Mixtures Based on the Use of Diode-Array Spectrophotometry, *Analytica Chimica Acta*, 272 (1993) 339-344.
- [60] J. Ares, UVDECODE: an Algorithm for Direct Extraction and Analysis of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons With Derivative UV Spectrophotometry, *Analytica Chimica Acta*, 268 (1992) 135-144.
- [61] H. Mach, C.R. Middaugh and R.V. Lewis, Detection of Proteins and Phenol in DNA Samples With Second-Derivative Spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, 200 (1992) 20-26.
- [62] R.D. Bautista, F. Jimenez, A.I. Jimenez and J.J. Arias, Multi-Component Analysis: Comparison of Various Graphical and Numerical Methods, *Talanta*, 40 (1993) 1687-1694.
- [63] M. Blanco, J. Coelho, H. Iturriaga S. MasPOCH and E. Bertran, Application of Multi-Component Spectrophotometry to Analytical Control of Electroplating Solutions, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 340 (1991) 410-414.

- 
- [64] V. Lagesson and J.M. Newman, Micro-Column Gas Chromatography With Ultra-Violet Detection and Identification Using a Photodiode-Array Spectrophotometer, *Analytical Chemistry*, 61 (1989) 1249-1252.
- [65] J. Cantet, P. Labrune, A. Bergel and M. Comtat, Spectro-Electrochemical Measurement of Gaseous Oxygen, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 1502-1506.
- [66] M. L. Fultz and R.A. Durst, Investigation of Two Multichannel Image Detectors for Use in Spectroelectrochemistry, *Talanta*, 12 (1983) 933-939.
- [67] P. Tittarelli and C. Biffi, Vapour-Phase Behaviour of Slurries in Electrothermal Atomic-Absorption Spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7 (1992) 409-416.
- [68] S.L. Tong and K.S. Chin, Simultaneous Multielement Graphite Furnace Atomic Absorption Measurements Using a Photodiode Array Detector, *Spectrochimica Acta*, 49B (1994) 459-467.
- [69] K. R. Brushwyler, N. Furuta and G.M. Hieftje, Use of a Spectrally Segmented Photodiode-Array Spectrometer for Inductively Coupled Plasma Atomic-Emission Spectroscopy. Examination of Procedures for the Evaluation of Detection Limits, *Talanta*, 37 (1990) 23-32.
- [70] L. Brett, R.G. Stahl and K.J. Timmins, Application of a Photodiode Array Detector to an Arc Spectrograph, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 4 (1989) 333-336.
- [71] P. Shiundu and A.P.Wade, Development of Catalytic Photometric Flow-Injection Methods for the Determination of Selenium, *Analytical Chemistry*, 63 (1991) 692-699.
- [72] T.P. Desmond, R.M. Smith and T. Bumfrey, Investigation into the Chemistry of Colour Photographic Developer Solutions, *Analytical Proceedings*, 31 (1994) 69-70.

- 
- [73] D.J. Malcome-Lawes, J. Myers and C. Pasquini, Instrumentation Based on Microcomputers. Part 4: a Computer Controlled Visible-Light Absorbance Monitor, *Laboratory Microcomputer*, 7 (1988) 89-95.
- [74] Z. Wang, M. Zhao and D.A. Scherson, In Situ Scan Spectrophotometry of Solution-Phase Species Generated on the Surface of a Rotating Disk Electrode, *Analytical Chemistry*, 66 (1994) 1993-1995.
- [75] A. Tan, J. Huang, L. Geng, J. Xu and X. Zhao, A Multi-Channel Photometric Detector for Multi-Component Analysis in Flow Injection Analysis, *Journal of Automatic Chemistry*, 16 (1994) 71-73.
- [76] R.R. Smardzewski, Multi-Element Optical Waveguide Sensor: General Concept and Design, *Talanta*, 35 (1988) 95-101.
- [77] P.E. Walters, Mechanical Conversion of Ebert-type Direct Reading Spectrometers, *Spectrochimica Acta*, 45B (1990) 351-356.
- [78] P.M. Shiundu and P.A. Wade, Versatile IEEE-488 Data Acquisition and Control Routines for a Diode-Array Spectrophotometer, *Journal of Automatic Chemistry*, 13 (1991) 83-92.
- [79] M.S. Caceci, A Simple, Performant Diode Array Spectrophotometer, *Computers & Chemistry*, 13 (1989) 33-38.
- [80] K.C. Lepla and G. Horlick, Photodiode Array Systems for Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, *Applied Spectroscopy*, 43 (1989) 1187-1195.
- [81] B. Fourest, F. David, E. Haltier, N. Borome, A. Richard, D. Lecouturier and G. Lahu, A Rapid Scanning Spectrophotometer: Applications to Some Spectroelectrochemical Experiments, *Computers & Chemistry*, 15 (1991) 207-214.

- 
- [82] E. Naffrechoux, C. Fachinger and J. Suptil, Diode-Array Ultraviolet Detector for Continuous Monitoring of Water Quality, *Analytica Chimica Acta*, 270 (1992) 187-193.
- [83] A. Gerhard, W. Gaede, A. Neubrand, V. Zang, R. van Eldik and P. Stanitzek, A Millisecond Time-Scale UV-VIS Spectrophotometer Based on a Double-Diode Array Detector Coupled to a Stopped-Flow Instrument, *Instrumentation Science & Technology*, 22 (1994) 13-23.
- [84] M.A. Wingerd and R.E. Dessy, A Multi-Mode Spectrometer for Atomic Emission Spectrometry, *Applied Spectroscopy*, 44 (1990) 1444-1460.
- [85] K.W. Busch and M.A. Busch, *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*, John Wiley, New York, 1990, pp. 119-125.
- [86] EG&G Reticon, Product Description G-Series Solid State Line Scanners Data Sheet, EGG, Sunnyvale, California, 1980.
- [87] T.C. O'Haver, An Introduction to Signal Processing in Chemical Measurement, *Journal of Chemical Education*, 68 (1991) A147-A150.
- [88] P.E. Berlot and G.A. Locascio, Ultraviolet-Visible Photodiode Array Spectrophotometer Wavelength Calibration Method. A Practical Computer Algorithm, *The Analyst*, 116 (1991) 313-316.
- [89] D.F. Wirsz, R.J. Browne and M.W. Blades, Dynamic Range Enhancement of Photodiode Array Spectra, *Applied Spectroscopy*, 41 (1987) 1383-1387.
- [90] K.C. Lepla and G. Horlick, Data Processing Techniques for Improved Spectrochemical Measurements With Photodiode Array Spectrometers, *Applied Spectroscopy*, 44 (1990) 1259-1269.
- [91] C.R. Bellato, J.J.R. Rohwedder, I.M. Raimundo Jr and C. Pasquini, Automation of a Plane Grating Spectrograph, *Journal of Automatic Chemistry*, no prelo.

- 
- [92] J.V. Sweedler, Charge Transfer Device Detectors and Their Applications to Chemical Analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24 (1993) 59-98.
- [93] L.T. Skeggs, Jr., An Automatic Method for Colorimetric Analysis, *The American Journal of Clinical Pathology*, 28 (1957) 311-322.
- [94] C. Pasquini and W.A. de Oliveira, Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium (VI), Ammonia, and Phosphorus, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 2575-2579.
- [95] W.E. van der Linden, Classification and Definition of Analytical Methods Based on Flowing Media, *Pure and Applied Chemistry*, 66 (1994) 2493-2500.
- [96] H. Bergamin F<sup>o</sup>, J.X. Medeiros, B.F. Reis and E.A.G. Zagatto, Solvent Extraction in Continuous Flow Injection Analysis. Determination of Molybdenum in Plant Material, *Analytica Chimica Acta*, 101 (1978) 9-16.
- [97] M. Valcárcel and M.D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, vol. 9)*, Elsevier, Amsterdam, 1988, cap. 5.
- [98] J. Ruzicka and E.H. Hansen, Flow Injection Analysis. Part X. Theory, Techniques and Trends, *Analytica Chimica Acta*, 99 (1978) 37-76.
- [99] F.J. Krug, B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.R. Ferreira and A.O. Jacintho, Zone Trapping in Flow Injection Analysis. Spectrophotometric Determination of Low Levels of Ammonium Ion in Natural Waters, *Analytica Chimica Acta*, 151 (1983) 39-48.
- [100] J. Ruzicka, Discovering Flow Injection: Journey From Sample to a Live Cell and From Solution to Suspension, *The Analyst*, 119 (1994) 1925-1934.

- [101] T. Buch-Rasmussen, Determination of D-glucose in Undiluted Whole Blood Using Chemically Modified Electrodes and Segmented Sample Injection in a Flow System, *Analytica Chimica Acta*, 237 (1990) 405-411.
- [102] T. Buch-Rasmussen, Flow System for Direct Determination of Enzyme Substrate in Undiluted Whole Blood, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 932-936.
- [103] G.B. Martin, H.K. Cho and M.E. Meyerhoff, Tubular Debubbler for Segmented Continuous-Flow Automated Analyzers, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 2612-2613.
- [104] C. Pasquini, Mechanical Removal of the Central Sample Zone to Avoid Air Bubbles in Monosegmented Continuous Flow Analysis, *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 2346-2348.
- [105] A.R.A. Nogueira, S.M.B. Brienza, E.A.G. Zagatto, J.L.F. Costa Lima and A.N. Araújo, Multi-site Detection in Flow Analysis. Part 2. Monosegmented Systems with Relocating Detectors for the Spectrophotometric Determination of Boron in Plants, *Analytica Chimica Acta*, 276 (1993) 121-125.
- [106] C.J. Patton, M. Rabb and S.R. Crouch, Electronic Bubble Gate for Colorimetric, Air-Segmented, Continuous Flow Analyzers, *Analytical Chemistry*, 54 (1982) 1113-1118.
- [107] T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, Potentiometric Measurements in Air-Segmented Streams Without Debubbling, *Analytical Chemistry*, 61 (1989) 504-508.
- [108] J.A. Borzitsky, A.V. Dvinin, O.M. Petrukhin and Yu.I. Urusov, Bubble-through Flow Cell for Rapid Continuous-Flow Analysis with Ion-Selective Electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 258 (1992) 135-139.

- [109] D.B. Hibbert, P.W. Alexander, S. Rachmawati and S.A. Caruana, Multiple Sensor Response in Segmented Flow Analysis with Ion-Selective Electrodes, *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 1015-1019.
- [110] B.F. Reis, M.A.Z. Arruda, E.A.G. Zagatto and J.R. Ferreira, An Improved Monosegmented Continuous-Flow System for Sample Introduction in Flame Atomic Spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 206 (1988) 253-262.
- [111] B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, P.B. Martelli and S.M.B. Brienza, Trial Measurements in Flow Analysis, *The Analyst*, 118 (1993) 719-722.
- [112] I. Facchin, J.W. Martins, P.G.P. Zamora and C. Pasquini, Single-Phase Liquid-Liquid Extraction in Monosegmented Continuous-Flow System, *Analytica Chimica Acta*, 285 (1994) 287-292.
- [113] I. Facchin and C. Pasquini, Two-Phase Liquid-Liquid Extraction in Monosegmented Flow Analysis. Determination of Cadmium with 1-(2'-pyridylazo)naphthol, *Analytica Chimica Acta*, 308 (1995) 231-237.
- [114] J.C. de Andrade and E.M. Loboschi, Simple Digital Counter for Use with Monosegmented Continuous Flow Analysis and Related Techniques, *The Analyst*, 113 (1988) 295-296.
- [115] J.C. de Andrade, M. Ferreira, N. Baccan and O.C. Bataglia, Spectrophotometric Determination of Boron in Plants Using Monosegmented Continuous Flow Analysis, *The Analyst*, 113 (1988), 289-293.
- [116] L.C. de Faria and C. Pasquini, Spectrophotometric Determination of Creatinine by Monosegmented Continuous-Flow Analysis, *Journal of Automatic Chemistry*, 14 (1992) 97-100.
- [117] J.C. de Andrade, R.E. Bruns and S.P. Eiras, Catalytic Determination of Molybdenum(VI) in Plants Using Monosegmented Continuous-Flow

- Analysis and Spectrophotometric Detection, *The Analyst*, 118 (1993) 213-217.
- [118] J.C. de Andrade, S.P. Eiras and R.E. Bruns, Study of the Mo(VI) Catalytic Response in the Oxidation of Iodide by Hydrogen Peroxide Using a Monosegmented Continuous-Flow System, *Analytica Chimica Acta*, 255 (1991) 149-155.
- [119] S.P. Eiras, J.C. de Andrade and R.E. Bruns, Effects of Reagent Addition on the Analytical Response of the Mo(VI)-Catalysed Oxidation of Iodide by Hydrogen Peroxide, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 4 (1993) 128-132.
- [120] C. Pasquini, *Instrumentação e Metodologia para Análise em Fluxo Contínuo. Desenvolvimento de um Entalpímetro de Fluxo, de um Sistema Monosegmentado e Construção de um Circuito Retentor de Picos*, Tese de Doutorado, UNICAMP, 1984, cap. 5.
- [121] L.C. Tian, X.P. Sun, Y.Y. Xu and Z.L. Zhi, Segmental Flow-Injection Analysis: Device and Applications, *Analytica Chimica Acta*, 238 (1990) 183-190.
- [122] L.C. Tian, Y.Y. Xu, X.P. Sun and L.S. Wang, A New Flow Analysis System - The Whole Sample Zone Segmented by Air for Flow Injection Analysis, *Fenxi-Shiyanshi*, 17 (1989) 208-212; Analytical Abstract 5111J006.
- [123] J.A. Borzitsky, A.V. Dvinin, O.M. Petrukhin and Y.I. Urusov, Segmental Flow Injection With Ion-Selective Electrodes for the Determination of Fluoride in Water, *Analytica Chimica Acta*, 274 (1993) 125-128.
- [124] L.C. Tian and S.M. Wu, Determination of Chemical Oxygen Demand in Aqueous Environmental Samples by Segmented Flow-Injection Analysis, *Analytica Chimica Acta*, 261 (1992) 301-305.

- [125] S.M. Wu and L.C. Tian, Rapid Determination of Chemical Oxygen Demand in Aqueous Environmental Samples by Monosegmented Continuous-Flow Analysis, *Fenxi-Shiyanshi*, 12 (1993) 78-80; Analytical Abstract 5603H150.
- [126] R. Q. Thompson, Peroxidase-Based Colorimetric Determination of L-Ascorbic Acid, *Analytical Chemistry*, 59 (1987) 1119-1121.
- [127] Y.S. Hsieh and S.R. Crouch, Stopped-Flow, Air-Segmented Continuous Flow: Kinetic Determinations of Glucose and Phosphate in Wine and Serum Samples, *Analytica Chimica Acta*, 284 (1993) 159-166.
- [128] I.I. Koukli and A.C. Calokerinos, Determination of Quinine and Quinidine by Continuous-Flow Chemiluminescence, *Analytica Chimica Acta*, 236 (1990) 463-468.
- [129] A.T. Campbell and A.G. Howard, A Semi-Continuous Flow Method for the Trace Analysis of Dissolved Inorganic Antimony, *Analytical Proceedings*, 26 (1989) 32-34.
- [130] C. Kwade, R. Voigtlander and K. Cammann, On-Line Sample Preparation and Determination of Phenols with a Flow-Analysis Method, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 342 (1992) 426-428.
- [131] M. Lopez-Nieves, P.D. Wentzell and S.R. Crouch, Continuous Flow Method for the Determination of Aromatic Aldehydes, *Analytica Chimica Acta*, 258 (1992) 253-258.
- [132] M. Sugiyama and T. Hori, Air-Segmented Continuous-Flow Analysis for Vanadium Based on a Catalytic Reaction with Bindschedler's Green Leuco Base, *Analytica Chimica Acta*, 261 (1992) 189-196.
- [133] M.D. Ron Vaz, A.C. Edwards, C.A. Shand and M. Cresser, Determination of Dissolved Organic Phosphorus in Soil Solution by an Improved Automated Photo-Oxidation Procedure, *Talanta*, 39 (1992) 1479-1487.

- 
- [134] P. Jayaweera and L. Ramaley, Automated Segmented Flow Electrochemical Analyzer, *Analytical Chemistry*, 61 (1989) 2102-2108.
- [135] L.R. Snyder and H.J. Adler, Dispersion in Segmented Flow through Glass Tubing in Continuous-Flow Analysis: The Ideal Model, *Analytical Chemistry*, 48 (1976) 1017-1022.
- [136] L.R. Snyder and H.J. Adler, Dispersion in Segmented Flow through Glass Tubing in Continuous-Flow Analysis: The Nonideal Model, *Analytical Chemistry*, 48 (1976) 1022-1027.
- [137] G.E.P. Box, W.G. Hunter and J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters*, Wiley, New York, 1978, cap. 12.
- [138] W.F. Jardim and J.J.R. Rohwedder, Catalytic Reactions: Determination of Trace of Copper in Natural Samples, *The Analyst*, 111 (1986) 849-850.
- [139] C. Pasquini e I.M. Raimundo Jr., Um Fotômetro Simples para Análise por Injeção em Fluxo, *Química Nova*, 7 (1984) 24-28.
- [140] M. Valcárcel and M.D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, vol. 9)*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [141] M. Valcárcel and M.D. Luque de Castro, *Analysis por Inyección en Flujo*, Imprenta San Pablo, Córdoba, 1984.
- [142] B.F. Rocks, Flow Injection Analysers for Clinical Use, *Analytical Proceedings*, 26 (1989) 321-322.
- [143] P. Hemmings, Progress in the Water Industry - Automation in a Water Company Laboratory, *Analytical Proceedings*, 26 (1989) 133-134.
- [144] R.G. Haas, Clinical Instrumentation (General Chemistry and Immunoassay Analyzers), *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 444R-449R.
- [145] T. Kanluan, S. Intaramanee, S. Tangvorasittichai, O. Tangvorasittichai, L. Suwanton, S. Manochiopinij, S. Tantrarongroj and P. Leangphibul,

- Laboratory Evaluation of the COBAS MIRA S Random Access Analyser, *Journal of Automatic Chemistry*, 13 (1991) 97-100.
- [146] E.M. Narebor, Technical Note: Evaluation of Three Autoanalysers for Use in Chemical Pathology, *Journal of Automatic Chemistry*, 12 (1990) 189-194.
- [147] J.F. Pons, A. Alumá, F. Antoja, C. Biosca, M.J. Alsina and R. Galimany, Evaluation of the Dacos 3.0 Analyser, *Journal of Automatic Chemistry*, 12 (1990) 155-162.
- [148] C. Pasquini and L.C. de Faria, Operator-Free Flow Injection Analyser, *Journal of Automatic Chemistry*, 13 (1991) 143-146.
- [149] B.F. Reis, M.F. Giné, F.J. Krug and H. Bergamin F<sup>o</sup>, Multipurpose Flow Injection System. Part 1. Programmable Dilutions and Standard Additions for Plant Digests Analysis by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 7 (1992) 865-868
- [150] G.D. Clark, G.D. Christian, J. Ruzicka, G.F. Anderson and J.A. van Zee, A Microcomputer-Based Experiment Control and Detection System for Flow Injection Analysis, *Analytical Instrumentation*, 18 (1989) 1-21.
- [151] D.J. Malcome-Lawes and C. Pasquini, Novel Approach to Non-Segmented Flow Analysis. III. Nitrate, Nitrite and Ammonium in Waters, *Journal of Automatic Chemistry*, 10 (1988) 192-197.
- [152] D.J. Malcome-Lawes, C. Pasquini and K.H. Wong, Instrumentation Based on Microcomputers. V. A Computer-Operated Flow-Injection Analyser, *Laboratory Microcomputer*, 8 (1989) 44-52.
- [153] D.J. Malcome-Lawes, K.H. Wong and B.V. Smith, Application of a Computer-Controlled Flow Analyser to the Determination of Glucose and to the Study of  $\beta$ -galactosidase Activity, *Journal of Automatic Chemistry*, 14 (1992) 73-78.

- [154] M. Tubino, Um "Stopped-Flow" de Fácil Construção: Uma Improvisação que Dá Certo, *Química Nova*, 8 (1985) 324-328.
- [155] B.F. Reis, Uma Cella de Fluxo Feita em Acrílico para Espectrofotometria em Sistemas de Análise Química por Injeção em Fluxo, *Química Nova*, 17 (1994) 228-229.
- [156] D.J. Malcome-Lawes, *Microcomputers and Laboratory Instrumentation*, 2nd. edition, Plenum Press, New York, 1988.
- [157] L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, R.R. Trussel, editors, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th. edition, Port City Press, Baltimore, 1989.
- [158] C.A. Burtis and T.D. Geary, Glossary of Bioanalytical Nomenclature. Part 1: General Terminology, Body Fluids, Enzymology, Immunology, *Pure and Applied Chemistry*, 66 (1994) 2587-2604.
- [159] B.F. Reis, A.O. Jacintho, J. Mortatti, F.J. Krug, E.A.G. Zagatto, H. Bergamin F<sup>o</sup> and L.C.R. Pessenda, Zone-Sampling Processes in Flow Injection Analysis, *Analytica Chimica Acta*, 123 (1981) 221-228.
- [160] J. Toei, An Improved Zone Sampling Method for Flow Injection Analysis, *Analytical Letters*, 21 (1988) 1633-1651.
- [161] G.D. Clark, J. Ruzicka and G.D. Christian, Split Zone Flow Injection Analysis: An Approach to Automated Dilutions, *Analytical Chemistry*, 61 (1988) 1773-1778.
- [162] E.H. Hansen and J. Ruzicka, Flow Injection Analysis. Part IV. The Determination of Phosphate and Chloride in Blood Serum by Dialysis and Sample Dilution, *Analytica Chimica Acta*, 87 (1976) 353-363.
- [163] D.A. Whitman and G.D. Christian, Cascade System for Rapid On-line Dilutions in Flow Injection Analysis, *Talanta*, 36 (1989) 205-211.

- 
- [164] J.F. van Staden, Automated Prevalve Dilution in Flow-Injection Analysis. The Automated Determination of Chloride in Surface, Ground and Domestic Water, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 322 (1985) 36-41.
- [165] J.F. van Staden, Automated Dilution in Flow Injection Analysis with Double On-line Dialysis. A System for the Determination of Chloride in Industrial Effluents and Plating Bath Solutions, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 340 (1990) 415-418.
- [166] S. Olsen, J. Ruzicka and E.H. Hansen, Gradient Techniques in Flow Injection Analysis. Stopped-Flow Measurement of the Activity of Lactate Dehydrogenase with Electronic Dilution, *Analytica Chimica Acta*, 136 (1982) 101-112.
- [167] J. Ruzicka and E.H. Hansen, Recent Developments in Flow Injection Analysis: Gradient Techniques and Hydrodynamic Injection, *Analytica Chimica Acta*, 145 (1983) 1-15.
- [168] N.W. Tietz, editor, *Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
- [169] M. Koudelka-Hep, D.J. Strike and N.F. de Rooij, Miniature Electrochemical Glucose Biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 281 (1993) 461-466.
- [170] J.M. Fernández-Romero and M.D. Luque de Castro, Flow-Through Biosensor Based of an Enzyme and Transient Retention of a Reaction Product, *Analytical Chemistry*, 65 (1993) 3048-3052.
- [171] J. Toei, Rapid, Miniaturized Procedure for the Stopped-Flow Determination of Glucose Based on Flow Injection Analysis, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 332 (1988) 167-170.
- [172] J. Toei, Determination of Glucose in Clinical Samples by Flow Reversal Flow Injection Analysis, *The Analyst*, 113 (1988) 475-478.

- [173] J. Toei, Flow-Reversal Flow Injection Analysis - II. Determination of Glucose with a Double-Pump System, *Talanta*, 36 (1989) 1233-1236.
- [174] D. Narinesingh, V.A. Stoute, G. Davis, F. Shaama and T.T. Ngo, Combining Flow Injection Analysis and Immobilized Enzymes for Rapid and Accurate Determination of Serum Glucose, *Analytical Letters*, 24 (1991) 727-747.
- [175] M. Tabata, T. Murachi, J. Endo and M. Totani, Use of Various Types of Column Reactors for Flow-Injection Analysis, *Journal of Chromatography*, 597 (1992) 435-442.
- [176] B.A. Petersson, E.H. Hansen and J. Ruzicka, Enzymatic Assay by Flow Injection Analysis with Detection by Chemiluminescence: Determination of Glucose, Creatinine, Free Cholesterol and Lactic Acid Using an Integrated FIA Microconduit, *Analytical Letters*, 19 (1986) 649-665.
- [177] F. Winqvist, I. Lundström and B. Danielsson, Determination of Creatinine by an Ammonia-Sensitive Semiconductor Structure and Immobilized Enzymes, *Analytical Chemistry*, 58 (1986) 145-148.
- [178] M.T. Jeppesen and E.H. Hansen, Determination of Creatinine in Undiluted Blood Serum by Enzymatic Flow Injection Analysis with Optosensing, *Analytica Chimica Acta*, 214 (1988) 147-159.
- [179] H.L. Pardue, B.L. Bacon, M.G. Nevius and J.W. Skoug, Kinetic Study of the Jaffé Reaction for Quantifying Creatinine in Serum: 1. Alkalinity Controlled with NaOH, *Clinical Chemistry*, 33 (1987) 278-285.
- [180] M.C. Gennaro, C. Abrigo, E. Marengo, C. Baldin and M.T. Martelletti, Determination of Creatinine in Human Serum. Statistical Intercalibration of Methods, *The Analyst*, 120 (1995) 47-51.

- [181] J. F. van Staden, Determination of Creatinine in Urine and Serum by Flow-Injection Analysis Using the Jaffé Reaction, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 315 (1983) 141-144.
- [182] B. Fernández-Band, P. Linares, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, Kinetic Determination of Creatinine in Biological Fluids by Stopped-Flow Injection Analysis, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 338 (1990) 752-754.
- [183] C.A. Georgiou and M.A. Koupparis, Construction and Evaluation of an Automated Flow-Stopped Flow Analyser for Multipoint Reaction Rate Spectrophotometric Methods. Determination of Ammonia Nitrogen, Creatinine and Phosphate, *Journal of Automatic Chemistry*, 13 (1991) 199-207.
- [184] P.D. Fesus, M. Pressac, F. Braconnier and P. Aymard, Automated Determination of Urinary Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Chloride, Inorganic Phosphate, Urea, and Creatinine without Sample Dilution, with the "RA-XT", *Clinical Chemistry*, 35 (1989) 481-483.
- [185] T.D. Yerian, G.D. Christian and J. Ruzicka, Enzymatic Determination of Urea in Water and Serum by Optosensing Flow Injection Analysis, *The Analyst*, 11 (1986) 865-873.
- [186] B.A. Petersson, H.B. Andersen and E.H. Hansen, Determination of Urea in Undiluted Blood Samples by Flow Injection Analysis Using Optosensing, *Analytical Letters*, 20 (1987) 1977-1994.
- [187] H. Meier, F. Lantreibecq and C. Tran-Minh, Application and Automation of Flow Injection Analysis (FIA) Using Fast Responding Enzyme Glass Electrodes to Detect Penicillin in Fermentation Broth and Urea in Human Serum, *Journal of Automatic Chemistry*, 14 (1992) 137-143.

- [188] D. Taylor and T.A. Nieman, Bipolar Pulse Conductometric Detection of Enzyme Reactions in Flow-Injection Systems. Urea in Serum and Urine, *Analytica Chimica Acta*, 186 (1986) 91-100.
- [189] L.C. de Faria, C. Pasquini and G. Oliveira Neto, Determination of Urea in Serum by Using Naturally Immobilized Urease in a Flow Injection Conductimetric System, *The Analyst*, 116 (1991) 357-360.
- [190] B.A. Petersson, Enzymatic Determination of Urea in Undiluted Whole Blood by Flow Injection Analysis Using an Ammonium Ion-Selective Electrode, *Analytica Chimica Acta*, 209 (1988) 239-248.
- [191] P. Solich, M. Polasek, R. Karlicek, O. Valentova and M. Marek, Spectrophotometric Flow-Injection Determination of Urea in Body Fluids by Using an Immobilized Urease Reactor, *Analytica Chimica Acta*, 218 (1989) 151-155.
- [192] D. Narinesingh, A. Pope and T.T. Ngo, Flow-Injection Analysis of Serum Urea Using o-Phthalaldehyde and Naphthylethylenediamine, *Talanta*, 39 (1992) 1233-1238.