



1150060833

 IQ
T/UNICAMP F733d

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

Desenvolvimento de um Fotômetro Multicanal Baseado em um Arranjo de Diodos Emissores de Luz

Dissertação de Mestrado

**Aluno: Alexandre Fonseca
Orientador: Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr.**

Campinas – SP

Julho / 2004

UNIDADE	L10
Nº CHAMADA	1/12/2004
	F7337
V	EX
TOMBO BC	60833
PROC.	16.22.04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	22,00
DATA	28-12-04
Nº CPD	

Bib Id 331917

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

F7337
D

Fonseca, Alexandre.

Desenvolvimento de um fotômetro multicanal baseado em um arranjo de diodos emissores de luz / Alexandre Fonseca. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Ivo Milton Raimundo Jr.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. LED. 2. Espectrofotometria. 3. Quimiometria.
4. Instrumentação. I. Raimundo Jr., Ivo Milton.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*Aos meus pais, Sebastião e Ivone,
pela dedicação e paciência;
Aos meus irmãos, Maria e Thiago
pela amizade e compreensão
e especialmente à minha esposa,
Alessandra, pelo amor, carinho e apoio
em todos os momentos*

*Que estranha é a sina que cabe a nós, mortais!
Cada um de nós está aqui para uma temporada;
com que propósito, não se sabe [...] Os ideais que
têm iluminado meu caminho, e repetidamente me
têm renovado a coragem para enfrentar a vida
com ânimo, são a Bondade, a Beleza e a Verdade*

ALBERT EINSTEIN
The world as I see it (1931)

Agradecimentos

- ✓ À DEUS;
- ✓ Ao Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr., pela amizade, confiança e orientação;
- ✓ Ao Prof. Dr. Célio Pasquini, pelas dicas e sugestões;
- ✓ Ao Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder, pelas contribuições e esclarecimentos valiosos;
- ✓ Ao Emerson Vidal de Aquino, pela amizade, paciência e auxílio durante todo o trabalho;
- ✓ À Dupla Ismael Pereira Chagas e Fernando Seiji Yonehara, pela amizade e apoio computacional;
- ✓ Ao Luiz Alexandre Sacorague, pelo questionamento e discussão do trabalho;
- ✓ Ao Fabiano Barbieri Gonzaga, pelas dicas de programação;
- ✓ Ao Adilson Kuratomi pela grande ajuda na construção dos circuitos;
- ✓ À Cláudia (espectrofotometria UV-VIS), Helena (espectrometria de Absorção Atômica) e ao Mário (mecânica fina) pelos serviços de fundamental importância;
- ✓ Ao Prof. Dr. Nivaldo Baccan pelas amostras de Ligas metálicas;
- ✓ Aos amigos da secretaria de pós-graduação: Bel, Cely, Rodrigo e André, sempre prestativos e eficientes nas questões burocráticas;

- ✓ Aos amigos do GIA: Camila, Celeste, Claudete, Eliane, Fernanda, Fernandão, Flávia, Giovana, Heber, Heitor, Heron, Karime, Kássio, Maíra, Márcia, Mário, Sérgio, Sílvia e Simone pela amizade e agradável convivência;
- ✓ Aos amigos do LQA: Aluísio, Carlos, Cláudia, Daniela, Efigênia, Gilberto, Gilmar, Gislaíne, Juliano, Lorena, Márcia, Marco e Patrícia, pela grande amizade;
- ✓ Aos amigos da Atlântida: Anderson, Jorge e Rogério;
- ✓ Ao Carlos e ao Lucas;
- ✓ Aos professores e funcionários do IQ;
- ✓ À UNICAMP;
- ✓ À CAPES, pela bolsa de estudos;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho,

MUITO OBRIGADO

CURRÍCULUM VITAE

Alexandre Fonseca

Fomação Acadêmica

- Cursando Pós Graduação (Programa de Mestrado) no Instituto de Química da UNICAMP. **Área:** Química Analítica **Início:** agosto de 2002
- Licenciado em Química
Universidade Federal de São Carlos
São Carlos – SP Período: 1998-2001

Estágios e Atividades no Ensino

- Trabalho de monitoria na disciplina “Química Analítica Experimental II”, DQ-UFSCar, 2001.

Trabalhos Apresentados

- FONSECA, A.; RAIMUNDO JR, I.M.; “Aplicação de um Fotômetro Multicanal Baseado em um Arranjo de Diodos Emissores de Luz para a Classificação de Águas Minerais”; 27^a Reunião Anual da SBQ, Salvador-BA, 2004, QA-201
- FONSECA, A.; KURATOMI, A. T.; RAIMUNDO JR, I.M.; “Desenvolvimento de um Fotômetro Multicanal Baseado em um Arranjo de Diodos Emissores de Luz”; 26^a Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG, 2003, QA-005

Trabalhos Publicados

- FONSECA, A.; RAIMUNDO JR, I.M.; “A multichannel photometer based on an array of light emitting diodes for use in multivariate calibration”, Anal. Chim. Acta, no prelo.

DESENVOLVIMENTO DE UM FOTÔMETRO MULTICANAL BASEADO EM UM ARRANJO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ

Aluno: Alexandre Fonseca

Orientador: Ivo M. Raimundo Jr

Resumo:

O desenvolvimento de um fotômetro multicanal baseado em um arranjo de oito diodos emissores de luz (LED) é descrito. Feixes de fibras ópticas foram empregados para guiar a radiação dos LEDs até a cela de detecção e da cela até o detector (fotodiodo). O instrumento foi projetado para realizar medidas em um único comprimento de onda continuamente ou em todos os comprimentos (470, 500, 525, 562, 590, 612, 636 e 654 nm) de maneira seqüencial, permitindo sua aplicação em métodos de análise multivariada. Ensaios realizados com o fotômetro indicaram "drifts" menores que $2 \mu\text{V h}^{-1}$ e uma precisão média de 0,001 unidade em medidas de absorbância.

O instrumento foi aplicado à determinação simultânea de Zn(II) e Cu(II) em amostras de latão e de medicamentos empregando-se regressão linear múltipla (MLR) e à classificação de águas minerais comerciais a partir de análise de componentes principais (PCA). O melhor modelo de calibração, construído para a primeira aplicação, apresentou erros médios quadráticos de previsão (RMSEP) de 0,06 e 0,12 mg L^{-1} para Zn(II) e Cu(II), respectivamente. Os resultados obtidos com o fotômetro foram comparados com aqueles determinados por espectrometria de absorção atômica (FAAS), não sendo encontradas diferenças significativas ao nível de 95% de confiança. As amostras de águas foram classificadas de acordo com suas respectivas procedências ao longo das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), as quais explicaram 96 e 2% da variância total encontrada, respectivamente.

DEVELOPMENT OF A MULTICHANNEL PHOTOMETER BASED ON AN ARRAY OF LIGHT EMITTING DIODES

Author: Alexandre Fonseca

Supervisor: Prof. Dr. Ivo M. Raimundo Jr.

Abstract:

The development of a multichannel photometer based on an array of eight Light Emitting Diodes (LED) is described. Optical fibre bundles were employed to guide the radiation of the LED to the measuring cell and from the cell to the photodiode detector. The instrument was designed to perform measurements in a single wavelength continuously as well as in all wavelengths (470, 500, 525, 562, 590, 612, 636 and 654 nm) sequentially, allowing its application in multivariate analysis methods. Evaluation of the photometer indicated drift lower than $2 \mu\text{V h}^{-1}$ and a precision better than 0,003 units in measurements of absorbance.

The instrument was applied for the simultaneous determination of Zn(II) and Cu(II) in metallic alloys and pharmaceutical samples, by employing Multiple Linear Regression (MLR) and for the classification of commercial mineral waters, by using Principal Components Analysis (PCA). The best calibration model, constructed for the first application, presented Root Mean Square Errors of Prediction (RMSEP) of 0.06 and 0.12 mg L^{-1} for Zn(II) and Cu(II), respectively. The results obtained with the photometer were compared with those determined by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS), showing no significant differences at the 95 % confidence level. Mineral water samples were classified according to their respective origins by two Principal Components (PC1 and PC2), which explained 96 and 2 % of the total variance, respectively.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMS-EAM	Análise Multicomponente Simultânea por Espectrofotometria de Absorção Molecular
A/D	Conversor Analógico Digital
ABT	Azul de Bromotimol
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CLS	Método Clássico de Mínimos Quadrados
EBT	Negro de Ericromo T
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
HCA	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
ILS	Método inverso de Mínimos Quadrados
LED	Diodo Emissor de Luz
MLR	Regressão Linear Múltipla
MSFA	Análise em Fluxo Monossegmentado
NC	Número de Varreduras Previamente Definidos
NR	Número de Varreduras Realizadas
PAR	4-(2-Pridilazo)-Resorcinol
PC	Componente Principal
PC1	Primeira Componente Principal
PC2	Segunda Componente Principal
PCA	Análise de Componentes Principais
PCR	Regressão em Componentes Principais
PLS	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais
RMSEP	Erro Médio Quadrático de Previsão
UV-Vis	Ultravioleta - Visível
XO	Alaranjado de Xilenol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de alguns LEDs disponíveis comercialmente.....	7
Tabela 2: Comprimentos de onda nos picos de emissão e larguras de banda a meia altura para os LEDs empregados no fotômetro.....	38
Tabela 3: “Drifts” dos sinais dos LEDs.....	41
Tabela 4: Estabilidades dos sinais de Absorbância.....	41
Tabela 5: Respostas para leituras seqüenciais e individuais dos LEDs.....	43
Tabela 6: Comparação entre as inclinações das curvas obtidas para Zn(II).....	46
Tabela 7: Comparação entre as inclinações das curvas obtidas para o ABT.....	48
Tabela 8: Parâmetros encontrados para a validação externa do modelo construído para o sistema Zn(II)/Cu(II).....	51
Tabela 9: Parâmetros encontrados para a validação externa do modelo construído para o sistema Zn(II)/Ni(II).....	51
Tabela 10: Concentrações de Zn(II) e Cu(II) determinadas em amostras comerciais.....	53
Tabela 11: Características das amostras de águas indicadas nos rótulos.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Redes Cristalinas de materiais semicondutores.....	4
Figura 2: Disposição dos semicondutores do tipo p e do tipo n em um diodo..	5
Figura 3: Fenômeno de eletroluminescência em Diodos Emissores de Luz.....	6
Figura 4: Distribuição das amostras ao longo das Componentes Principais e das variáveis originais.....	16
Figura 5: Exemplo de um dendograma.....	18
Figura 6: Circuitos eletrônicos para acionamento dos LEDs e amplificação do sinal.....	21
Figura 7: Disposição dos LEDs e dos feixes de fibras ópticas.....	22
Figura 8: Acoplamento do fotômetro à uma cela de fluxo.....	23
Figura 9: Esquema eletrônico da fonte simétrica empregada para alimentação dos circuitos.....	23
Figura 10: Interface ao usuário para o programa de controle do fotômetro.....	25
Figura 11: Algoritmo desenvolvido para leituras em modo múltiplo seqüencial em um sistema MSFA.....	26
Figura 12: Distribuição das amostras empregadas para calibração e validação do modelo quimiométrico.....	29
Figura 13: Sistema MSFA empregado para a avaliação do fotômetro e para a determinação simultânea de metais.....	31
Figura 14: Sistema MSFA empregado para a classificação de águas.....	32
Figura 15: Visão geral do sistema de análise.....	32
Figura 16: Espectros de emissão normalizados dos LEDs.....	37
Figura 17: Perfil intensidade vs tempo para o LED com emissão em 525 nm..	39
Figura 18: Perfil intensidade vs tempo para o LED com emissão em 590 nm..	40
Figura 19: Curvas analíticas para Zn(II)-XO (Zn(II) 1,0 – 5,0 mg L ⁻¹) obtidas com o fotômetro baseado em LEDs.....	44

Figura 20: Curvas analíticas para Zn(II)-XO (Zn(II) 1,0 – 5,0 mg L ⁻¹) obtidas com o espectrofotômetro comercial.....	44
Figura 21: Espectros de absorção normalizados dos complexos Zn(II)-XO (Zn ²⁺ 1-5 mg L ⁻¹) e espectros de emissão normalizados dos LEDs.....	45
Figura 22: Curvas analíticas para o reagente azul de bromotimol (ABT 1,0 – 5,0 mg L ⁻¹) obtidas com o fotômetro baseado em LEDs.....	47
Figura 23: Curvas analíticas para o reagente azul de bromotimol (ABT 1,0 – 5,0 mg L ⁻¹) obtidas com o espectrofotômetro comercial.....	47
Figura 24: Espectros de absorção normalizados para o reagente azul de bromotimol (ABT 1-5 mg L ⁻¹) em tampão pH 10 e espectros de emissão normalizados dos LEDs.....	48
Figura 25: Estrutura para os complexos dos metais estudados com alaranjado de xilenol em pH 5,7.....	49
Figura 26: Espectros de absorção normalizados dos complexos Zn(II), Cu(II) e Ni(II) (2,0 mg L ⁻¹) com alaranjado de xilenol e espectros de emissão normalizados dos LEDs.....	50
Figura 27: Gráfico de scores da PCA realizada com os dados para o reagente murexida.....	57
Figura 28: Gráfico de scores da PCA realizada com os dados para o reagente EBT.....	57
Figura 29: Gráfico de scores da PCA realizada com os dados para o reagente PAR.....	58
Figura 30: Gráfico de scores da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida, EBT e PAR.....	58
Figura 31: Gráfico de loadings da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida, EBT e PAR.....	59
Figura 32: Gráfico de scores da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida e EBT.....	60
Figura 33: Gráfico de loadings da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida e EBT.....	60

Figura 34: Gráfico de scores da PCA realizada com 4 variáveis (502 e 657 nm com EBT e 468 e 595 nm com murexida).....	61
Figura 35: Dendograma construído com 4 variáveis (502 e 657 nm com EBT e 468 e 595 nm com murexida).....	63

I - Introdução

A espectrofotometria de absorção molecular na região UV-visível é uma técnica analítica amplamente utilizada na determinação de espécies orgânicas e inorgânicas. A precisão e a exatidão adequadas e o custo significativamente menor que o de outras técnicas são alguns dos fatores que contribuem para o seu sucesso, principalmente em análises de rotina. Apesar destas vantagens, os métodos baseados na espectrofotometria UV-Vis apresentam alguns problemas, usualmente relacionados à baixa seletividade, que dificultam suas aplicações em análises mono e multielementares.

O uso de métodos de calibração multivariada tais como regressão linear múltipla (MLR), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e regressão em componentes principais (PCR), aliado à instrumentação baseada em detecção multicanal, como espectrofotômetros com arranjo de fotodiodos ou com arranjo de dispositivos de carga acoplada (CCD), têm renovado o interesse na aplicação desta técnica para determinações simultâneas. Os bons resultados obtidos para a determinação multicomponente em sistemas químicos altamente interferentes são provas da eficiência dessas metodologias [1].

Os espectrofotômetros com arranjo de fotodiodos, "diode array", como são geralmente conhecidos, são bastante compactos e apresentam uma série de vantagens, tais como aquisição de espectros em intervalos de tempo bastante curtos (da ordem de ms), boas resolução e exatidão nas medidas de comprimento de onda e sensibilidade e faixa dinâmica adequadas para muitas aplicações em Química Analítica. Entretanto, a realização de medidas em centenas de comprimentos de onda, obtidas quando são empregados transdutores multicanais, pode ser desnecessária em análises multivariadas. Prova disso é o uso de metodologias baseadas em procedimentos quimiométricos para a seleção de variáveis, com o objetivo de reduzir ruídos e redundâncias e assim obter modelos mais robustos [2-4]. Além desses fatores, o custo para aquisição de um espectrofotômetro *diode array* varia entre US\$ 7.000 e US\$ 9.000

(sem o microcomputador), o que pode ser considerado elevado para muitos laboratórios, dependendo das aplicações e da frequência de uso.

Os diodos emissores de luz (light emitting diodes, LEDs) têm sido empregados com bastante frequência em sistemas ópticos de detecção [5-15]. As bandas de emissão relativamente estreitas, as altas intensidades de emissão e o tamanho compacto são algumas das características destes dispositivos que os tornam úteis como fontes de luz monocromática em muitos instrumentos. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de LEDs que emitem radiação do ultravioleta ao infravermelho, cobrindo praticamente toda a região do espectro visível, e com o surgimento de fibras ópticas que permitem a montagem de feixes, a construção de fotômetros multicanais baseados em LEDs tornou-se relativamente simples [5]. Nestes novos instrumentos, o acionamento seqüencial dos emissores e a concomitante leitura dos sinais individuais permitem realizar medidas em vários comprimentos de onda, em intervalos de tempo bastante reduzidos (da ordem de décimos de segundos), tal como em um espectrofotômetro *diode array*. Empregando-se LEDs que emitem radiação em comprimentos de onda, previamente escolhidos através de uma seleção de variáveis adequada, a informação gerada por um fotômetro multi-LED pode ser suficiente para o seu uso em análises discriminatórias ou em determinações simultâneas baseadas em métodos de análise multivariada.

Para a construção de um fotômetro multicanal baseado em um arranjo de LEDs e feixes de fibras ópticas, toda a parte óptica, usual nos espectrofotômetros convencionais, como lentes, filtros e monocromadores, são dispensadas. Transdutores multicanais, como os arranjos de fotodiodo ou de CCD, também não são necessários, uma vez que a característica multicanal deve-se às diferentes fontes de radiação (LEDs) e não ao transdutor. Desse modo, um fotômetro baseado nestes dispositivos podem ser uma alternativa aos espectrofotômetros multicanais, apresentando um custo consideravelmente baixo e uma performance aceitável para diversas aplicações.

1.1 - Diodos Emissores de Luz

Os diodos emissores de luz (LEDs) foram empregados pela primeira vez em análise química há três décadas [16]. Atualmente, estes dispositivos encontram uso em alguns instrumentos comerciais [17] e em muitos sistemas dedicados [18-19]. O grande interesse em seu uso analítico é evidenciado pelo crescente número de publicações sobre o assunto, que incluem artigos de revisão [20-21].

Um LED, como o próprio nome diz, é um diodo capaz de emitir luz quando lhe é aplicada uma diferença de potencial entre os seus dois terminais (cátodo e ânodo). Para uma boa compreensão de como ocorre este fenômeno é preciso, antes de tudo, conhecer um pouco sobre o funcionamento dos diodos convencionais. Não é objetivo do trabalho aprofundar-se neste assunto, porém, uma breve discussão será abordada nesta seção e o leitor interessado pode consultar livros de eletrônica [22] e de instrumentação analítica [23] para maiores esclarecimentos.

Os diodos são fabricados a partir de materiais semicondutores, usualmente silício ou germânio, que sofreram inserções de diferentes impurezas (dopantes) num processo denominado dopagem. Esses materiais são conhecidos como semicondutores do tipo p ou tipo n, dependendo da espécie utilizada como dopante.

Em um cristal de silício (família IVA) não dopado, cada átomo do elemento forma quatro ligações covalentes com quatro átomos adjacentes. Eventualmente, com uma pequena quantidade de energia (apenas com o calor ambiente), alguns dos elétrons que participam destas ligações tornam-se livres, ocasionando a formação de lacunas ao longo da rede cristalina (Figura 1A). Estes elétrons podem se recombinar com as lacunas formadas em outras regiões proporcionando, deste modo, a movimentação indireta das mesmas. Com a aplicação de uma diferença de potencial sobre o material semicondutor, as lacunas e os elétrons livres movimentam-se em sentidos opostos possibilitando a condução de corrente elétrica pelo material.

A função da dopagem de semicondutores é aumentar a condutividade do material pelo aumento do número de lacunas ou de elétrons livres na rede cristalina. Os semicondutores do **tipo p** são obtidos através da dopagem do material semicondutor

intrínseco com elementos da família IIIA. Esses elementos apresentam um elétron de valência a menos que o silício, causando o aumento do número de lacunas na rede (Figura 1-B). Em um semiconductor do tipo n, aumenta-se o número de elétrons livres na rede pela inserção de impurezas da família VA, as quais apresentam um elétron de valência a mais que os átomos de silício (Figura 1-C).

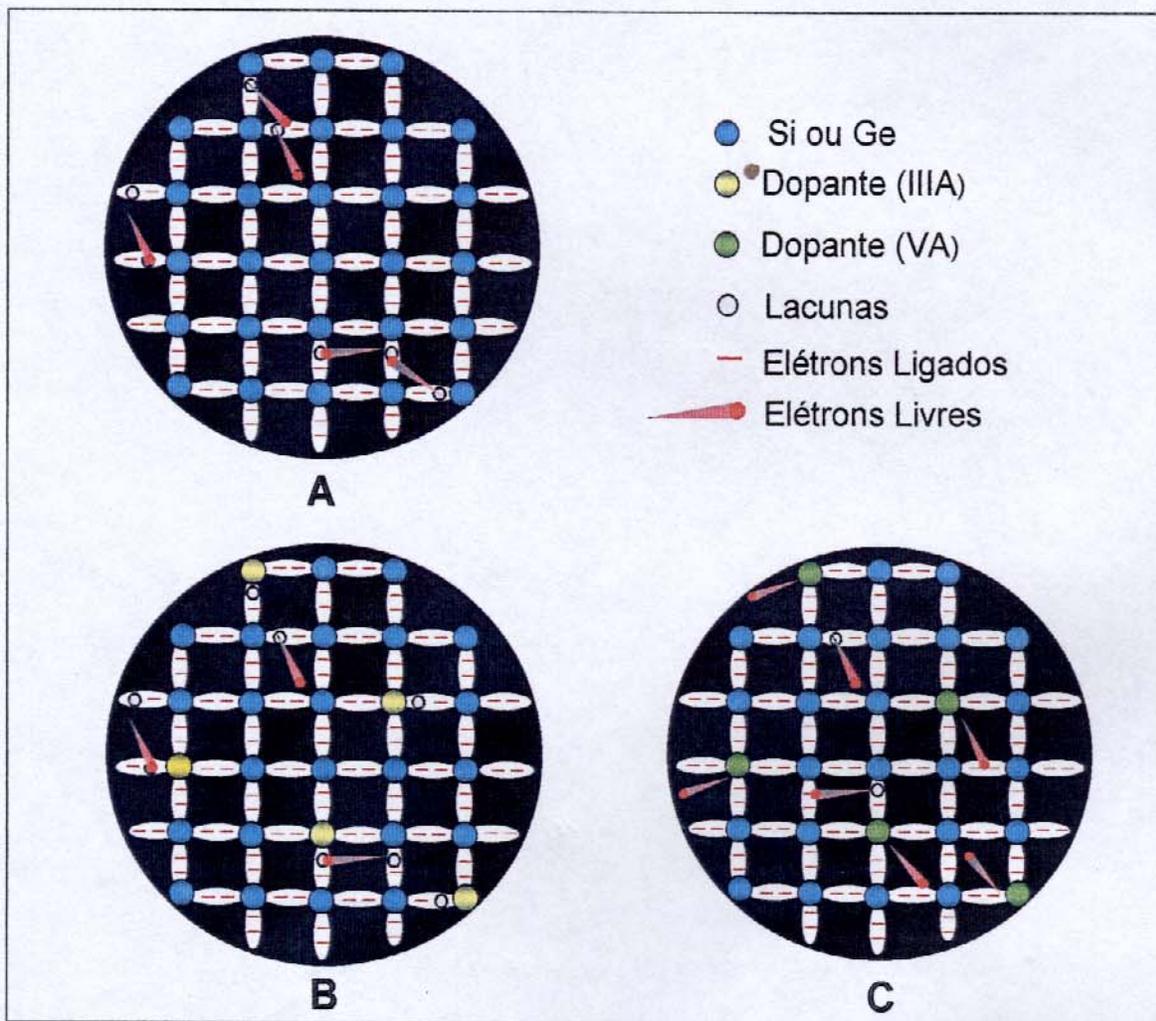


Figura 1: Redes cristalinas de materiais semicondutores: (A) Não dopado, (B) Dopado Tipo P e (C) Dopado Tipo N.

Na fabricação dos diodos, os semicondutores do tipo p e do tipo n são dispostos lado a lado conforme indicado na Figura 2. A interface entre os dois materiais é chamada de junção p-n.

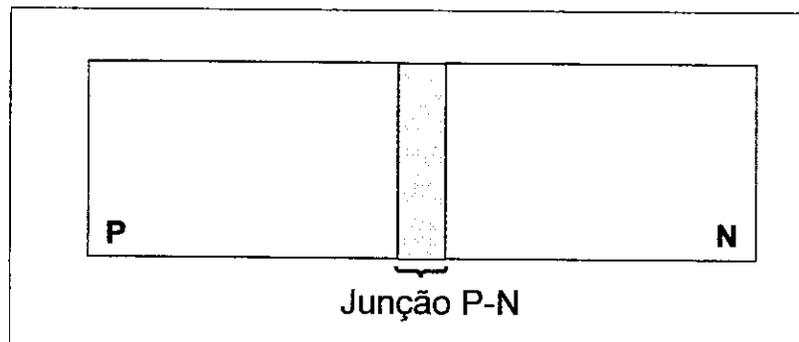


Figura 2: Disposição dos semicondutores do tipo p e do tipo n em um diodo.

Dois modos de operação podem ser utilizados com os diodos usuais, modos de polarização direta ou reversa. Na polarização direta, o material do tipo p é ligado ao terminal positivo de uma bateria e o material do tipo n conectado ao terminal negativo da mesma bateria. Na polarização reversa, estas conexões são invertidas. A polarização direta é o único modo de operação possível para os LEDs. Neste modo, os elétrons livres do material semicondutor do tipo n e as lacunas do material do tipo p movimentam-se em direção à junção P-N. Devido a maior mobilidade, os elétrons livres ultrapassam a junção e se recombinam com as lacunas do material tipo p. Essa recombinação pode ser acompanhada pela emissão de luz (eletroluminescência, Figura 3) ou calor, dependendo dos substratos e dopantes que foram utilizados na confecção dos dispositivos.

Em diodos de silício e germânio, a recombinação elétron/lacuna não é acompanhada pela emissão significativa de luz, sendo a maior parte da energia liberada na forma de calor, o que torna estes materiais impróprios para a confecção de LEDs. Entretanto, em diodos como o de arseneto de gálio (GaAs) ou o de fosfeto de gálio (GaP), o número de fótons emitidos é suficiente para que sejam utilizados como fonte de luz. Estes dois materiais são a base para a confecção de uma grande variedade de LEDs. Como mostrado na Tabela 1.

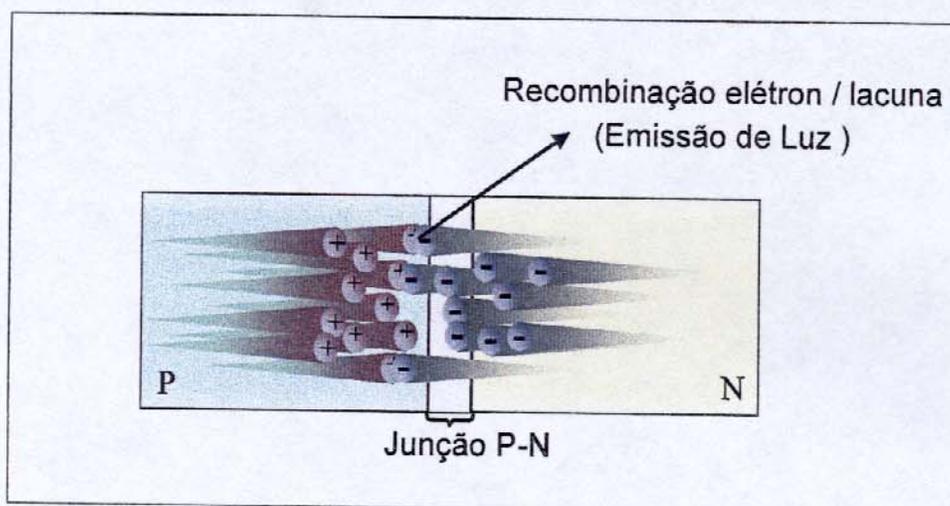


Figura 3: Fenômeno de eletroluminescência em diodos emissores de luz

O comprimento de onda da radiação emitida pelos LEDs é dependente não apenas do cristal semiconductor, mas também da espécie e quantidade de impureza adicionada ao mesmo. O LED fabricado a base de arseneto de gálio emite radiação na região do infravermelho próximo. Dopando-se com fósforo, a emissão pode ser vermelha ou amarela, de acordo com a concentração do dopante. O emissor que emprega fosfeto de gálio emite radiação na região do verde e com a introdução de quantidades de arsênio, a radiação pode se estender desde o verde até o vermelho. LEDs com picos de emissão na região do azul podem ser confeccionados com carbeto de silício e nitreto de gálio. Outros materiais também são utilizados na confecção destes dispositivos, como os mostrados na Tabela 1, a qual indica também os comprimentos de onda nos picos de emissão e as correntes máximas que podem ser aplicadas aos mesmos em polarização direta.

Tabela 1: Características de alguns LEDs disponíveis comercialmente [20]

Tipo do Dispositivo	Comprimento de onda no pico de emissão (nm)	Corrente Contínua Máxima (mA)
SiC	470	50
GaN	482, 435	30
GaP	555	50
GaP	560	50
GaP	565	30
GaP	570	50
GaAsP/GaP	580	50
GaAsP/GaP	583	20
GaAsP/GaP	585	20
AlInGaP	590	30
GaAsP/GaP	605	50
GaAsP/GaP	610	20
AlInGaP	630	30
GaAsP/GaP	635	30
AlGaAs/GaAs	645	30
AlGaAs	650	50
GaAsP	655	50
AlGaAs	660	50
GaP	700	30
AlGaAs	818	100
AlGaAs	840	75
AlGaAs	850	100
AlGaAs	880	100
GaAs	925	500
GaAs	940	100
GaAs	950	100
InGaAsP	1300	120

Os espectros de emissão da maioria dos LEDs com emissão na região do visível apresentam larguras de banda à meia altura que variam entre 10 e 40 nm [20], sendo comparáveis às larguras obtidas empregando-se fontes incandescentes combinadas com filtros ópticos (20-60 nm) [20, 24]. As intensidades de emissão para alguns destes emissores é também cerca de cinco vezes maior que as intensidades provenientes dos feixes de saída de monocromadores, o que permite ajustes de 100% de transmitância mesmo para soluções mais concentradas. Além disto, os sinais de emissão são bastante estáveis, permitindo obter desvios padrão, em medidas de absorbância, da ordem de 10^{-7} unidades [20]. Outras características positivas dos LEDs são o baixo

consumo de energia, que dispensam a construção de circuitos eletrônicos especiais para o controle da fonte, o tempo de vida útil que é tipicamente de 50.000 horas para uso contínuo, significativamente maior que aquele encontrado para fontes incandescentes (1000-2000 horas) e o tamanho extremamente reduzido, que possibilita construir fotômetros pequenos, ideais para análises em campo [20].

Recentemente, foram desenvolvidos LEDs bicolores, que emitem usualmente no verde e no vermelho, e tricolores, emitindo no verde, vermelho e azul [25-26]. Nestes dispositivos, os materiais semicondutores que proporcionam as emissões em diferentes comprimentos de onda são dispostos em um único corpo e podem ser acionados selecionando-se o par de terminais adequado para produzir a emissão desejada. Os LEDs multiemissores deram maior versatilidade aos fotômetros baseados nestes componentes, dispensando a troca física dos mesmos para a realização de leituras em mais de um comprimento de onda. Porém, a faixa de comprimento de onda, ainda limitada, torna necessária a escolha de um método fotométrico adequado no qual possa ser empregada luz azul, verde ou vermelha.

A radiação emitida por diodos emissores de luz não se limita apenas a região do espectro visível. LEDs que emitem na região do espectro ultravioleta, e do infravermelho próximo também estão disponíveis comercialmente e as aplicações analíticas nestas regiões já são estudadas [27-28].

1.2 - Fotômetros Baseados em Diodos Emissores de Luz

Devido às qualidades dos LEDs descritas anteriormente, muitos fotômetros baseados nestes dispositivos têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Nesta seção, alguns destes instrumentos e as suas respectivas aplicações são apresentadas.

Muitos dos fotômetros construídos foram desenvolvidos para aplicações em campo. Cantrell e colaboradores [30] desenvolveram um fotômetro portátil baseado em um arranjo de três LEDs (473, 590 e 624 nm) que dispõe de um microcontrolador programável e um chip de memória. O instrumento permite realizar medidas, em intervalos de tempo pré-determinados, durante dias, sem a necessidade de

acompanhamento do operador. A determinação de um indicador redox (tionina) foi empregada para avaliação do instrumento no monitoramento de processos redox. Lyddy-Meaney e colaboradores [18] empregaram um LED vermelho ultra brilhante (650 nm) na construção de um fotômetro que foi acoplado a um sistema de análise por injeção em fluxo compacto para o mapeamento da concentração de fosfato em águas marinhas. Hauser e colaboradores [28] empregaram um LED com emissão no infravermelho próximo para o monitoramento de níquel em meio amoniacal em processos industriais.

Fotômetros baseados em LEDs multiemissores foram desenvolvidos e aplicados a uma série de determinações. Um fotômetro com uma câmara de microreação foi construído por Gros [31] empregando-se um LED tricolor com máximos de emissão em 470, 565 e 660 nm. O instrumento foi avaliado na determinação de cálcio em águas a partir de medidas de absorvância do complexo metálico com *o*-cresolftaleína. Um diodo emissor de luz bicolor com máximos de emissão em 560 e 630 nm foi empregado na construção de um fotômetro de fluxo por Araújo e colaboradores [24]. A performance do instrumento foi avaliada na determinação de parâmetros clínicos, empregando-se diferentes métodos fotométricos. Em um trabalho desenvolvido por Rocha e Reis [32], um LED bicolor (verde / vermelho) foi empregado na construção de um fotômetro para a determinação de nitrogênio inorgânico em águas. Um fotômetro baseado em um LED bicolor (560 e 660 nm) foi construído por Pasquini e Raimundo Jr. [6] e aplicado a determinação de Cr(IV) com difenilcarbazida (DFC).

Liu e Dasgupta [33] desenvolveram um instrumento baseado em LEDs com emissões em 605 e 950 nm para uso em fotometria de duplo-comprimento de onda. O instrumento foi avaliado na compensação dos efeitos de índice de refração e turbidez das amostras em análises por injeção em fluxo. Dasgupta e colaboradores [11] construíram um instrumento multifuncional para análises em fluxo baseado em um arranjo de doze LEDs diferentes, os quais emitem radiação na faixa de 375 a 620 nm. O instrumento foi aplicado em diferentes determinações empregando medidas de absorvância, fluorescência e luminescência.

Um fotômetro baseado em quatro diferentes LEDs (vermelho, laranja, amarelo e infravermelho próximo) foi desenvolvido por Brook e colaboradores [35] e empregado para estender a faixa dinâmica de um sensor químico de fibras ópticas para medidas de umidade relativa por meio de calibração multivariada baseada em redes neurais artificiais.

A aplicação de fotômetros baseados em LEDs na determinação simultânea de metais também é descrita. Em dois trabalhos desenvolvidos por Trojanowics e colaboradores [36-37], um fotômetro comercial que permite medidas com três LEDs (563,580 e 638 nm) foi empregado na determinação simultânea de Zn e Al e de Zn, Al e Fe(III) empregando-se medidas de absorvância dos complexos metálicos com diferentes reagentes cromogênicos. Hauser e colaboradores [5, 38] descreveram a construção de um fotômetro baseado em um arranjo de sete LEDs (do azul ao infravermelho próximo). O instrumento foi aplicado à determinação simultânea de metais em misturas binárias, aplicando análise por regressão linear em dois comprimentos de onda, nos quais os complexos metálicos absorviam diferentemente.

1.3 - Análise Multicomponente Simultânea por Espectrofotometria de Absorção Molecular UV-Vis: Calibração Multivariada

A análise multicomponente por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis é usualmente realizada empregando-se reagentes cromogênicos específicos para cada componente ou efetuando-se separações dos elementos de interesse de seus interferentes. Contudo, nem sempre se dispõe de um reagente específico para cada espécie e as etapas de separação são normalmente trabalhosas e demoradas. Neste sentido, o desenvolvimento da análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis (AMS-EAM) tem eliminado as etapas de separação e um número cada vez maior de componentes tem sido determinado simultaneamente empregando-se um único reagente cromogênico [39].

O sucesso nas aplicações da AMS-EAM deve-se em grande parte ao surgimento da quimiometria, área da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos

para a análise de dados de natureza multivariada. Essa ferramenta permite, entre outras aplicações, construir modelos matemáticos que relacionam as múltiplas respostas de um instrumento às propriedades de uma amostra, as quais, no caso da AMS-EAM, são as concentrações dos analitos. O processo pelo qual esta relação matemática é encontrada é denominado calibração multivariada.

Os métodos lineares de calibração multivariada são divididos em dois grupos principais: métodos clássicos de mínimos quadrados (CLS) e métodos inversos de mínimos quadrados (ILS). Dentre estes grupos, os métodos ILS têm sido aplicados com maior frequência às determinações multicomponentes simultâneas, pois são utilizados sem a necessidade de se conhecer as concentrações de todas as espécies espectroscopicamente ativas nas amostras de calibração [40]. Os métodos ILS mais conhecidos são a regressão linear múltipla, a regressão em componentes principais e a regressão por mínimos quadrados parciais (MLR, PCR e PLS, respectivamente). Com a aplicação destes métodos, as concentrações dos analitos são, muitas vezes, determinadas por meio da AMS-EAM, mesmo na presença de interferentes.

1.3.1 - Regressão Linear Múltipla

Os modelos de calibração multivariada empregados neste trabalho foram construídos com base no método de regressão linear múltipla. Neste método, a concentração do analito (variável dependente, y) é descrita como uma função das medidas realizadas em n comprimentos de onda, conforme indicam as seguintes equações:

$$y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_nx_n \quad \text{(I)}$$

$$y = \sum_{i=1}^n b_i x_i + e \quad \text{(II)}$$

onde x_i são as respostas do instrumento para os vários comprimentos de onda (variáveis independentes), b_i são coeficientes de regressão do modelo (sensibilidades para cada comprimento de onda) e e é o erro ou resíduo.

Considerando a determinação da concentração y para mais de uma amostra, as equações acima podem ser escritas na seguinte forma matricial:

$$y = Xb + e \quad (III)$$

onde y é o vetor que contém as concentrações de um dado analito para as várias amostras, X é a matriz que contém as repostas instrumentais (absorbâncias), b é o vetor que contém os coeficientes do modelo e e é o vetor de erros. Na matriz X , cada linha representa uma amostra e contém as respostas medidas para a mesma. Cada coluna corresponde a um comprimento de onda e traz as absorbâncias de todas as amostras para esta variável.

Obtendo-se os espectros de soluções com concentrações conhecidas do analito (soluções de referência), a construção do modelo fica resumida à determinação do vetor b . A regressão por mínimos quadrados é a maneira mais usual para a resolução deste problema, levando à seguinte solução [41-42]:

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y \quad (IV)$$

a partir da equação anterior, sendo que o vetor b pode ser determinado se a inversão de $X^t X$ for possível. Para isto, o número de amostras (linhas de X) deve ser maior que o número de variáveis independentes (colunas de X).

Esta é uma das grandes limitações do método MLR para aplicações em AMS-EAM, onde o número de amostras de calibração é freqüentemente menor que o número de variáveis (centenas de comprimentos de onda), sendo necessária uma boa seleção de variáveis para a sua aplicação em conjunto com espectrofotômetros multicanais.

Além desta dificuldade, as variáveis selecionadas não devem estar correlacionadas (devem apresentar informação única) para que os modelos construídos não apresentem erros significativos.

Nesta discussão para o método MLR, apenas uma variável dependente foi determinada para várias amostras. Contudo, o método pode ser expandido para a determinação das concentrações de mais analitos, dispondo-se os vetores y , referentes a cada componente químico, lado a lado em uma matriz Y e fazendo o mesmo para os demais vetores (b e e) de modo que a relação encontrada na equação (III) tomará a seguinte forma:

$$Y = XB + E \quad (V)$$

1.3.2 - Validação do Modelo de Calibração

Antes que o modelo construído seja aplicado para a previsão das concentrações nas amostras de interesse, o mesmo deve ser validado com o objetivo de testar a sua capacidade preditiva.

A validação externa, mais indicada para este procedimento, consiste em empregar o modelo na previsão das concentrações dos analitos em amostras que não foram empregadas na calibração e das quais são conhecidas exatamente as concentrações. As diferenças entre as concentrações previstas pelo modelo (c) e as concentrações de referência (c') são determinadas e o erro médio quadrático de previsão (RMSEP) é calculado a partir destes valores de acordo com a seguinte equação:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - c'_i)^2}{n}} \quad (VI)$$

onde n é o número de amostras do conjunto de validação. Por ser um erro médio e se assemelhar ao desvio padrão, o RMSEP é um dos parâmetros observados com maior frequência na validação de modelos de calibração.

Quando não se dispõe de amostras para a realização da validação externa, o mesmo conjunto de amostras pode ser empregado para a calibração e a validação do modelo, a partir da chamada validação cruzada [41]. Neste método, os dados referentes a algumas amostras são retirados do conjunto de calibração e o modelo é construído com os dados remanescentes. Então, os valores de concentração para as amostras que foram separadas são previstos e os resíduos (diferenças entre c e c') são computados. O processo é repetido para outros subconjuntos de amostras até que todas as amostras, selecionadas para a validação, sejam testadas e que os respectivos resíduos sejam determinados para os cálculos da variância residual e do RMSEP [40-41].

1.4 - Reconhecimento de Padrões

Os métodos quimiométricos têm sido empregados na caracterização e classificação de uma grande variedade de amostras. A discriminação de solos [43-44], tintas de caneta [45], e águas [46-47] são alguns dos exemplos de aplicação desses métodos de enorme interesse em áreas como arqueologia, medicina e ciência forense. O reconhecimento de padrões, como é geralmente conhecido, pode ser baseado em medidas de propriedades físico-químicas, tais como pH, densidade e concentrações de constituintes, ou apenas nos espectros adequados das amostras, o que irá depender da amostra e das características que deverão ser consideradas na discriminação

O objetivo do reconhecimento de padrões em Química Analítica é encontrar similaridades e diferenças entre várias amostras, a partir de um conjunto de propriedades previamente medidas. Com este tipo de análise é possível aumentar o entendimento sobre um conjunto de dados através do agrupamento natural das amostras (reconhecimento de padrão não supervisionado) ou mesmo construir modelos

que permitam classificar novas amostras (reconhecimento de padrão supervisionado) [41].

Quando o número de parâmetros medidos para cada amostra (variáveis) é reduzido (no máximo três) e estes parâmetros possuem informação com forte caráter discriminatório, as similaridades e diferenças podem ser facilmente observadas plotando-se as amostras (pontos) num espaço com até três dimensões, onde as coordenadas são dadas pelas variáveis medidas. Contudo, quando o número de variáveis é superior a três, esta discriminação não é tão facilmente observada, uma vez que se trata de um espaço com mais de três dimensões e, portanto, inimaginável por nós humanos. “Infelizmente”, a maioria das análises discriminatórias é realizada a partir de um grande número de variáveis colhidas para um grande número de amostras. Estudos baseados em medidas espectroscópicas podem gerar, por exemplo, uma matriz que contém 30 linhas (amostras) e 700 colunas (variáveis, comprimentos de onda), sendo necessário um espaço com 700 dimensões para descrever a distribuição das 30 amostras, segundo o método sugerido anteriormente.

Para contornar este problema, alguns métodos quimiométricos podem ser aplicados ao conjunto de dados, permitindo ao analista observar as similaridades em um espaço com no máximo três dimensões. Dois destes métodos foram empregados no presente trabalho e serão brevemente discutidos a seguir.

1.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é um método de projeção matemático que ajuda a visualizar toda a informação contida em um conjunto de dados complexo. Com ele, um novo sistema de eixos é construído por meio de combinações lineares das variáveis originais, para representar as amostras de tal maneira que a natureza multivariada dos dados possa ser visualizada em poucas dimensões. Estes novos eixos (conhecidos como componentes principais, variáveis latentes, fatores ou ainda autovetores) são ortogonais entre si e obtidos em ordem decrescente de explicação da variância dos dados, ou seja, a primeira componente principal (PC1)

explica a maior parte da variância encontrada nos dados, a PC2 explica a maior parte da variância remanescente e assim por diante. A Figura 4 exemplifica esta operação, mostrando a dispersão das amostras no antigo sistema de coordenadas, onde as variáveis originais (V_1 e V_2) são os eixos, e no novo sistema, onde os eixos são as PCs.

As coordenadas das amostras neste novo sistema de eixos é chamada de scores e os coeficientes da combinação linear das variáveis antigas (a parcela de contribuição de cada variável original para a construção de uma dada PC) são conhecidos por loadings, os quais são a base para a interpretação qualitativa das PCs. Para uma melhor compreensão sobre como são obtidos estes novos eixos e sobre a análise de componentes principais de uma maneira geral, o leitor deve consultar a literatura especializada em quimiometria [42, 48].

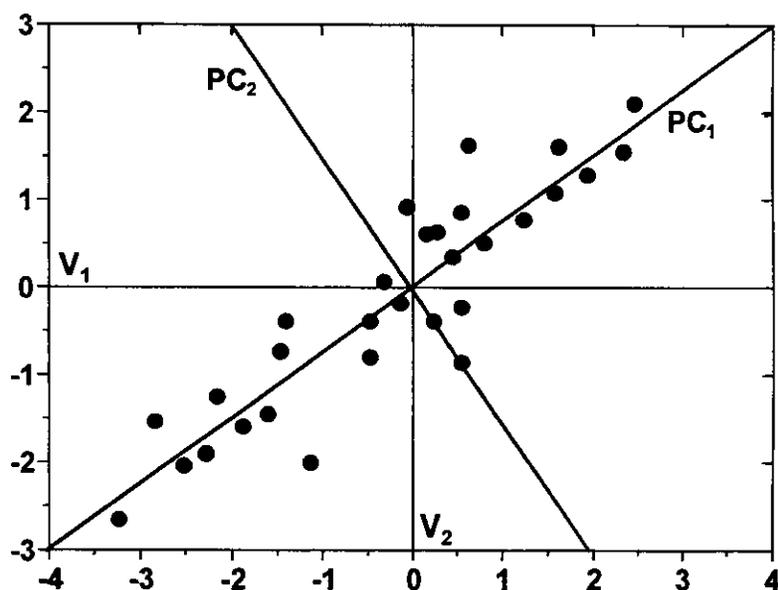


Figura 4: Distribuição das amostras ao longo das componentes principais e das variáveis originais (os pontos representam as amostras)

1.4.2 Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)

A análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) é um método estatístico de reconhecimento de padrões que emprega a distância entre as amostras como forma de classificá-las em grupos distintos. Esta informação é representada por um gráfico bidimensional chamado dendograma que permite o reconhecimento.

Os dendogramas podem ser construídos de diversas maneiras [41]; na mais usual são agrupadas inicialmente as amostras que apresentam valores semelhantes para as variáveis medidas (isto é, são agrupadas as amostras que estão mais próximas em um espaço onde as coordenadas são dadas pelas variáveis). Em seguida, os grupos formados são também agrupados de acordo com a menor distância entre eles. O processo é repetido até que haja um único grupo remanescente.

Nos dendogramas, as amostras e as distâncias são representadas pela ordenada e abscissa do gráfico, respectivamente (Figura 5). Os segmentos horizontais representam as amostras ou grupo de amostras que são unidos a outros elementos por meio de segmentos verticais, os quais indicam as distâncias entre eles. A visualização dos agrupamentos é feita traçando-se uma linha vertical imaginária em uma dada distância e seguindo-se os ramos que foram cruzados por esta linha. Assim, na distância 8 da Figura 5 (linha pontilhada) são observados três grupos de amostras: Um grupo formado pelas amostras A e B, outro pelas amostras D e E e um grupo formado apenas pela amostra C.

Em muitos casos a escala de distância dos dendogramas é substituída pela escala de similaridade (S), a qual é calculada a partir da equação abaixo

$$S_{ab} = 1 - \left(\frac{d_{ab}}{d_{\max}} \right) \quad \text{(VII)}$$

onde d_{ab} é a distância medida entre duas amostras hipotéticas a e b e d_{\max} é a distância máxima encontrada entre as amostras em questão. A similaridade, como o próprio nome diz, indica se há similaridades entre as amostras, atribuindo valores entre 0 e 1

para os diferentes agrupamentos. Se a similaridade se aproxima de zero, as amostras são bastante diferentes, se a similaridade se aproxima de 1 as amostras são mais semelhantes.

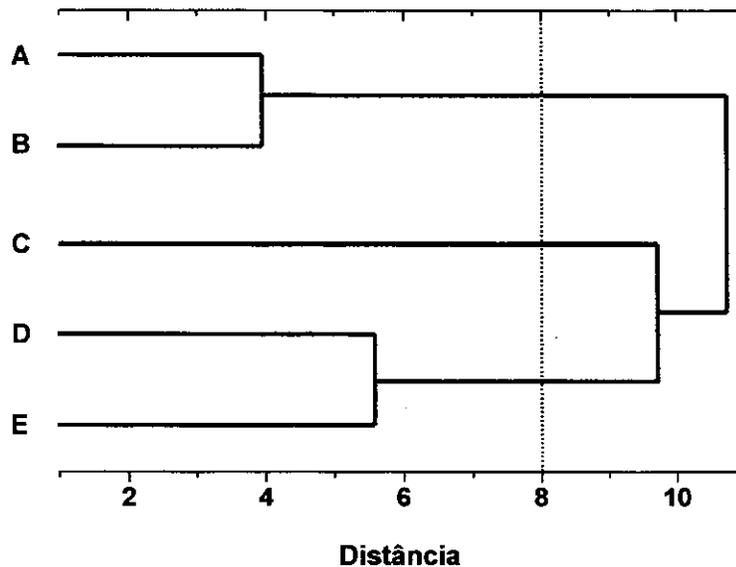


Figura 5: Exemplo de um dendrograma

Variações de HCA usam diferentes medidas de distância e diferentes modos de conexão entre as amostras [41]. A distância euclidiana, mais comum nestas análises, foi empregada neste trabalho e é calculada segundo a fórmula abaixo:

$$D_{AB} = \sqrt{\sum_{j=1}^m (x_{Aj} - x_{Bj})^2} \quad (\text{VIII})$$

onde D_{AB} é a distância euclidiana entre duas amostras A e B , m é o número total de variáveis medidas e x é o valor medido para a variável. A conexão completa [41] foi o modo de conexão empregado na única análise de agrupamentos hierárquicos realizada neste trabalho. Com ela, dois grupos de amostras que foram inicialmente construídos a partir das menores distâncias entre seus objetos (amostras) são unidos (agrupados) através da maior distância entre objetos destes dois grupos.

II – Objetivo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um fotômetro multicanal baseado em um arranjo de diodos emissores de luz capaz de realizar medidas em oito comprimentos de onda do espectro visível. O instrumento foi avaliado na determinação simultânea de metais em água, empregando-se regressão linear múltipla (MLR) como método de calibração multivariada e na discriminação de águas minerais a partir de análise de componentes principais (PCA).

III - Parte Experimental

III.1 - Construção do Fotômetro

O fotômetro foi construído com base em dois circuitos eletrônicos, um circuito para acionamento dos LEDs e outro para a amplificação do sinal proveniente de um transdutor (fotodiodo). Ambos os circuitos são ilustrados na Figura 6.

III.1.1 - Circuito para Acionamento dos LEDs

O circuito desenvolvido para o acionamento dos LEDs permite empregar um arranjo com até 14 diodos. Neste circuito, Figura 6-A, os transistores (T) atuam como chaves que podem ser abertas ou fechadas a partir de sinais enviados, via microcomputador, às suas respectivas bases [22]. Quando uma chave é fechada, a polarização direta do LED é obtida e o mesmo passa a emitir luz monocromática até que a chave seja aberta novamente. Resistores de $150\ \Omega$ e resistores variáveis com resistência máxima de $1\ \text{k}\Omega$ foram empregados para determinar a corrente através dos LEDs. Com os resistores variáveis é possível ajustar as intensidades de emissão dos diodos de acordo com a sensibilidade do detector (fotodiodo RS 308-067), o que permite obter um nível comum de sinal para a emissão de todos os LEDs. Resistores de $10\ \text{k}\Omega$ foram empregados para limitar a corrente que chega a base dos transistores.

III.1.2 - Circuito para Amplificação do Sinal

Um circuito para amplificação do sinal, baseado na realimentação negativa de um amplificador operacional (OP-07), foi construído e o sinal de saída do fotodiodo (transdutor) foi conectado a este circuito, conforme é apresentado na Figura 6-B. Com esta configuração, o ganho na amplificação do sinal pode ser controlado ajustando-se a resistência de um resistor variável com resistência máxima de $100\ \text{k}\Omega$ (R_{V1}), uma vez

que a tensão de saída do amplificador operacional (V_{out}) tem relação direta com esta resistência, equação IX [49].

$$V_{out} = V_{in} \times \left(\frac{RV_1 + R_2}{R_1} \right) \quad (IX)$$

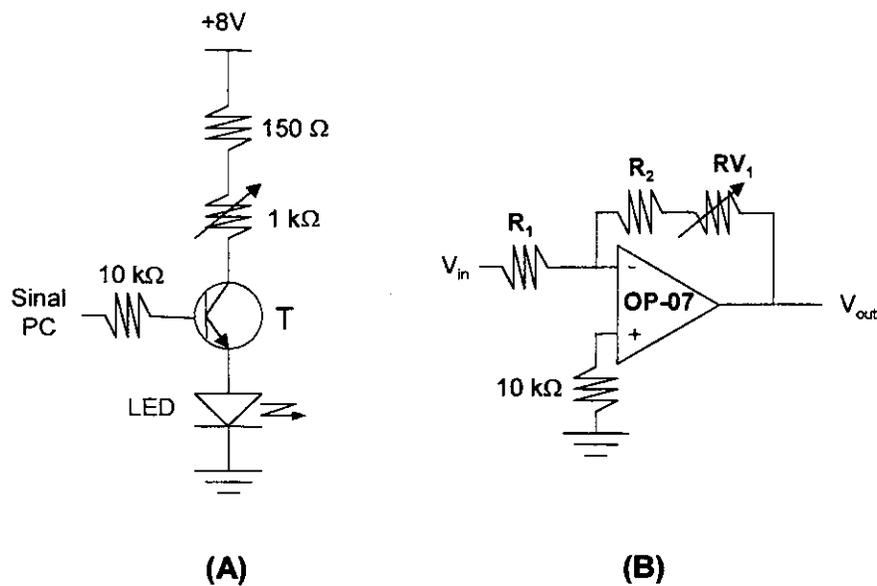


Figura 6: Circuitos eletrônicos do Fotômetro: Acionamento dos LEDs (A) e amplificação do sinal (B), T = Transistor, $R_1 = R_2 = 10 \text{ k}\Omega$, $RV_1 = 100 \text{ k}\Omega$.

III.1.3 – Arranjo de LEDs e captação da radiação

Oito LEDs que emitem radiação em faixas distintas do espectro visível foram adquiridos junto à RS Components [50], com o intuito de cobrir boa parte da extensão deste espectro. Os comprimentos de onda nos máximos de emissão, indicados pelo fabricante, vão desde 470 nm (azul) até 654 nm (vermelho) passando por 500 nm (azul esverdeado), 525 nm (verde), 562 nm (verde), 590 nm (amarelo), 612 nm (laranja), 636

nm (vermelho) e 654 nm (vermelho). Todos os LEDs adquiridos apresentavam corpos plásticos cilíndricos, transparentes e incolores com 5 mm de diâmetro, que foram lixados e polidos até as proximidades do chip semiconductor, para minimizar possíveis perdas de radiação. Cada LED foi fixado em um conector metálico (RS 655-010) e todo o arranjo foi montado em uma placa de acrílico devidamente trabalhada. Feixes com quatro fibras ópticas poliméricas de 250 μm de diâmetro cada (Toray Europe, Londres) foram fixados e conectados a cada LED, por meio de conectores para fibras ópticas (RS 655-004), para guiar as radiações individuais dos emissores, conforme é apresentado na Figura 7. Estes feixes foram agrupados em um único feixe de saída contendo 32 fibras, que foi conectado diretamente à uma cela de fluxo com caminho óptico de 10 mm empregando-se um suporte para a cela. Outro feixe contendo trinta e duas fibras foi empregado para guiar a radiação da cela até o detector. A Figura 8 mostra as conexões do fotômetro com a cela de medida empregando os cabos de fibras ópticas, os quais foram encaixados por pressão ao suporte.

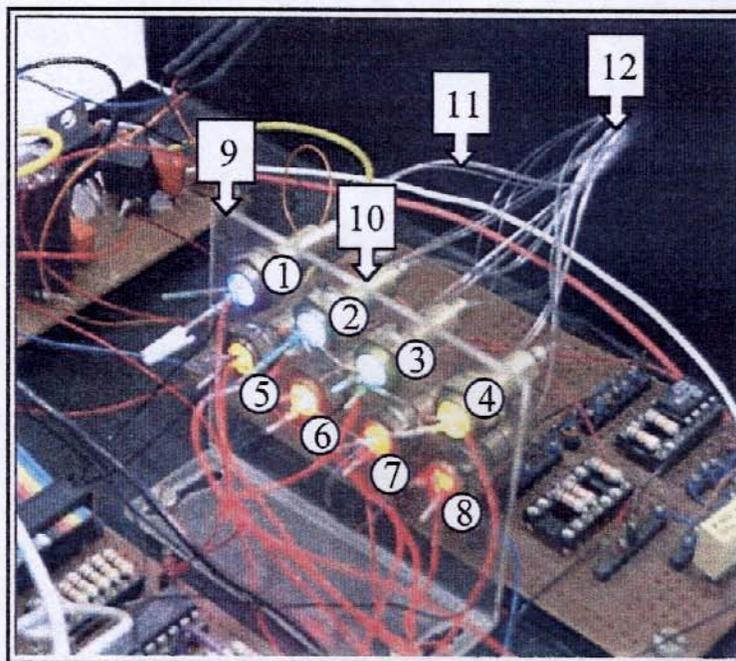


Figura 7: Disposição dos LEDs e dos Feixes de Fibras Ópticas: 1 - LED 470 nm, 2 - LED 500 nm, 3 - LED 525 nm, 4 - LED 562 nm, 5 - LED 590 nm, 6 - LED 612 nm, 7 - LED 636 nm, 8 - LED 654 nm 9 - Placa de Acrílico, 10 - Conectores Metálicos, 11 - Feixe com 4 fibras ópticas de 250 μm , 12 - Feixe único de saída com 32 fibras.

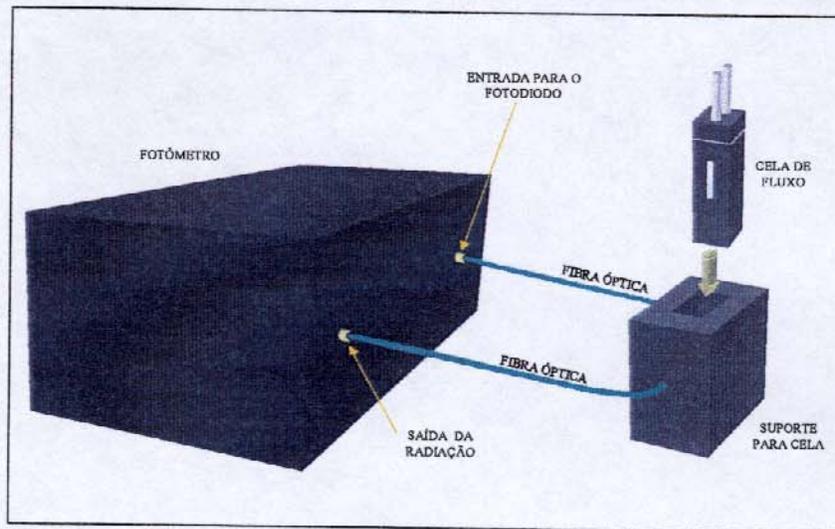


Figura 8: Acoplamento do fotômetro com uma célula de fluxo.

III.1.4 - Fonte de Alimentação

Uma fonte simétrica com tensões de saída de +8V e -8V em corrente contínua foi construída para a alimentação dos circuitos de acionamento dos LEDs e de amplificação do sinal. O circuito empregado para a construção desta fonte é ilustrado na Figura 9.

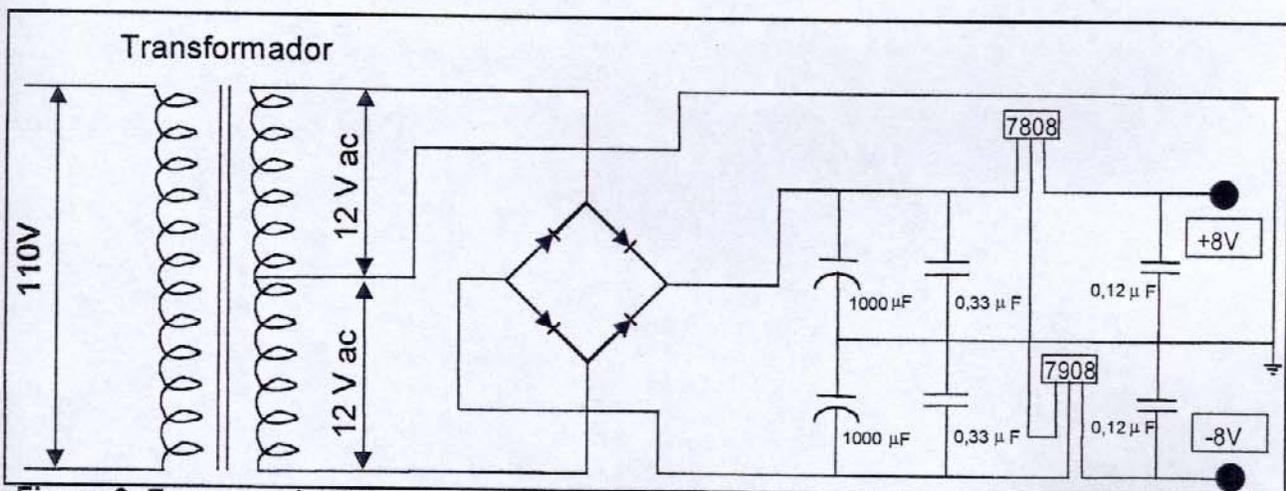


Figura 9: Esquema eletrônico da fonte simétrica empregada para alimentação dos circuitos.

III.1.5 - Controle e aquisição de Dados

Um programa foi escrito em VisualBasic 3.0 para controlar o fotômetro e adquirir os dados do fotodetector através de uma interface eletrônica, PCL-711S (Advantech Co.), a qual dispõe de um conversor analógico/digital (A/D) de 12bits.

O programa apresenta duas opções para acionamento dos LEDs e leitura dos sinais, chamados modos contínuo e múltiplo seqüencial. No modo contínuo, apenas um LED do arranjo pode ser selecionado, o LED permanece aceso enquanto são realizadas leituras do A/D em intervalos de tempo pré-definidos pelo operador. No modo múltiplo seqüencial, modo mais empregado nos estudos realizados neste trabalho, pode-se selecionar um ou mais LEDs do arranjo e o acionamento dos diodos e leitura do A/D são realizadas de maneira seqüencial, partindo-se do LED com menor comprimento de onda até o LED com maior comprimento de onda. Para ambos os modos de leitura, o operador deve definir previamente a faixa dinâmica adequada do conversor A/D ($\pm 0,3125$; $\pm 0,625$; $\pm 1,25$; $\pm 2,5$ ou ± 5 V), o filtro para as leituras (número de leituras a partir do qual é obtida a média aritmética do sinal) e os parâmetros de escala do gráfico. A interface do programa na qual o operador define estes e outros parâmetros é apresentada na Figura 10.

O algoritmo empregado para a realização de medidas em modo múltiplo seqüencial em um sistema de análise por injeção em fluxo é apresentado na Figura 11. Neste algoritmo, o operador deve definir previamente quais LEDs serão acionados, o tempo, em segundos, para que a amostra atinja a cela de detecção (tempo 1), o intervalo de tempo, também em segundos, que deve haver entre cada ciclo de medidas (tempo 2) e o número de ciclos de leituras que serão realizados para cada injeção de amostra (NC). Definidos estes parâmetros, a amostra é injetada, aguarda-se o tempo 1 e, em seguida, inicia-se o primeiro ciclo de leituras. Através de um contador, os LEDs previamente selecionados são acionados seqüencialmente. Para isso, os emissores foram indexados em ordem numérica (i.e. LED1 = LED com emissão em 470 nm, LED2 = LED com emissão em 500 nm, etc) por meio de um número N, ao qual soma-se uma unidade até se atingir $N = 8$ (número total de LEDs). A cada ciclo de leituras, outro

contador verifica se o número de ciclos realizados (NR) é igual a NC; se isto for verdade, um gráfico com as medidas realizadas é apresentado na tela e uma nova injeção é aguardada.

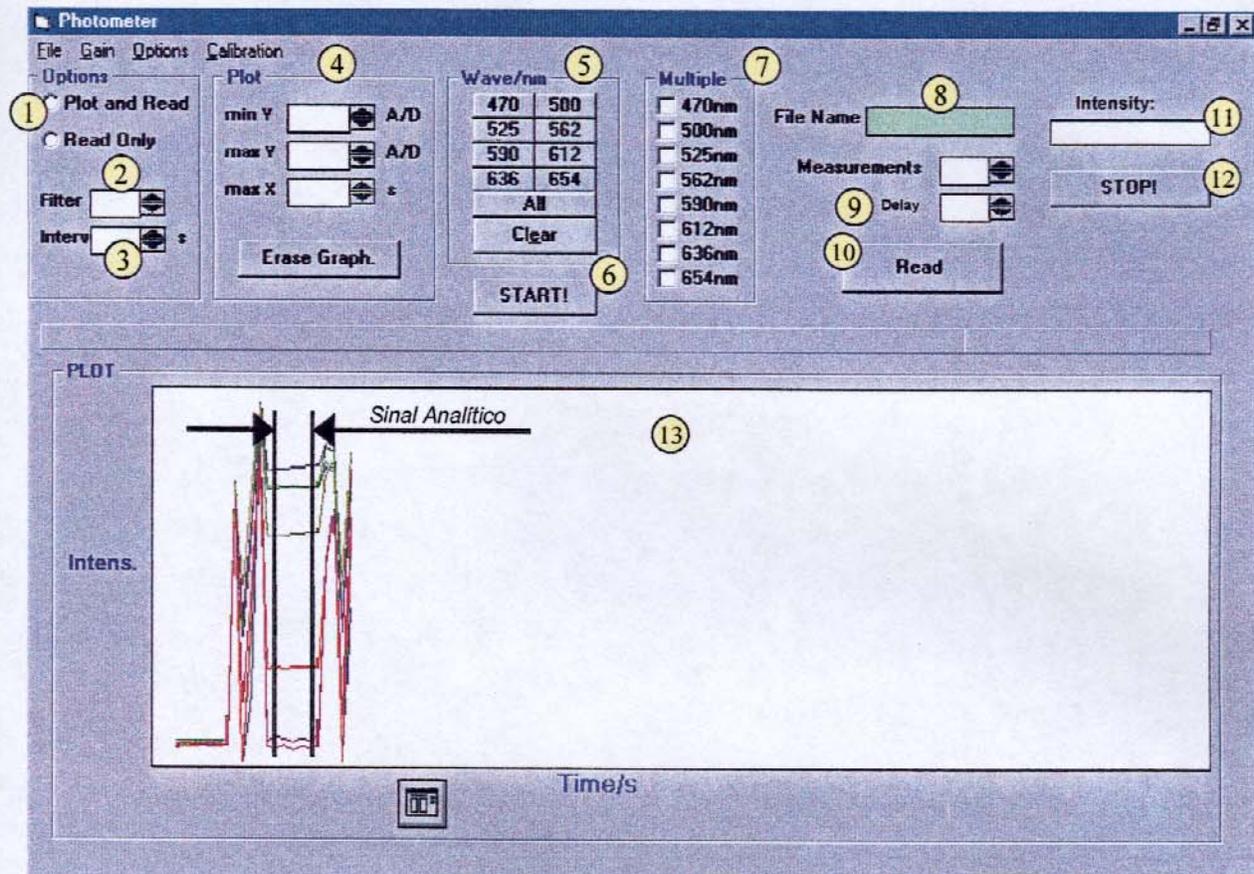


Figura 10: Interface ao usuário para o programa de controle do fotômetro: **Menu Gain:** Define faixa dinâmica do conversor A/D, **Menu Options:** Seleciona o modo de leitura (Contínuo ou Múltiplo seqüencial), **Menu Calibration:** Permite visualizar o número de ciclos realizados por segundo pelo computador; **1-** Opção para leitura (com ou sem acompanhamento gráfico), **2-** Define o número de medidas do A/D que são empregadas para o cálculo da intensidade do sinal, **3-** Define intervalo de tempo entre as medidas, **4-** Define escalas do gráfico, **5-** Aciona os LEDs (apenas para modo contínuo), **6-** Inicia leitura em modo contínuo, **7-** Seleciona os LEDs para leitura seqüencial, **8-** Nome do arquivo (apenas para leituras em modo múltiplo), **9-** Define NC (número de varreduras do arranjo) e Tempo1 (apenas para modo múltiplo) **10-** Inicia leitura para modo múltiplo, **11-** Display do sinal, **12-** Cessa as leituras, **13-** Área gráfica, indicando n detalhe o sinal analítico para medidas em um sistema de análise em fluxo monossegmentado.

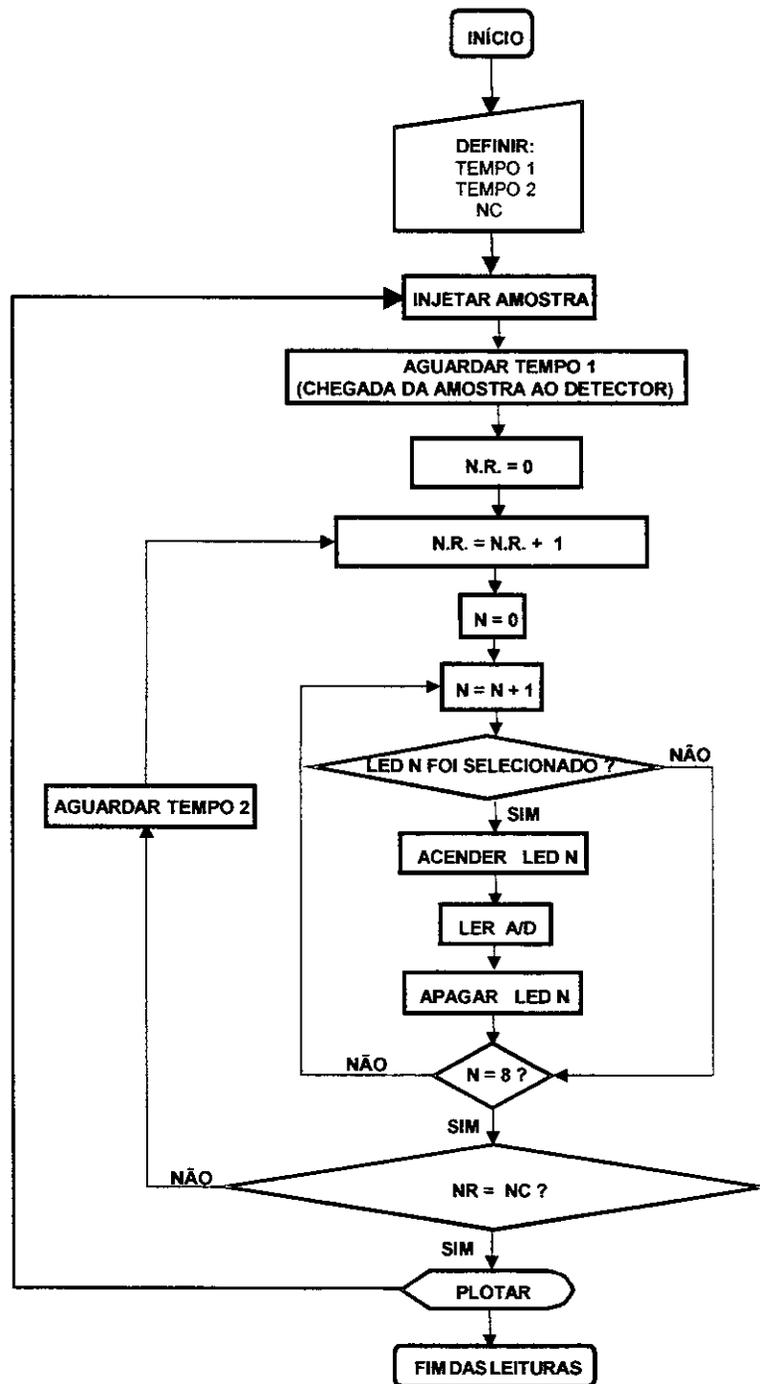


Figura 11: Algoritmo desenvolvido para leituras em modo múltiplo seqüencial em um sistema MSFA. **Tempo 1:** intervalo de tempo para a amostra leva chegar ao detector, **Tempo 2:** intervalo entre ciclos de leituras, **NC:** Número de varreduras (pré-definido pelo operador), **NR:** Número de varreduras realizadas.

Com a vazão empregada para os estudos (2,0 mL min⁻¹), é possível realizar um mínimo de seis medidas para cada emissor durante a passagem do monossegmento através da cela de fluxo. Os dados gerados são armazenados no formato ASCII e empregados posteriormente no cálculo das absorvâncias, a partir da seguinte equação,

$$A = -\log\left(\frac{S_A - S_E}{S_B - S_E}\right) \quad (X)$$

onde S_A é a média dos sinais referentes às seis medidas, S_E é o sinal obtido com os LEDs desligados (medida no escuro) e S_B é a média do sinal para o branco.

III.2 – Padronização dos Sinais de Emissão

Os LEDs empregados na construção do fotômetro não apresentam as mesmas intensidades de emissão em uma dada corrente. Além disso, a sensibilidade do fotodiodo não é uniforme para toda região na qual os LEDs emitem radiação. Para minimizar a dependência entre as intensidades de emissão dos LEDs e a sensibilidade do detector, os sinais de emissão dos diodos foram padronizados em um nível comum. Para isto, foram realizadas medidas individuais com cada emissor em uma cela de fluxo com caminho óptico de 10mm preenchida com água desionizada. Durante estas medidas, o resistor variável que controla a corrente através do dispositivo (Figura 6-A) foi ajustado até que o nível de sinal desejado fosse alcançado.

III.3 - Instrumentação

Um pHmetro Corning 443i foi utilizado para a verificação do pH das soluções tampão. Um espectrofotômetro UV-Vis HP-8453 foi empregado para a obtenção dos espectros de emissão dos LEDs e para a obtenção dos espectros de absorção dos

complexos metálicos e das soluções do indicador azul de bromotimol. Um espectrofotômetro com arranjo de fotodiodos, construído no laboratório, foi empregado para avaliação dos perfis das intensidades de luz dos LEDs logo após o acionamento dos mesmos.

Determinações empregando-se espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) foram realizadas com um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 5100.

III.4 – Reagentes e Soluções

Reagentes de grau analítico e água desionizada foram utilizados na preparação de todas as soluções. Soluções de referência dos íons metálicos foram preparadas pela diluição apropriada de soluções estoque padrão para absorção atômica (Tec Lab) com concentrações de 1000 mg L^{-1} . Todas as soluções de ácido nítrico foram preparadas diluindo-se volumes apropriados de uma solução estoque com título de 65% (Synth).

Uma solução tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 5,7) foi preparada empregando-se ácido acético glacial (Synth) e acetato de sódio (Merck). Uma solução tampão amônio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 10) foi preparada a partir de solução de amônia concentrada (Synth) e cloreto de amônio (Merck).

III.4.1 – Soluções de Referência

Para a construção das curvas analíticas empregadas na avaliação do fotômetro, foram preparadas soluções de Zn(II) e de 3-3 dibromofenol-sulfoftaleína (azul de bromotimol, ABT) de $1,0$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$. As soluções do íon metálico foram preparadas diluindo-se volumes apropriados da solução estoque em HNO_3 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. As soluções de ABT foram preparadas pela diluição de alíquotas adequadas de uma solução concentrada do indicador em tampão amônio pH 10 com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Soluções de referência contendo alaranjado de xilenol $0,13 \text{ mmol L}^{-1}$ e Zn (II) ($1,0$ a $5,0 \text{ mg L}^{-1}$) em meio ácido (tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,7) foram preparadas para a construção de curvas analíticas a partir de medidas com um espectrofotômetro *diode array*. A solução para a medida do branco foi preparada com as mesmas concentrações de reagente e de tampão na ausência do metal.

Soluções de referência de Zn(II) ($0,2 - 1,0 \text{ mg L}^{-1}$) e de Cu(II) ($1,0 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas a partir da diluição de alíquotas das respectivas soluções estoque em HNO_3 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para a construção de curvas analíticas por espectrometria de absorção atômica.

III.4.2 – Misturas Binárias

Para a construção dos modelos de calibração multivariada, soluções de misturas binárias Zn(II) / Cu(II) e Zn(II) / Ni(II), com as concentrações indicadas na Figura 12, foram preparadas em duplicata, diluindo-se volumes apropriados das soluções estoque em HNO_3 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

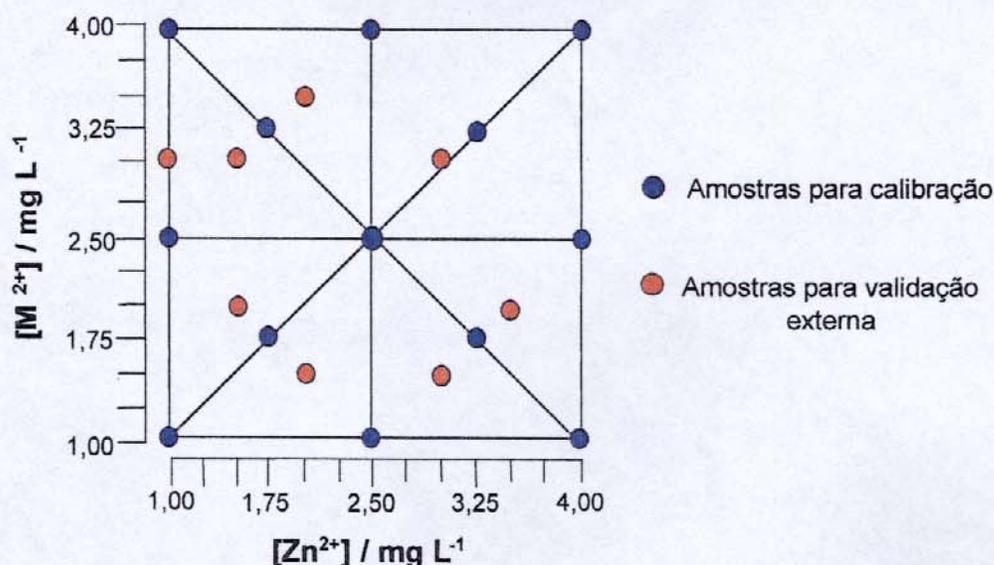


Figura 12: Distribuição das amostras empregadas para a calibração e validação do modelo quimiométrico. $[M^{2+}]$ indica a concentração de Cu(II) ou Ni(II).

III.4.3 – Reagentes Cromogênicos

Uma solução de 3,3'-bis-[N,N-di(carboximetil)aminometil]-o-cresolsufonoftaleína (alaranjado de xilenol, XO) $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se o sal tetrasódico (Fluka) em tampão acetato $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,7) para uso nos estudos de avaliação do instrumento e de calibração multivariada com misturas binárias.

Soluções de três reagentes cromogênicos foram preparadas e empregadas no estudo de classificação de águas minerais. Soluções de 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR, Sigma-Aldrich) e de negro de eriocromo T (EBT, Ecibra), ambas com concentrações de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, foram preparadas dissolvendo-se os respectivos sais comerciais em água desionizada. Solução de purpurato de amônio (murexida) $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se o sal em solução etanólica 10% (v/v). Todas as soluções de reagentes cromogênicos foram preparadas no mesmo dia em que foram utilizadas.

III.4.4 - Preparo das Amostras

Duas amostras de latão foram preparadas em duplicata, dissolvendo-se porções de aproximadamente 500 mg de limalhas em HNO_3 50% (v/v) a quente. Após a evaporação do ácido, as soluções resultantes foram diluídas até 250,0 mL com HNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A partir destas soluções foram preparadas as soluções para as análises com o instrumento desenvolvido e por espectrometria de absorção atômica.

Todos os medicamentos empregados nos estudos são comercializados na forma de soluções aquosas em ampolas e, de acordo com as bulas, não apresentam interferentes potenciais. Com isso, alíquotas apropriadas de duas ampolas de Zn-Cu Oligosol (Labcatal[®]), duas ampolas de PED-element (Darrow[®]) e uma ampola de AD-element (Darrow[®]) foram diluídas em HNO_3 $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e analisadas diretamente.

As amostras de águas minerais comerciais e demais águas empregadas no estudo de classificação também não sofreram pré-tratamento.

III.5 – Sistemas de Análises

As medidas de absorvância empregadas na avaliação do instrumento e na determinação simultânea de metais em água foram realizadas em um sistema de análise em fluxo monossegmentado [51]. Neste sistema, Figura 13, uma bomba peristáltica (P) aspira a solução da amostra (S1) até o injetor proporcional (I), onde preenche uma alça de amostragem de 50,0 μL (L5) no mesmo instante em que a solução do reagente cromogênico (alaranjado de xilenol tamponado em $\text{pH} = 5,7$, S2) preenche as alças L3 e L4 de 40,0 μL cada. As alças L2 e L1 são preenchidas com ar.

Com o deslocamento do bloco central do injetor proporcional no sentido indicado na figura, forma-se um monossegmento contendo a amostra e o reagente cromogênico entre duas bolhas de Ar. Este monossegmento é carregado por água desionizada (C) até uma bobina de reação (B) de 50 cm, a uma vazão de 2 mL min^{-1} e, em seguida, conduzido à uma cela de fluxo de vidro com caminho óptico de 10 mm (D), onde são realizadas as medidas fotométricas. Todos os resíduos gerados são descartados em W.

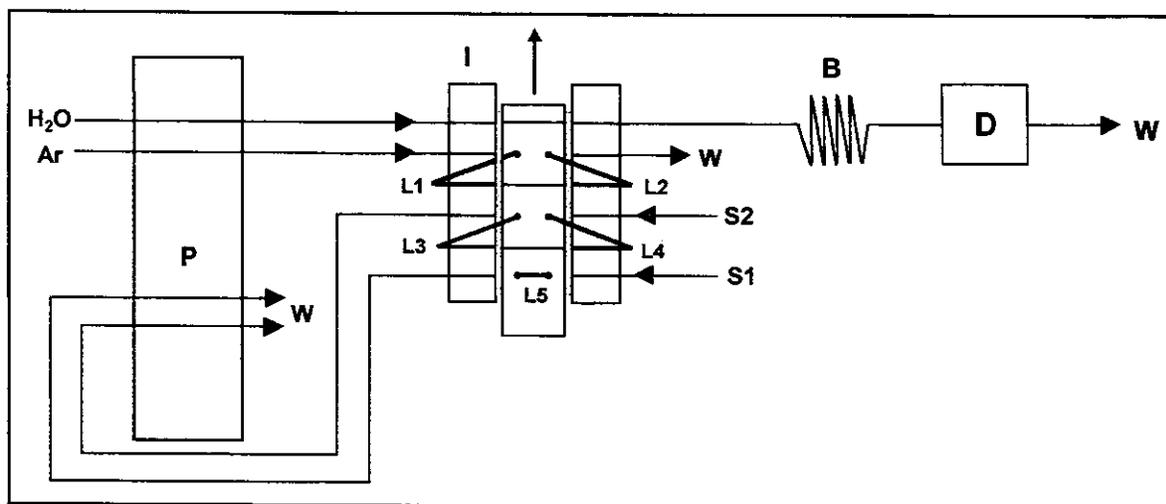


Figura 13: Sistema MSFA empregado para a avaliação do fotômetro e para a determinação simultânea de metais: P - bomba peristáltica, S1- Reagente Cromogênico (alaranjado de xilenol em tampão $\text{pH} = 5,7$), S2- soluções de amostras ou padrões, I - Injetor Proporcional, W – Descarte, L1 e L2 Alças de 40 μL preenchidas com ar, L3 e L4 – Alças de 40 μL preenchida com solução de alaranjado de xilenol em $\text{pH} = 5,7$, L5 - Alça de 50 μL preenchida com soluções de amostra ou padrões, B- Bobina de reação de 50 cm, D - Detector

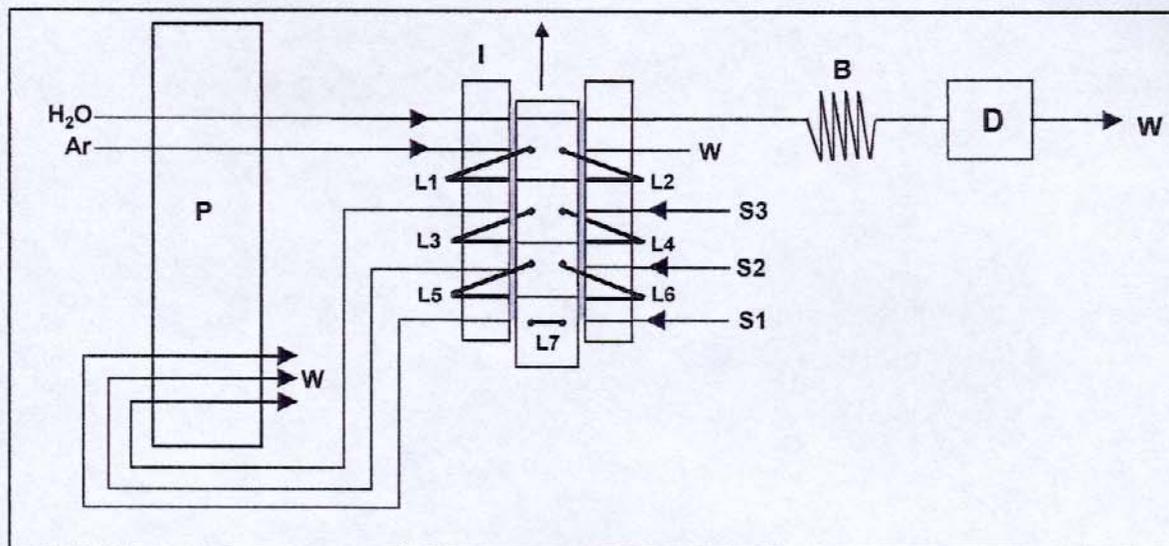


Figura 14: Sistema MSFA empregado para a classificação de águas: **P**- bomba peristáltica, **S1**- Soluções das amostras de água, **S2**- Solução tampão pH = 10 (NH₃/NH₄Cl), **S3** - Reagente Cromogênico (soluções de murexida, EBT ou PAR), **I** - Injetor Proporcional, **W** - Descarte, **L1 e L2** - Alças de 40 μ L preenchidas com ar **L3 e L4** - Alças de 40 μ L preenchidas com o reagente cromogênico, **L5 e L6** - Alças de 45 μ L preenchidas com solução tampão pH = 10, **L7** - Alça de de 50 μ L preenchida com amostras de água, **B**- Bobina de reação de 50 cm, **D**- Detector

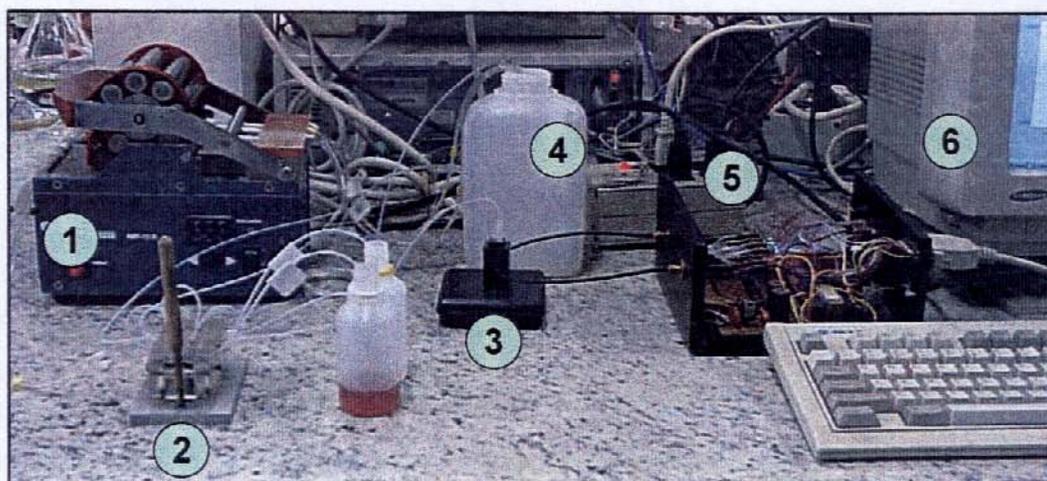


Figura 15: Fotografia do sistema de análise: **1**- Bomba Peristáltica, **2**- Injetor Proporcional, **3**- Cella de Fluxo, **4**- Descarte, **5**- Fotômetro, **6**- Microcomputador

Para a realização das análises de classificação de águas, um sistema bastante semelhante ao sistema descrito anteriormente foi utilizado. Duas novas alças de amostragem foram adaptadas ao injetor proporcional de forma a permitir a injeção simultânea da solução tampão, do reagente cromogênico e da amostra, a uma vazão de 2 mL min^{-1} (Figura 14). Com esta configuração, são obtidas, em média, 10 leituras para cada emissor durante a passagem do monossegmento através da cela de fluxo. Uma visão geral do sistema empregado pode ser visto na Figura 15.

III.6 – Avaliação do Instrumento

III.6.1 – Espectros de Emissão e Perfis de Resposta dos LEDs em função do tempo

Para a obtenção dos espectros de emissão dos LEDs, o feixe de fibras ópticas de saída da radiação do fotômetro foi conectado à entrada do sistema de detecção do espectrofotômetro comercial. Os espectros de transmitância foram então adquiridos tendo, como referência, o espectro na ausência de luz.

O fotômetro foi conectado da mesma maneira ao espectrofotômetro *home-made*, para avaliação dos perfis de intensidade de radiação nos primeiros instantes de acionamento dos LEDs. Para isso, o espectrofotômetro foi ajustado para realizar trinta varreduras, a primeira logo após o LED ser acionado e as demais em intervalos de três segundos após o acionamento.

III.6.2 Testes de Estabilidade

Avaliou-se a estabilidade dos sinais adquiridos nos oito comprimentos de onda, com acionamento contínuo ou múltiplo seqüencial (“piscando”) dos LEDs. Para isto, uma cela de fluxo com caminho óptico de 10 mm foi preenchida com água desionizada e leituras de intensidade do sinal foram realizadas durante uma hora, em intervalos de 1 s, empregando-se ambos os modos de acionamento.

III.6.3 Resposta do Instrumento ao Acionamento Seqüencial dos LEDs

Para avaliar a resposta do instrumento, foram realizadas medidas de absorvância com todos os LEDs em modo seqüencial, com cada um dos LEDs em modo contínuo e também pulsando-os individualmente. Para isso, empregou-se o sistema de análise descrito na seção III.5 (Figura 13), com uma solução de Zn(II) 3,0 mg L⁻¹ e alaranjado de xilenol 0,3 mmol L⁻¹.

III.6.4 - Influência das bandas de emissão dos LEDs em medidas de absorvância

Com o objetivo de avaliar a influência das larguras das bandas de emissão dos LEDs em medidas de absorvância, construiu-se curvas analíticas para soluções do íon Zn(II) e para soluções de azul de bromotimol, na faixa de concentração de 1,0 a 5,0 mg L⁻¹, a partir de medidas com o fotômetro desenvolvido e com um espectrofotômetro comercial (HP-8453).

As absorvâncias das soluções de Zn(II) foram medidas, com o fotômetro, seguindo-se o procedimento descrito na seção III.5 e utilizando-se alaranjado de xilenol 0,3 mmol L⁻¹. As absorvâncias das soluções de ABT foram medidas empregando-se um sistema MSFA no qual um volume de 150 µL da solução do indicador era injetado à uma vazão de 2 mL min⁻¹ entre duas bolhas de ar.

As medidas com o espectrofotômetro comercial foram realizadas em batelada utilizando-se uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e as soluções de referência indicadas na seção III.4.1.

III.7 - Aplicações do Instrumento

III.7.1 Análise Multicomponente Simultânea

III.7.1.1 Calibração e validação

Para avaliar o desempenho do fotômetro em determinações simultâneas baseadas em calibração multivariada, realizou-se estudos com as misturas binárias descritas na seção III.4.2. Para o procedimento de calibração, foram empregadas treze misturas que apresentavam cinco níveis de concentração para cada íon metálico. A distribuição dessas misturas em termos das concentrações seguiu o planejamento indicado na Figura 12 (Pontos em Azul). Oito misturas com concentrações intermediárias àquelas empregadas para a calibração foram empregadas para a validação externa dos modelos e, também estão indicadas na Figura 12 (pontos em vermelho).

As medidas de absorbância das misturas foram efetuadas empregando-se todos os LEDs do fotômetro em modo múltiplo seqüencial. O mesmo procedimento e as mesmas condições descritas na seção III.5 foram utilizadas.

Os modelos foram construídos utilizando-se o método de regressão linear múltipla (MLR) a partir das médias das absorbâncias encontradas para leituras em triplicata de todas as amostras, as quais foram inseridas aleatoriamente no sistema de análise. O software Unscrambler 7.5 (CAMO) foi empregado para a realização dos cálculos inerentes à construção e validação dos modelos.

III.7.1.2 Previsão: Determinação simultânea de Zn(II) e Cu(II) em amostras comerciais

Foram realizadas determinações de Zn(II) e Cu(II) em amostras de três medicamentos e dois tipos de latão (seção III.4.4). As medidas de absorbância para as

soluções destas amostras foram realizadas da mesma maneira que as medidas para as soluções de calibração e validação. As absorbâncias obtidas nos vários comprimentos de onda foram empregadas para os cálculos das concentrações, a partir do modelo que apresentou o menor RMSEP e melhor coeficiente de correlação. Para avaliação dos resultados, as determinações também foram realizadas com calibração univariada empregando-se espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

III.7.2 Classificação de águas

Foram analisadas amostras de águas minerais naturais provenientes de seis fontes diferentes (seis distribuidores) e amostras de água mineralizada (água purificada adicionada de sais) fornecidas por um único distribuidor. Como replicatas destas amostras foram empregadas águas com datas de engarrafamento diferentes, cobrindo períodos de dois a sete meses entre a amostra mais nova e a amostra mais velha de uma mesma fonte (Tabela 11). Três amostras de água desionizada, três de água destilada e três de água de torneira também foram analisadas para comparação posterior.

Três reagentes cromogênicos (PAR, EBT e murexida) foram empregados em análises fotométricas realizadas separadamente. As medidas com estes reagentes foram efetuadas com o sistema descrito na seção III.5. (Figura 14), injetando-se as amostras, a solução do reagente cromogênico e uma solução tampão pH = 10 (NH₃/NH₄Cl), simultaneamente. Os conjuntos de dados obtidos com cada reagente foram utilizados separadamente ou combinados para as análises de componentes principais, as quais foram realizadas com o software Unscrambler 7.5 (CAMO). Uma análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) foi realizada a partir do software Pirouette 2.11 (Infometrix) com os dados obtidos após a seleção de variáveis.

IV - Resultados e Discussão

IV.1 - Avaliação do instrumento

IV.1.1 Espectros de Emissão e Perfis de Resposta dos LEDs em função do tempo

Os espectros de emissão normalizados obtidos para os oito LEDs do fotômetro são apresentados na Figura 16. A Tabela 2 apresenta os comprimentos de onda nos picos de emissão dos LEDs e as larguras de banda a meia altura encontradas para cada um destes dispositivos. Os comprimentos de onda nominais (indicados pelos fabricantes) também são apresentados nesta tabela.

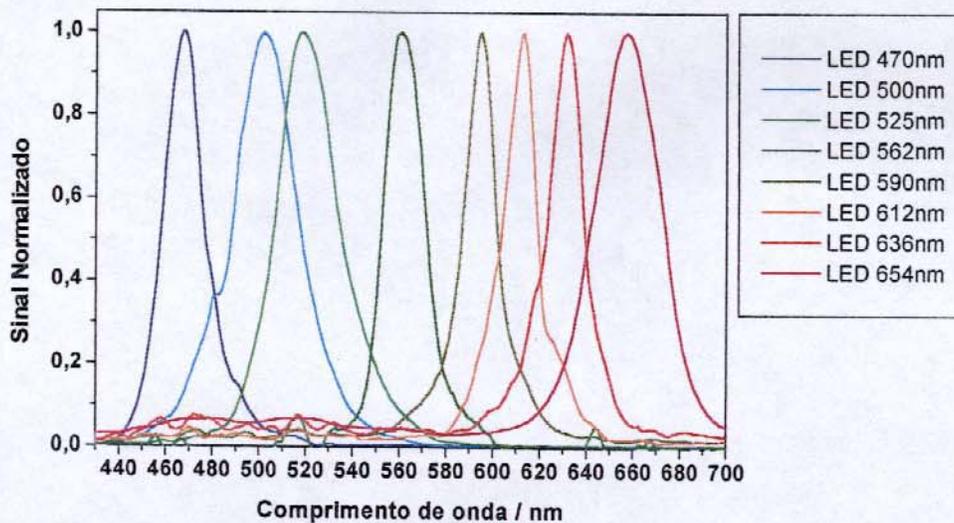


Figura 16: Espectros de emissão normalizados dos LEDs

A Figura 16 mostra que os LEDs empregados cobrem uma boa extensão do espectro visível, permitindo a aplicação do fotômetro em diversas metodologias. Outros LEDs poderão ser alocados no arranjo para preencher as regiões deficientes e ampliar sua faixa de aplicação.

Os resultados da Tabela 3 mostram pequenos desvios, menores que 1,2 %, para os comprimentos de onda dos oito LEDs em relação aos valores nominais. Tais valores são concordantes com os descritos na literatura [20], as pequenas diferenças em relação aos comprimentos de onda nominais podem ser atribuídos à possíveis não uniformidades nos processos de fabricação dos dispositivos e/ou à calibração do espectrofotômetro empregado. Os comprimentos de onda nos picos de emissão determinados experimentalmente são utilizados, deste ponto em diante, para denominar os LEDs empregados no trabalho.

As larguras de banda a meia altura (Tabela 2) estão de acordo com àquelas usualmente encontradas na literatura [20], menores que 40 nm, e comprovam a boa monocromaticidade dos LEDs. A largura de banda encontrada para o LED com emissão em 468 nm (19 nm) indica uma melhora na monocromaticidade dos LEDs com emissão na região do azul, onde o uso de filtros era necessária para a obtenção de bandas estreitas [4].

Tabela 2: Comprimentos de onda nos picos de emissão e larguras de banda a meia altura para os LEDs empregados no fotômetro

Comprimento de onda nominal (nm)	Comprimento de onda encontrado (nm)	Desvio Relativo (%)	Largura de Banda a meia altura (nm)
470	468	-0,4	19
500	502	+0,4	40
525	519	-1,1	30
562	561	-0,2	20
590	595	+0,8	16
612	613	+0,2	16
636	632	-0,6	17
654	657	+0,5	34

Os perfis intensidade de emissão *versus* tempo de acionamento para todos os LEDs foram traçados a partir dos sinais encontrados nos picos de emissão dos trinta espectros obtidos logo após o acionamento dos emissores (Seção III.6.1). O comportamento encontrado para o LED com emissão em 519 nm, Figura 17, é bastante semelhante ao encontrado para o LED com emissão em 502 nm. Para estes dispositivos, a intensidade do sinal torna-se praticamente constante depois que o seu

valor máximo é atingido. O sinal indicado em tempo “zero” foi obtido imediatamente após o acionamento do LED e sua intensidade, usualmente baixa, depende do sincronismo entre o acionamento do emissor e a aquisição do espectro, os quais foram iniciados manualmente e, portanto, podem apresentar erros significativos. O comportamento encontrado para o LED com emissão em 595 nm, Figura 18, foi comum à maioria dos dispositivos (LEDs com emissão em 468, 561, 595, 613, 632 e 657 nm). Para estes emissores, nota-se que a intensidade do sinal decresce cerca de 3 a 4% após alcançar o seu valor máximo, atingindo a estabilidade por volta de 30 segundos após o acionamento. Este resultado mostra que a aquisição de dados em modo contínuo deve ser realizada somente após a estabilização do sinal, para se evitar erros nas medidas de absorbância, diretamente dependentes. Para a realização de medidas em modo sequencial, nas quais os LEDs são pulsados, o tempo com que cada emissor permanece aceso deve ser extremamente reprodutível para que as intensidades de luz obtidas sejam constantes.

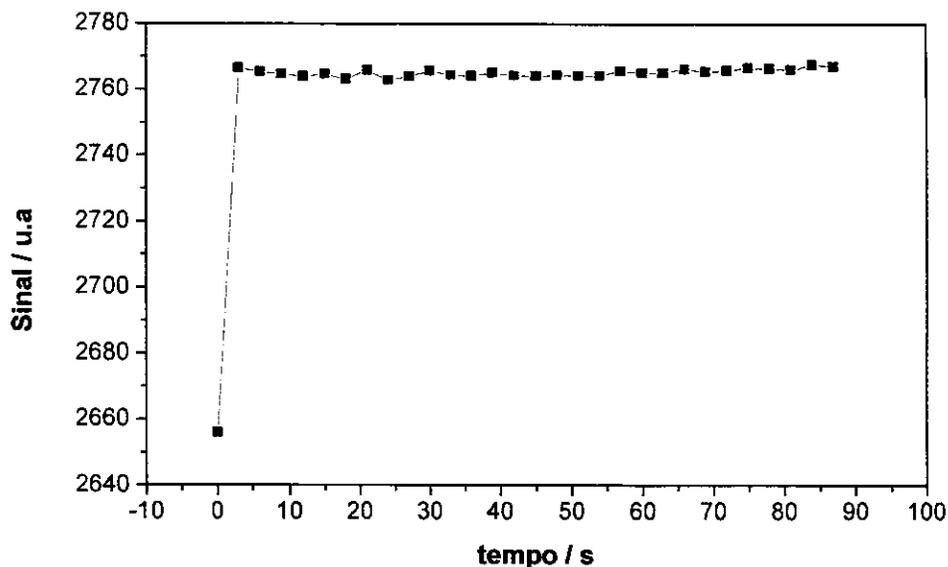


Figura 17: Perfil intensidade vs tempo para LED com emissão em 519 nm

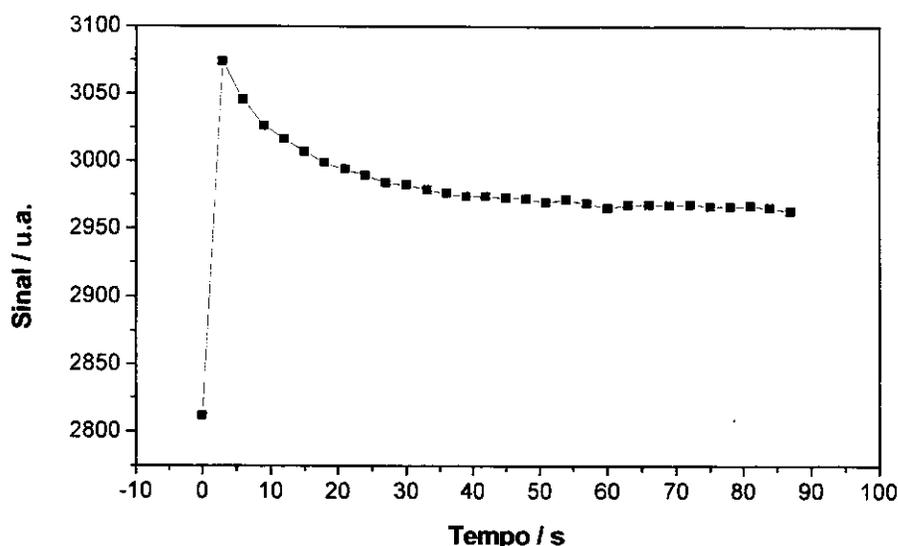


Figura 18: Perfil intensidade vs tempo para LED com emissão em 595 nm

IV.1.2 - Testes de Estabilidade

As estabilidades dos sinais dos LEDs foram avaliadas inicialmente em termos dos “drifts” apresentados. Este parâmetro é bastante importante na avaliação do instrumento pois indica se há uma tendência de aumento ou diminuição dos sinais ao longo do tempo. Conforme apresentado na Tabela 3, “drifts” menores que 1,6 e 1,9 $\mu\text{V h}^{-1}$ foram obtidos para as medidas realizadas em modos contínuo e múltiplo seqüencial, respectivamente.

Para a avaliação das estabilidades em termos de absorbâncias, o primeiro sinal obtido com cada emissor foi empregado como o sinal do branco (S_B) na equação X (seção III.5), sendo considerado o sinal na ausência de luz (S_E) como constante. Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que os “drifts” são pequenos, da ordem de 10^{-7} unidades de absorbância e que a precisão das medidas está na ordem de 10^{-4} unidades, o que é bastante razoável para um fotômetro de feixe único, uma vez que a intensidade de luz emitida por um LED pode variar com o tempo devido, principalmente, ao aquecimento do emissor [20].

Tabela 3: Drifts dos sinais dos LEDs

LED (nm)	Modo Pulsado ($\mu\text{V h}^{-1}$)	Modo Contínuo ($\mu\text{V h}^{-1}$)
468	- 0,50	+ 0,19
502	- 0,50	+ 0,04
519	- 0,20	+ 0,02
561	+ 1,90	a
595	+ 0,78	- 1,60
613	+ 0,09	+ 0,19
632	+ 0,47	- 0,89
657	+ 0,29	- 0,98

a –não avaliado (ver texto)

Tabela 4: Estabilidade dos sinais de Absorbância.

LEDs	Pulsando todos			Contínuo		
	Abs $\times 10^{-4}$	Desvio $\times 10^{-4}$	Drift / Abs h^{-1} $\times 10^{-7}$	Abs $\times 10^{-4}$	Desvio $\times 10^{-4}$	Drift / Abs h^{-1} $\times 10^{-7}$
468	7,4	7,2	4,5	-2,4	5,8	-1,5
502	19	7,0	4,5	3,1	5,7	-0,3
519	10	5,8	1,8	8,1	5,8	0,2
561	-75	24	-16	a	a	a
595	-44	27	-6,5	28	13	14
613	-8,7	5,9	-0,1	-0,9	5,1	-1,7
632	2,7	7,5	-3,8	16	7,8	7,8
657	9,9	8,3	-2,4	6,8	8,3	7,9

a –não avaliado (ver texto)

Os pequenos desvios e os “drifts” consideravelmente baixos para as medidas realizadas em modo intermitente (com os LEDs piscando), mostram que os tempos de emissão para os LEDs, nesse modo de medida, são bastante reprodutíveis, de modo que os comportamentos encontrados nos estudos discutidos na seção anterior não representam problema.

A estabilidade do sinal para o LED com emissão em 561 nm não foi avaliada em modo contínuo, pois a corrente direta aplicada ao mesmo (50 mA) foi ajustada para além do valor máximo indicado pelo fabricante (30 mA) de forma a aumentar sua intensidade de emissão, a qual era bastante baixa mesmo quando aplicada a corrente máxima. Com a corrente muito elevada, o acionamento contínuo do LED causaria danos ao dispositivo, o que não ocorre em modo intermitente devido ao curto espaço de

tempo no qual o mesmo permanece aceso. A precisão nas medidas de absorbância em modo intermitente com este emissor aproxima-se dos valores obtidos com os outros LEDs, mostrando que mesmo em condição desfavorável, os resultados neste comprimento de onda são satisfatórios.

As diferenças encontradas entre os resultados obtidos com acionamento intermitente e contínuo são relativamente pequenas para a maioria dos LEDs e devem-se aos perfis de resposta das intensidades de emissão em função do tempo, discutidos na seção IV.1.1.

IV.1.3 - Resposta do Instrumento ao Acionamento Seqüencial dos LEDs

O algoritmo desenvolvido para medidas em mais de um comprimento de onda exige uma resposta suficientemente rápida dos LEDs e do fotodetector para que o seu uso seja viável. Respostas lentas poderiam causar interferências nos sinais de LEDs adjacentes uma vez que a medida referente a um dado emissor seria realizada enquanto o LED, que foi acionado imediatamente antes, não estivesse totalmente “apagado”.

Os valores de absorbância semelhantes para as medidas em modo múltiplo seqüencial e individual, Tabela 5, mostram que não há influência significativa entre os sinais de diodos adjacentes quando se emprega o modo múltiplo de leituras. Tal resultado pode ser atribuído às altas velocidades de resposta dos LEDs e do fotodetector, que permitem o uso do algoritmo desenvolvido para a realização de medidas em mais de um comprimento de onda. A maior diferença entre as absorbâncias medidas em modo contínuo e seqüencial, cerca de 0,03 unidades para as medidas em 561 nm, deve-se, possivelmente, à condição limite com que este emissor opera (corrente = 50 mA), a qual dificulta a reprodutibilidade nas suas medidas.

Os resultados da Tabela 5 também indicam boas precisões nas medidas realizadas em modo intermitente ou contínuo, o que mostra que ambos os modos de leitura são equivalentes para as medidas de absorbância.

Tabela 5: Respostas para leituras seqüenciais e Individuais dos LEDs

LED (nm)	Pulsando Individualmente (Absorbância ± S.D)	Pulsando Seqüencialmente (Absorbância ± S.D)	Modo Contínuo (Absorbância ± S.D)
468	0,022 ± 0,007	0,007 ± 0,003	0,024 ± 0,007
502	0,194 ± 0,004	0,203 ± 0,002	0,208 ± 0,006
519	0,275 ± 0,008	0,295 ± 0,002	0,295 ± 0,004
561	0,311 ± 0,010	0,337 ± 0,005	a
595	0,208 ± 0,009	0,229 ± 0,004	0,204 ± 0,003
613	0,048 ± 0,001	0,051 ± 0,001	0,044 ± 0,001
632	b	b	b
657	b	b	b

S.D. = desvio padrão, (a) não avaliado (ver texto), (b) solução não absorve

IV.1.4 – Influência das bandas de emissão dos LEDs em medidas de absorbância

Para possibilitar a comparação entre as curvas obtidas através de medidas com os dois instrumentos, as absorbâncias referentes aos comprimentos de onda dos picos de emissão dos LEDs foram empregadas para as calibrações com o espectrofotômetro. As quatro curvas que apresentaram maior sensibilidade analítica para a determinação de Zn(II) com alaranjado de xilenol são apresentadas nas Figuras 19 e 20, em conjunto com as respectivas equações das retas e coeficientes de correlação.

A ordem das inclinações das retas (da mais inclinada para a menos inclinada) foi semelhante para ambos os casos. A única exceção ocorreu para a curva construída em 595 nm, a qual é mais sensível que a curva obtida em 502 nm para as calibrações com o fotômetro. Esta inversão na ordem de sensibilidade pode ser justificada observando-se os espectros normalizados dos LEDs e dos complexos Zn(II)-XO apresentados na Figura 21. De acordo com esta figura, os LEDs com picos de emissão em 502 e 595 nm emitem radiação em regiões onde a absorvidade dos complexos Zn(II)-XO varia significativamente, tornando a sensibilidade das curvas construídas com estes LEDs bastante diferente daquelas construídas com o espectrofotômetro comercial, onde há maior monocromaticidade da radiação.

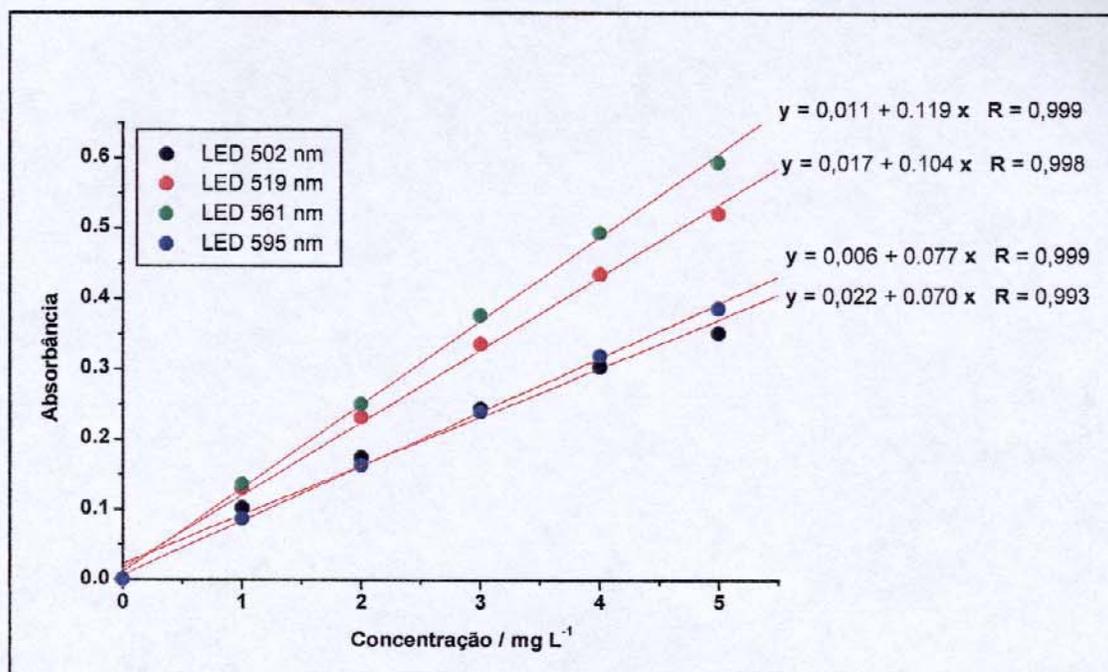


Figura 19: Curvas analíticas para Zn(II)-XO (Zn(II) 1,0 – 5,0 mg L⁻¹) obtidas com o fotômetro baseado em LEDs (As barra de erros para os pontos foram menores que os pontos indicados)

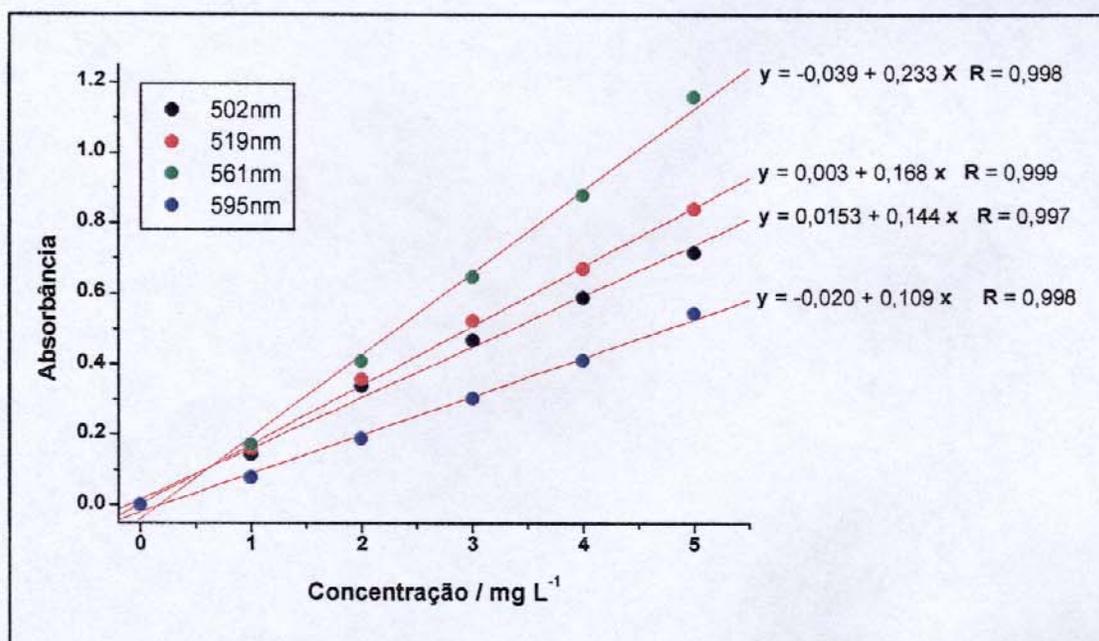


Figura 20: Curvas analíticas para Zn(II)-XO (Zn(II) 1,0 – 5,0 mg L⁻¹) obtidas com o espectrofotômetro comercial

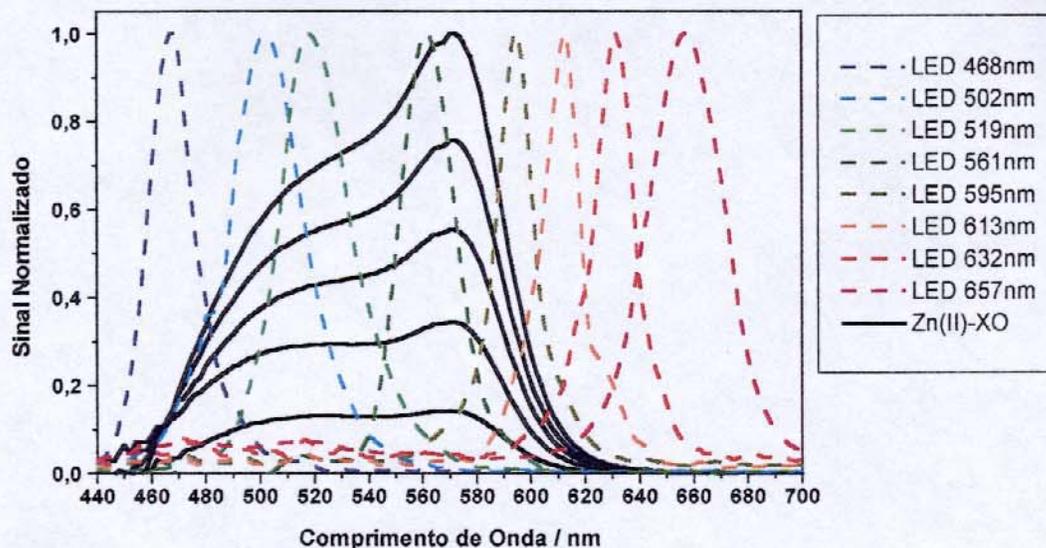


Figura 21: Espectros de absorção normalizados dos complexos Zn(II)-XO (Zn(II) 1,0 – 5,0 mg L⁻¹) com alaranjado de xilenol em pH 5,7 e espectros de emissão normalizados dos LEDs

As calibrações realizadas com os LEDs apresentaram um comportamento linear para todos os casos. Os coeficientes de correlação (R) maiores que 0,997, comprovam este comportamento. A não linearidade nas calibrações pode ocorrer com frequência nestas medidas, o que também é normalmente atribuído às larguras de banda de emissão dos LEDs [4].

Os valores menores de absorbância, encontrados para as medidas com o fotômetro, devem-se à diluição das soluções de referência no sistema de análise em fluxo, onde a concentração do analito diminui aproximadamente 41% após a injeção. Por isso, as inclinações das curvas de calibração obtidas com o espectrofotômetro comercial foram comparadas com as inclinações corrigidas obtidas com o fotômetro, como mostrado na Tabela 6. Novamente, percebe-se que os resultados são mais semelhantes para as regiões onde há pequena variação da absorvidade do complexo em relação ao comprimento de onda. Prova disso é a curva construída com o LED de 519 nm, a qual apresentou mesma inclinação que aquela construída com o espectrofotômetro neste comprimento de onda.

Tabela 6: Comparação entre as inclinações das curvas obtidas para Zn(II).

Comprimento de Onda / nm	IF ^a	IS	(IF/IS)* x100%
502	0,113	0,144	78
519	0,168	0,168	100
561	0,192	0,233	82
595	0,124	0,109	114

a – corrigido pelo fator de diluição no sistema MSFA

*IF – Inclinação com o fotômetro, IS – Inclinação com o espectrofotômetro

Os limites de detecção (L.D.) encontrados para as curvas de maior sensibilidade (curva construída com o LED de 561 nm e curva construída a partir de medidas com o espectrofotômetro em 561 nm) foram determinados empregando-se os sinais (s) obtidos com a seguinte equação,

$$s = b + 3 * SD \quad (XI)$$

onde b é o coeficiente linear da curva de calibração e SD é o desvio padrão encontrado para o ajuste desta mesma curva (erro obtido com o ajuste por mínimos quadrados) [52]. Valores de 0,26 e 0,40 mg L⁻¹ foram obtidos para as calibrações com o fotômetro e com o espectrofotômetro, respectivamente, mostrando que a largura de banda do LED não apresentou uma influência negativa para o cálculo deste parâmetro.

As curvas analíticas obtidas para a determinação de azul de bromotimol com três dos quatro comprimentos de onda não estudados no caso anterior são apresentadas nas Figuras 22 e 23. A ordem de sensibilidade para estas curvas foi igual em ambos os casos, sendo a curva construída em 613 nm a de maior sensibilidade.

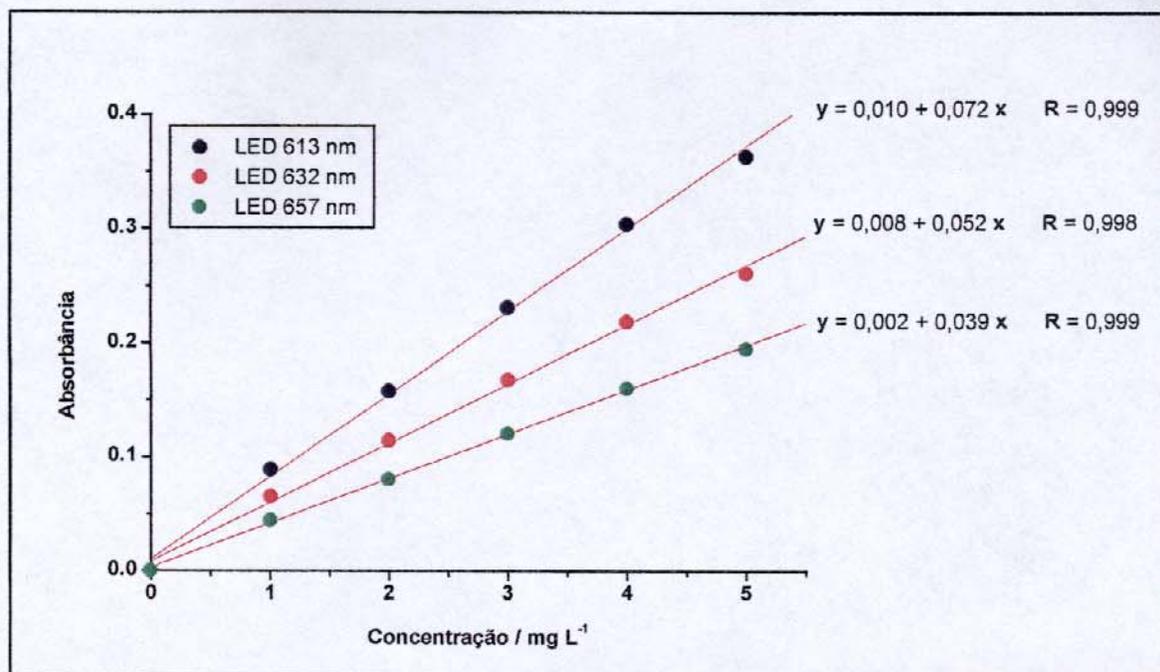


Figura 22: Curvas analíticas para o reagente azul de bromotimol (ABT 1,0 – 5,0 mg L⁻¹) obtidas com o fotômetro baseado em LEDs. (As barra de erros para os pontos foram menores que os pontos indicados)

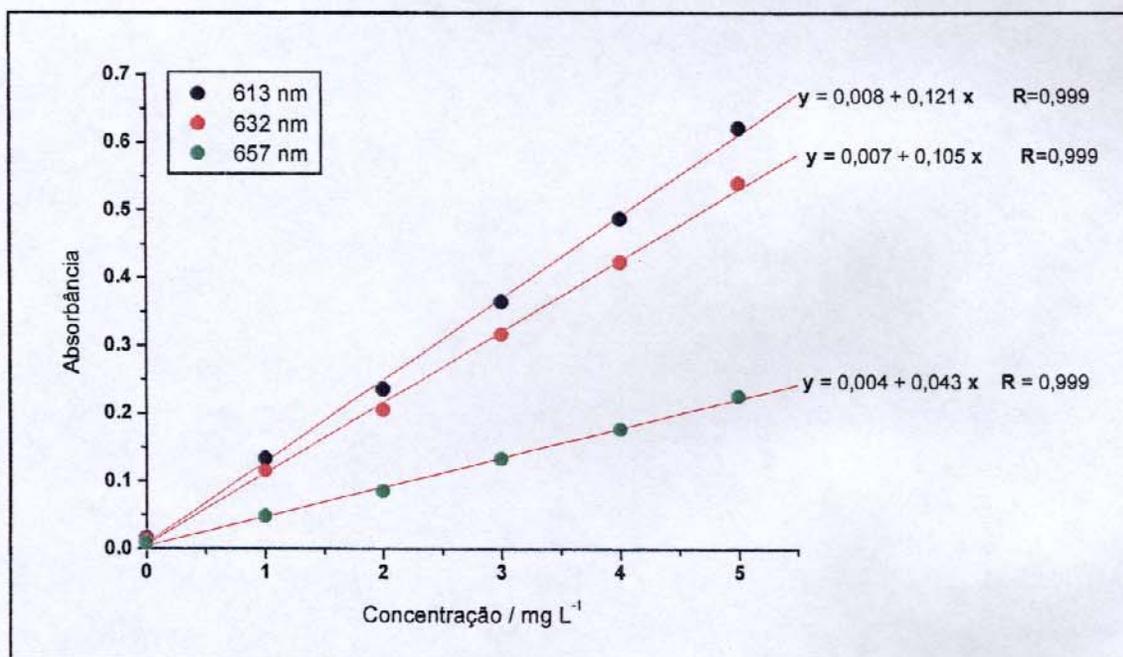


Figura 23: Curvas analíticas para o reagente azul de bromotimol (ABT 1,0 – 5,0 mg L⁻¹) obtidas com o espectrofotômetro comercial.

A comparação entre as sensibilidades das curvas obtidas com o fotômetro e com o espectrofotômetro comercial foi realizada diretamente, uma vez que, a princípio, as soluções do indicador não sofrem diluição no sistema de análise empregado para as medidas com o fotômetro. Os resultados indicados na Tabela 7 mostram que as diferenças entre as inclinações foram mais expressivas que no caso anterior, o que pode ser atribuído ao perfil mais estreito do espectro de absorção do azul de bromotimol (Figura 24) comparado ao espectro do complexo Zn(II)-XO (Figura 21), às diferentes sensibilidades dos detectores dos instrumentos para estas regiões e devido à influência das larguras das bandas de emissão dos LEDs. Além disso, o sistema de análise empregado (sistema MSFA) pode causar uma pequena diluição das soluções devida, principalmente, a formação de filmes do carregador (H_2O) no interior da cela de fluxo.

Tabela 7: Comparação entre as inclinações das curvas obtidas para o ABT

Comprimento de Onda / nm	Inclinação com o fotômetro	Inclinação com o espectrofotômetro	(IF/IS)* x100%
613	0,072	0,121	60
632	0,052	0,105	50
657	0,039	0,043	91

* IF – Inclinação com o fotômetro, IS – Inclinação com o espectrofotômetro

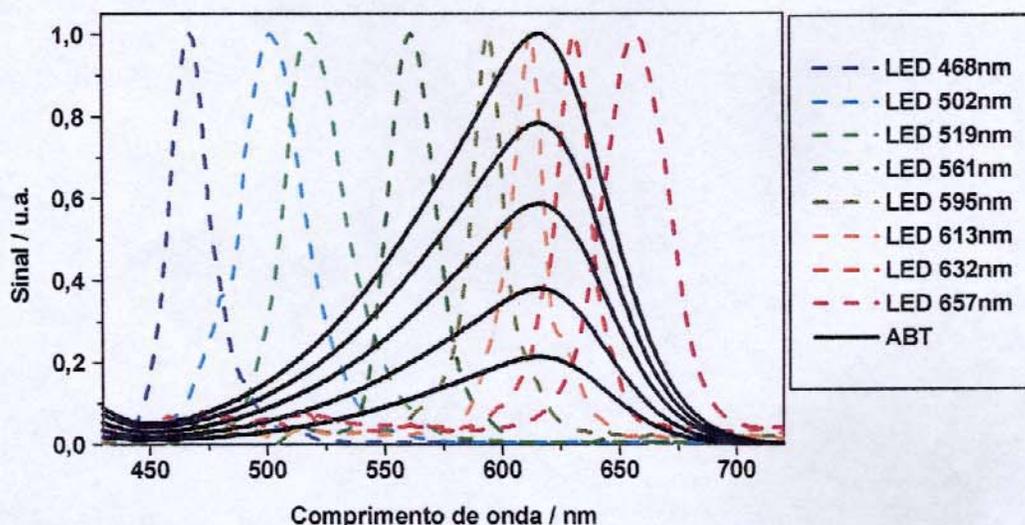


Figura 24: Espectros de absorção normalizados para o reagente azul de bromotimol (ABT 1,0 - 5,0 mg L⁻¹) em tampão pH 10 e espectros de emissão normalizados dos LEDs.

IV.2 - Aplicações

IV.2.1 Análise Multicomponente Simultânea

O reagente cromogênico alaranjado de xilenol tem sido empregado na determinação simultânea de diversos metais [1, 53 e 54]. A boa cinética de formação dos complexos e a seletividade considerável para alguns elementos foram os principais fatores que levaram a escolha deste reagente para a aplicação do fotômetro em análise multicomponente simultânea.

Nas condições empregadas (pH 5,7), os complexos dos metais estudados seguem a relação estequiométrica metal:reagente (M:R) de 2:1 [55], formando a estrutura indicada na Figura 25.

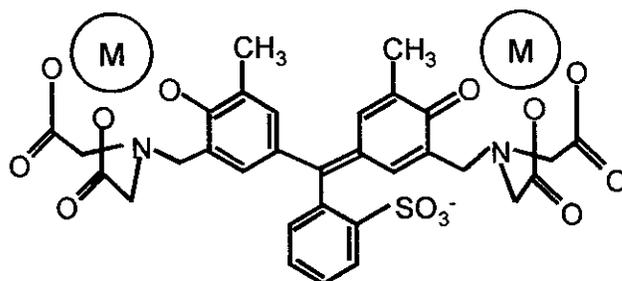


Figura 25: Estrutura para os complexos dos metais estudados com alaranjado de xilenol em pH 5,7. M = íon metálico.

IV.2.1.1 – Calibração e Validação

A capacidade de previsão de um modelo quimiométrico está intimamente relacionada com as diferenças espectrais, muitas vezes sutis, entre as espécies que se deseja determinar simultaneamente. Via de regra, quanto maiores estas diferenças, maiores são as chances de sucesso na calibração multivariada. Neste trabalho, foram estudados dois sistemas químicos. Um sistema onde os perfis espectrais são bastante

semelhantes (Zn(II)-XO/Cu(II)-XO) e outro onde as diferenças são mais pronunciadas (Zn(II)-XO/Ni(II)-XO). Os espectros normalizados dos complexos Zn(II)-XO, Ni(II)-XO e Cu(II)-XO, apresentados em conjunto com espectros de emissão dos LEDs na Figura 26, demonstram essas diferenças.

Inicialmente, foram construídos os modelos empregando-se os dados obtidos com os oito LEDs do fotômetro. A partir dos coeficientes de regressão encontrados para cada variável (comprimento de onda) e da observação dos espectros de absorção dos complexos, algumas variáveis foram selecionadas e novos modelos foram construídos com o objetivo de minimizar as redundâncias. Os modelos construídos, para ambos os sistemas químicos, são apresentados nas Tabelas 8 e 9 em termos dos coeficientes de correlação e dos erros médios quadráticos de previsão (RMSEP).

Conforme esperado, os modelos de calibração construídos com as misturas Zn(II)/Ni(II) apresentaram os menores valores de RMSEP e os melhores coeficientes de correlação. Além do deslocamento da banda de absorção do complexo Ni(II)-XO em relação à banda do complexo Zn(II)-XO, a maior absortividade molar para o complexo de níquel também contribui para os melhores resultados neste sistema, uma vez que a sensibilidade do método é aumentada.

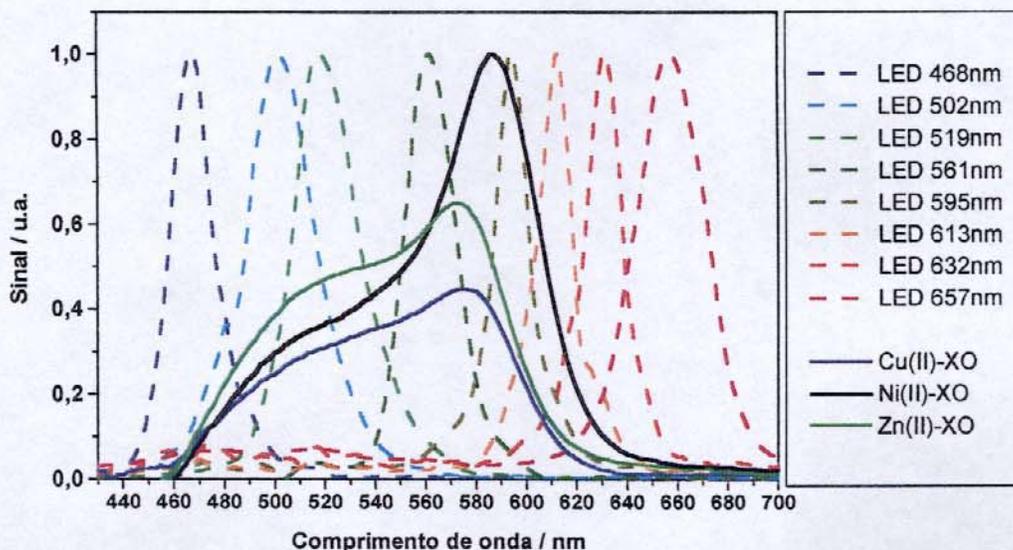


Figura 26: Espectros de absorção normalizados dos complexos de Zn(II), Cu(II) e Ni(II) (2 mg L^{-1}) com alaranjado de xilenol em pH 5,7 e espectros de emissão normalizados dos LEDs

Tabela 8: Parâmetros encontrados para a validação externa do modelo construído para o sistema Zn(II)/Cu(II).

Comprimentos de onda	Zn(II)		Cu(II)	
	Correlação	RMSEP (mg L ⁻¹)	Correlação	RMSEP (mg L ⁻¹)
8	0.998	0.062	0.967	0.314
7 ^a	0.974	0.315	0.983	0.138
7^b	0.998	0.057	0.987	0.121
5 ^c	0.996	0.125	0.985	0.130

a – sem LED de 502 nm

b – sem LED de 561 nm

c – sem LEDs de 468, 632 e 657 nm

Tabela 9: Parâmetros encontrados para a validação externa do modelo construído para o sistema Zn(II)/Ni(II).

Comprimentos de onda	Zn(II)		Ni(II)	
	Correlação	RMSEP (mg L ⁻¹)	Correlação	RMSEP (mg L ⁻¹)
7 ^a	0.998	0.061	0.994	0.081
6 ^b	0.999	0.051	0.996	0.088
5 ^c	0.997	0.090	0.994	0.099

a – Sem LED de 502 nm (O LED com emissão em 500 nm não havia sido instalado)

b – Sem LEDs de 502 e 561nm

c – Sem LEDs de 468, 502 e 561nm

Apesar dos erros maiores, os resultados obtidos para as misturas Zn(II)/Cu(II) podem ser considerados satisfatórios, pois mostram que mesmo sob uma condição pouco favorável, a informação gerada pelos LEDs foi suficiente para a construção de modelos que apresentam erros aceitáveis para muitas aplicações analíticas. Tomando os valores de RMSEP para o modelo construído sem o LED de 561nm (linha em negrito na Tabela 8) como erros absolutos, as previsões para as menores concentrações estudadas (1,0 mg L⁻¹) teriam erros relativos de 6 e 12% nas determinações de Zn(II) e Cu(II), respectivamente.

Os resultados indicados na Tabela 8 mostram que os modelos construídos para o sistema Zn(II)/Cu(II), após a seleção das variáveis, apresentaram valores de RMSEP significativamente diferentes daqueles obtidos com todas as variáveis, quando comparados através de um teste F ao nível de 95 % de confiança. O modelo construído

sem a informação obtida com o LED com emissão em 561 nm apresentou os melhores resultados tanto para o Zn quanto para o Cu. Tal resultado pode ser explicado em função da condição limite com que este LED trabalha (seção III.4.5) e devido a grande absorção de luz por ambos os complexos neste comprimento de onda. Regiões onde um complexo absorve muita luz e os outros pouca luz fornecem, geralmente, informação mais relevante para a construção dos modelos.

Embora a informação obtida com o LED de 657 nm não pareça importante, pois os complexos metálicos não absorvem nesta região, bons resultados foram obtidos com a inclusão desta variável. Resultados semelhantes tem sido descritos indicando que este tipo de informação pode ser utilizada como uma espécie de referência na construção dos modelos [56].

Para o sistema Zn(II)/Ni(II) as diferenças nos valores de RMSEP foram menos pronunciadas (Tabela 9) depois de realizada a seleção de variáveis. Como a diferença espectral é maior para este sistema e as medidas não foram realizadas com o LED de 502 nm, uma melhora do modelo não era esperada.

De uma maneira geral, os valores de RMSEP encontrados para ambos os sistemas são similares àqueles descritos na literatura quando um espectrofotômetro *diode array* é empregado na detecção [57].

IV.2.1.2 –Previsão: Determinação simultânea de Zn(II) e Cu(II) em amostras de medicamentos e ligas metálicas

Zn e Cu são espécies que se apresentam combinadas em um número maior de amostras comerciais que o par Zn e Ni. Além das propriedades que os tornam úteis em muitas ligas metálicas, esses elementos são essenciais à saúde humana sendo empregados na formulação de uma série de medicamentos. Por esse motivo, a determinação simultânea de Zn e Cu em duas amostras de latão e em três amostras de medicamentos foi escolhida para a aplicação do instrumento.

Os resultados apresentados na Tabela 10 foram obtidos a partir do modelo de calibração que apresentou os menores RMSEPs, isto é, com o modelo construído sem

as informações obtidas com o LED com emissão em 561 nm (linha em negrito na Tabela 8). De uma maneira geral, as concentrações encontradas através do método proposto se assemelham às encontradas por FAAS, com erros relativos médios de 7,0 e 9,0 % para as concentrações em zinco e cobre, respectivamente. Os maiores desvios, principalmente para as concentrações em cobre, são, em grande parte, devido às dificuldades na construção do modelo de calibração, discutidas na seção anterior e às concentrações relativamente menores para este analito em todos os medicamentos. Testes “t” emparelhados foram aplicados aos valores de concentrações de Zn(II) e Cu(II) indicados na Tabela 10 mostrando que os resultados obtidos com o fotômetro não foram significativamente diferentes daqueles encontrados por FAAS ao nível de 95% de confiança. Além disso, o comportamento aleatório dos desvios encontrados para as determinações indicou a inexistência de tendências sistemáticas para as medidas.

Tabela 10: Concentrações de zinco e cobre determinadas em amostras comerciais

Amostra	Un.	Zn			Cu		
		Fotômetro a	AAS	Desvio (%)	Fotômetro a	AAS	Desvio (%)
AD-Element	mg L ⁻¹	2385 ± 43	2429	- 1,8	748 ± 24	723	+ 3,5
PED-Element A	mg L ⁻¹	506 ± 12	500	+ 1,2	145 ± 23	142	+ 2,1
PED-Element B	mg L ⁻¹	504 ± 2,0	500	+ 0,8	159 ± 5,2	142	+ 12
Zn-Cu Oligosol A	mg L ⁻¹	31,0 ± 1,5	33,3	- 6,9	33,1 ± 4,2	35,1	- 5,7
Zn-Cu Oligosol B	mg L ⁻¹	31,5 ± 1,3	33,3	- 5,4	32,9 ± 3,0	36,1	- 8,9
Brass-1 A	mg g ⁻¹	372 ± 13	356	+ 4,5	621 ± 16	631	- 1,6
Brass-1 B	mg g ⁻¹	410 ± 42	360	+ 14	578 ± 49	638	- 9,4
Brass-2 A	mg g ⁻¹	350 ± 35	351	- 0,3	636 ± 49	631	+ 0,1
Brass-2 B	mg g ⁻¹	369 ± 14	356	+ 3,7	647 ± 18	639	+ 1,3

a = concentração ± desvio padrão para três determinações

IV.2.2 – Classificação de Águas

O consumo de águas minerais engarrafadas no Brasil tem sido bastante expressivo nos últimos anos. Segundo balanços do Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM) e da Associação Brasileira da Indústria de Água Mineral (ABINAM) [58 - 59], foram consumidos, somente em 2001, cerca de 4,320 bilhões de litros, o que situa o Brasil entre os 10 maiores produtores do mundo. Com o crescimento dos mercados interno e externo, um controle cada vez mais rigoroso tem sido exigido pelos consumidores, principalmente por aqueles que importam a água brasileira.

Neste sentido, os métodos quimiométricos de reconhecimento de padrão podem ser uma alternativa rápida e segura para a avaliação de possíveis alterações químicas nas águas, permitindo também testar a autenticidade das mesmas.

Em sua dissertação de mestrado, Scarminio [47] aplicou métodos de reconhecimento de padrão para a classificação de águas minerais provenientes de diversas fontes de três cidades diferentes. Para isto, as concentrações de seis elementos (P, Na, Ca, Mg, Si e K) foram determinadas por espectrometria de emissão ou absorção atômica e empregadas como variáveis nos métodos propostos. A boa classificação das amostras e a construção de modelos, que permitiram testar a autenticidade de algumas águas comerciais, comprovaram a eficiência dos métodos empregados neste trabalho, o qual foi o pioneiro na aplicação de métodos de reconhecimento de padrão pelo grupo de quimiometria do Instituto de Química da Unicamp no início dos anos 80.

No presente trabalho, apenas as medidas com os oito LEDs do fotômetro foram empregadas como variáveis nas análises discriminatórias. O objetivo foi avaliar se as medidas obtidas com os reagentes cromogênicos adequados seriam suficientes para proporcionar uma boa discriminação, sem a necessidade de se conhecer exatamente a concentração dos elementos presentes nas águas.

Para que a análise discriminatória tivesse sucesso, era de fundamental importância que os parâmetros medidos (variáveis) refletissem as características singulares dos

conjuntos de amostras que se esperava observar. No caso das águas minerais estudadas, os rótulos indicaram diferenças marcantes nas concentrações dos íons Ca(II) e Mg(II), como está indicado na Tabela 11. A concentração total desses íons em águas é conhecida como dureza da água, a qual é um parâmetro de qualidade bastante importante, usualmente determinado por titulação complexométrica com EDTA. Nessa titulação, os reagentes murexida ou EBT são freqüentemente empregados como indicadores dos íons Ca(II) e Mg(II), graças a formação de complexos coloridos com esses íons em meio básico [60-61]. Nesse trabalho, os reagentes Murexida e EBT foram empregados na análise fotométrica das águas com o intuito de se obter a informação referente à dureza das mesmas e, a partir desta informação, realizar uma análise classificatória com grandes chances de sucesso. O reagente PAR foi empregado para se obter a informação referente às concentrações de outros íons, tais como Zn(II) e Cu(II) que eventualmente pudessem colaborar para a discriminação. As análises com estes três reagentes foram realizadas em meio tamponado pH = 10 (NH₃/NH₄Cl).

Análises de componentes principais foram realizadas com as respostas obtidas para cada um dos reagentes (8 variáveis) ou com combinações das respostas para dois ou todos os reagentes (16 e 24 variáveis, respectivamente). Para a realização destas análises, os dados foram apenas centrados na média. Numericamente, centrar os dados na média consiste em subtrair o valor medido de uma variável para uma amostra do valor médio dessa variável, encontrado para todas as amostras. Geometricamente este pré-processamento permite deslocar a origem do sistema de eixos ortogonais para o centro de distribuição dos dados, possibilitando às componentes principais uma descrição melhor da variância dos dados [40,42]. Inicialmente, foram realizadas PCAs empregando-se quatro componentes principais, porém estas análises demonstraram que três PCs eram suficientes para explicar praticamente toda a variância nos dados e, portanto, este foi o número de PCs utilizado.

Tabela 11: Características das amostras de águas indicadas nos rótulos

Fonte	Período ^a	Nº de Amostras	[Ca ²⁺] mg L ⁻¹	[Mg ²⁺] mg L ⁻¹	Dureza mg L ⁻¹
Levíssima	26/07 - 03/12	7	0,57	0,35	0,92
Leve	12/05 - 10/12	5	7,03	2,84	9,86
Purificada	14/10 - 02/12	4	10,40	4,80	15,20
Ycuara	28/08 - 22/12	6	6,22	9,06	15,28
São Bernardo	26/09 - 05/12	4	13,23	4,96	18,19
Água Santa	13/09 - 27/12	7	16,40	8,34	24,74
N. S. Aparecida	13/10 - 12/12	3	39,90	12,90	52,80

a = datas de engarrafamento no ano de 2003

Os resultados obtidos com as respostas para cada um dos três reagentes nos oito comprimentos de onda do fotômetro são apresentados nas Figuras 27, 28 e 29 em termos dos gráficos de “scores” para as duas primeiras componentes principais. Nos três casos foi possível observar agrupamentos de amostras, formados basicamente ao longo da primeira componente principal (PC1), a qual explica mais que 96% da variância total encontrada. A distinção entre esses grupos é mais pronunciada para os resultados obtidos com os reagentes murexida e EBT do que para os resultados obtidos com PAR, o que pode ser explicado pela menor sensibilidade do último reagente aos íons metálicos majoritários presentes nas águas, Ca(II) e Mg(II). Os gráficos de “scores” para murexida e EBT mostram que algumas amostras foram melhores discriminadas empregando-se os dados para um ou outro reagente, isto é, as amostras de água de torneira e da fonte *São Bernardo* foram melhor discriminadas empregando-se os dados para EBT e as amostras das fontes *Ycuara*, *Levíssima* e *N.S. Aparecida* foram melhores discriminadas empregando-se os dados para murexida.

A partir destas observações, foram realizados estudos combinando-se os dados para todos os reagentes (24 variáveis) e com a combinação dos dados para murexida e EBT (16 variáveis).

Com a combinação dos dados obtidos para os três reagentes (24 variáveis), a análise de componentes principais foi mais eficiente na discriminação das amostras. Foram formados nove grupos ao longo das duas primeiras PCs que as classificaram de acordo com suas respectivas fontes. Analisando-se o gráfico de “scores” (Figura 30) e a

Tabela 11 nota-se que a primeira componente principal tende a descrever os agrupamentos em ordem da dureza das águas, partindo da água mais dura, fonte *N.S. Aparecida*, até as águas com concentrações de Ca(II) e Mg(II) praticamente inexistentes, águas desionizada e destilada. Apesar de haver esta tendência, a ordem de dureza das águas não é seguida rigorosamente ao longo de PC1, o que pode ser explicado pelo fato do sistema escolhido não descrever efetivamente a dureza das amostras ou devido a informações inexatas nos rótulos das águas.

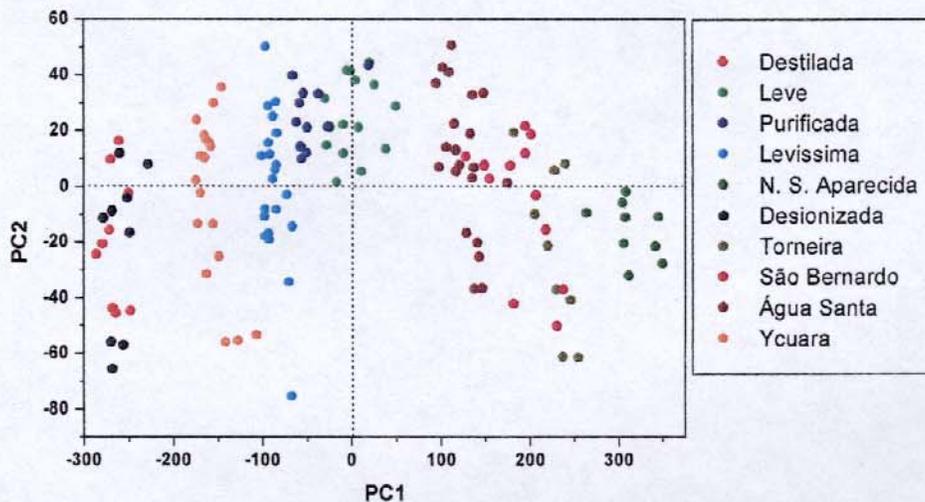


Figura 27: Gráfico de "scores" da PCA realizada com os dados para o reagente Murexida. (explicação das variâncias: PC1 = 97% e PC2 = 3%)

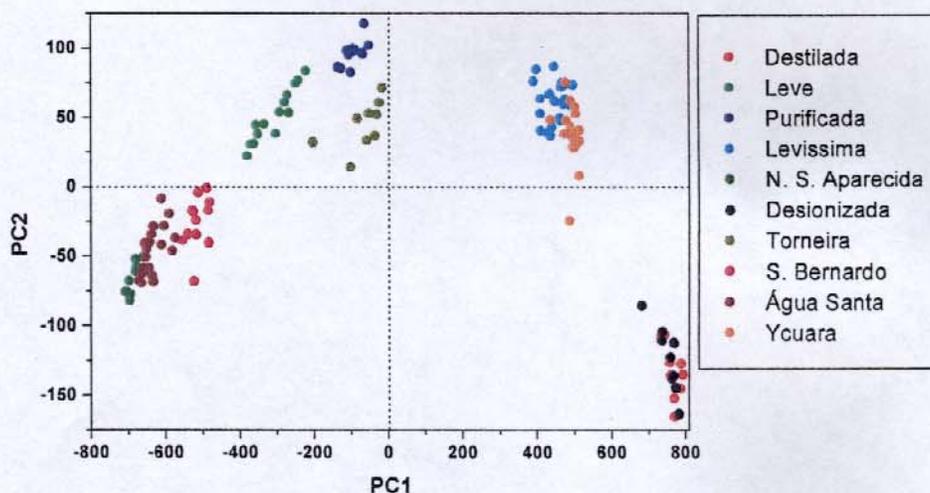


Figura 28: Gráfico de "scores" da PCA realizada com os dados para o reagente EBT (explicação das variâncias: PC1 = 98% e PC2 = 2%)

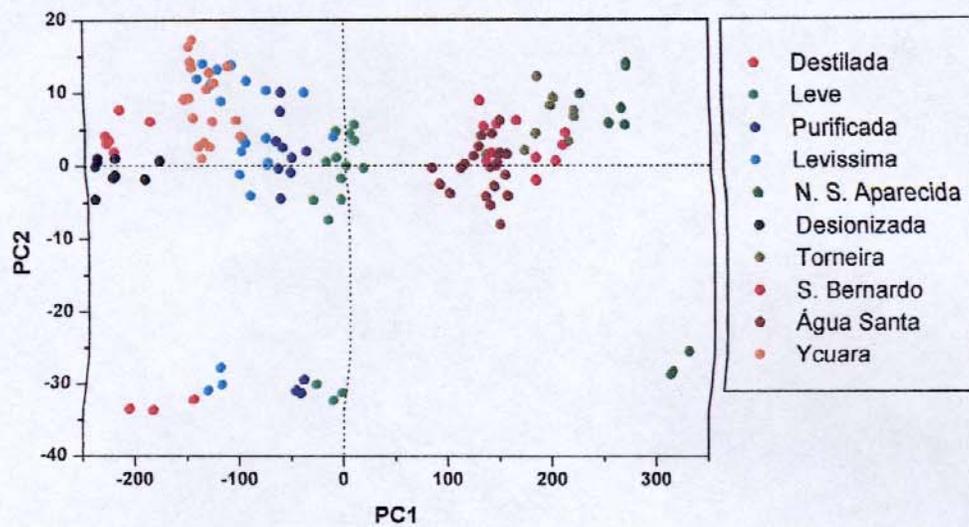


Figura 29: Gráfico de "scores" da PCA realizada com os dados para o reagente PAR (explicação das variâncias: PC1 = 99% e PC2 = 1%)

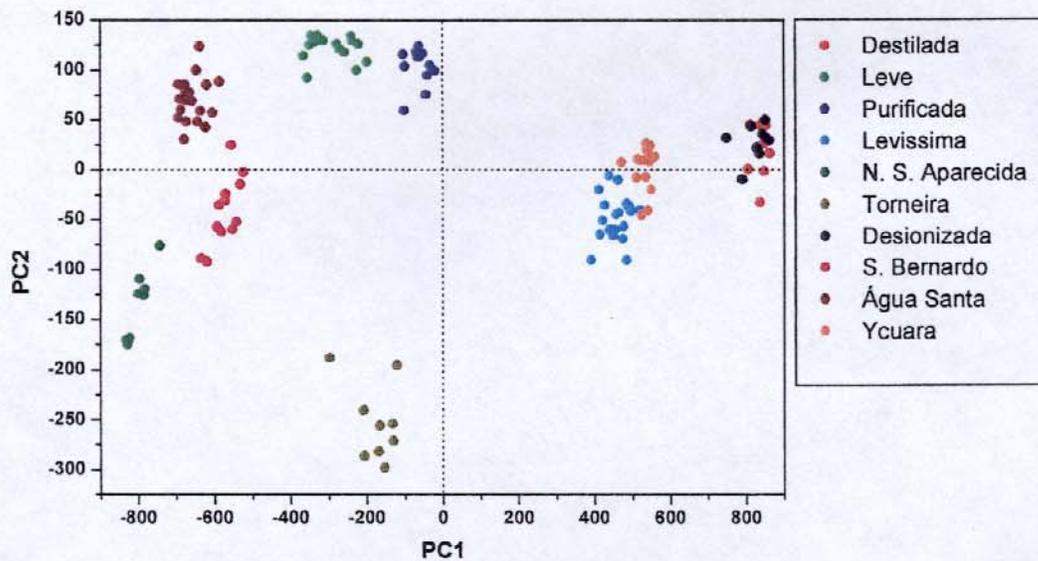


Figura 30: Gráfico de "scores" da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes Murexida, EBT e PAR. (explicação das variâncias: PC1=95% e PC2 = 3%)

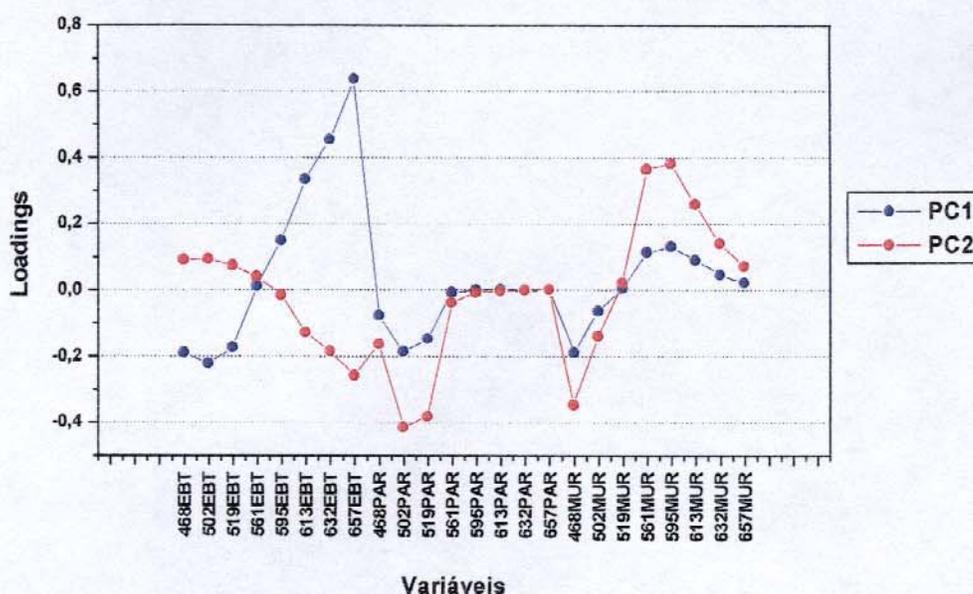


Figura 31: Gráfico de “loadings” da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida, EBT e PAR.

A partir dos gráficos de “scores” e de “loadings” apresentados nas Figuras 30 e 31, respectivamente, é possível observar que a discriminação das amostras de água de torneira ocorre fundamentalmente ao longo da segunda componente principal, a qual foi construída sob forte influência da variável medida a partir do reagente PAR com o LED de 502 nm. Isto leva a propor que a PC2 tende a descrever a concentração de outros íons diferentes de Ca(II) e Mg(II), haja visto que o reagente PAR é mais sensível a outros íons e que as águas de torneira são mais suscetíveis à contaminação por metais das tubulações. É importante notar que a boa discriminação das amostras de água de torneira só foi possível com a combinação das variáveis obtidas para os três reagentes.

A PCA realizada com a combinação dos dados para murexida e EBT, gráfico de “scores” da Figura 32, apresentou também uma boa classificação das amostras, a qual foi bastante semelhante à discriminação obtida com 24 variáveis. O bom resultado pode ser entendido observando-se o gráfico de “loadings” da Figura 31, o qual mostra que as medidas com o reagente murexida em 468 nm apresentam uma influência similar às medidas com o reagente PAR em 502 e 519 nm para a construção da segunda componente principal. Além disso, as outras seis medidas realizadas com o reagente

PAR (468, 561, 595, 613, 632 e 657 nm) apresentaram “loadings” próximos a zero para ambas as PCs, mostrando que a exclusão destas variáveis não alterariam grandemente a discriminação das amostras.

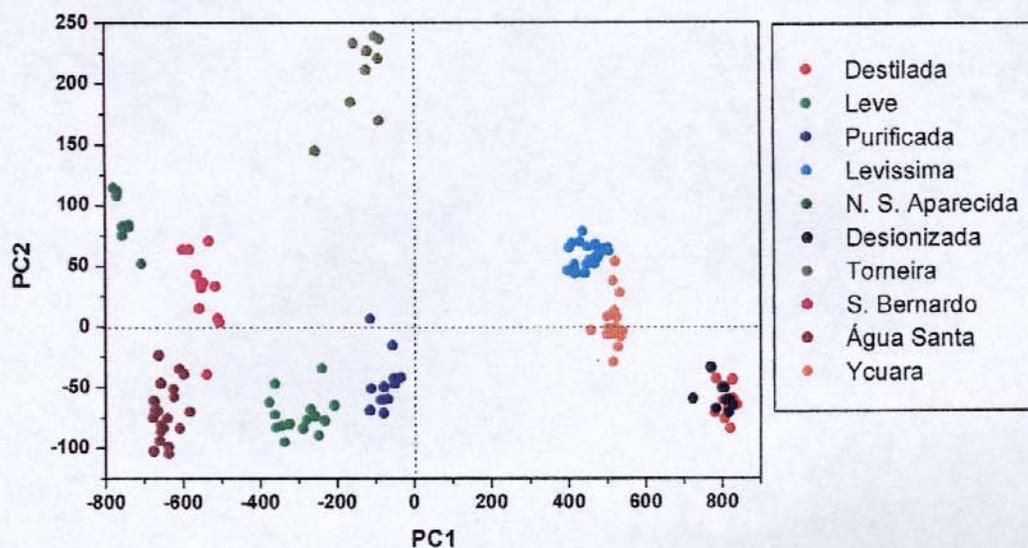


Figura 32: Gráfico de “scores” da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida e EBT. (explicação das variâncias: PC1 = 96% e PC2 = 2%)

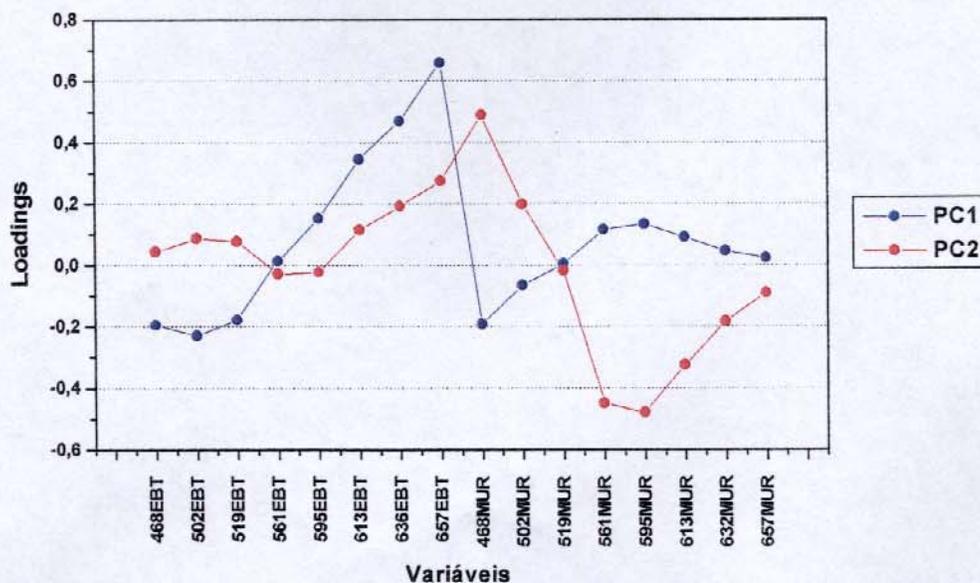


Figura 33: Gráfico de “loadings” da PCA realizada com os dados combinados para os reagentes murexida e EBT.

Observando o gráfico de “loadings” da Figura 33, nota-se que as variáveis mais importantes para a construção das PCs foram as medidas realizadas em 502 e 657 nm (para o EBT) e em 468 e 595 nm (para a murexida). Apenas estas variáveis foram empregadas na PCA, cujos resultados são apresentados na Figura 34. O gráfico de “scores” mostra que a discriminação foi equivalente às obtidas com 24 e 16 variáveis e que, além disso, os grupos de amostras referentes às fontes *Ycuara* e *Levíssima* foram melhor discriminados, o que é confirmado pela inexistência da interface comum a ambos os grupos, observada nas duas últimas PCAs (Figuras 30 e 32). O bom resultado pode ser explicado em função da exclusão de variáveis que continham informação redundante e/ou ruído e que, por esse motivo, prejudicavam a análise.

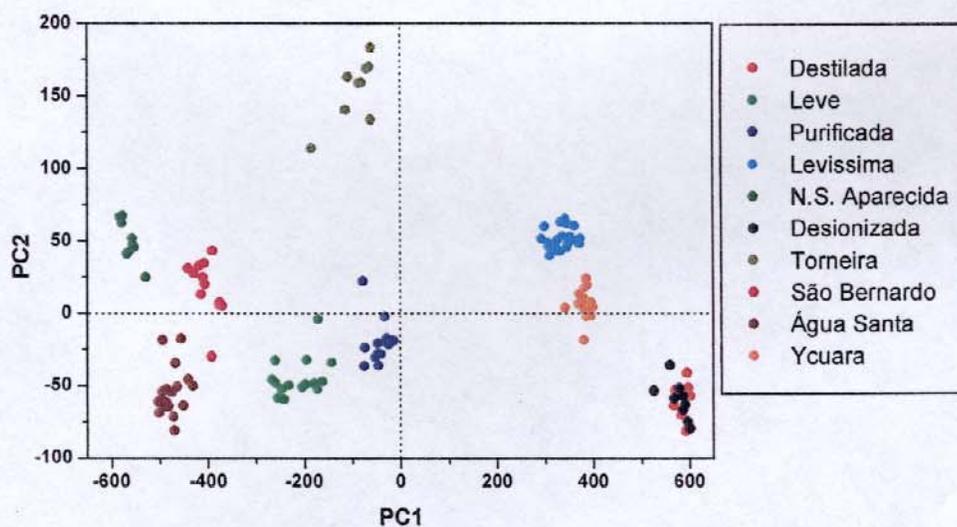


Figura 34: Gráfico de “scores” da PCA realizada com a informação para 4 variáveis (502 e 657 nm com EBT e 468 e 595 nm com murexida) (explicação das variâncias: PC1 = 96% e PC2 = 2%)

Também empregando as quatro variáveis citadas acima, foram realizadas análises de agrupamentos hierárquicos (HCA) das amostras, com o objetivo de comprovar se os dados gerados por essas variáveis eram realmente suficientes para uma boa discriminação.

A Figura 35 mostra o dendograma construído a partir da HCA realizada com os dados centrados na média, empregando distância euclidiana e conexão completa [15]. Neste gráfico, as linhas horizontais indicam as amostras ou grupos de amostras e as linhas verticais unem estes grupos em uma dada similaridade, a qual é indicada no lado esquerdo do gráfico. Em similaridade 0,88 são observados oito grupos, que são contados de acordo com o número de linhas verticais cruzadas por uma linha horizontal nessa similaridade. Os grupos formados são semelhantes àqueles da PCA, com exceção para as amostras das fontes *Ycuara* e *Levíssima* que formam um único grupo. Em similaridade 0,90 são formados 10 grupos, excluindo-se uma amostra de água de torneira que está distante das demais. Os grupos formados nesta similaridade separam as amostras das fontes *Ycuara* e *Levíssima*, porém, as amostras da fonte *Leve* não formam um único grupo, o que não ocorre na análise de componentes principais.

Apesar de não haver um nível de similaridade capaz de discriminar as amostras da mesma maneira que ocorre em PCA, pode-se dizer que a informação gerada pelas quatro variáveis é suficiente para uma boa discriminação por ambos os métodos.

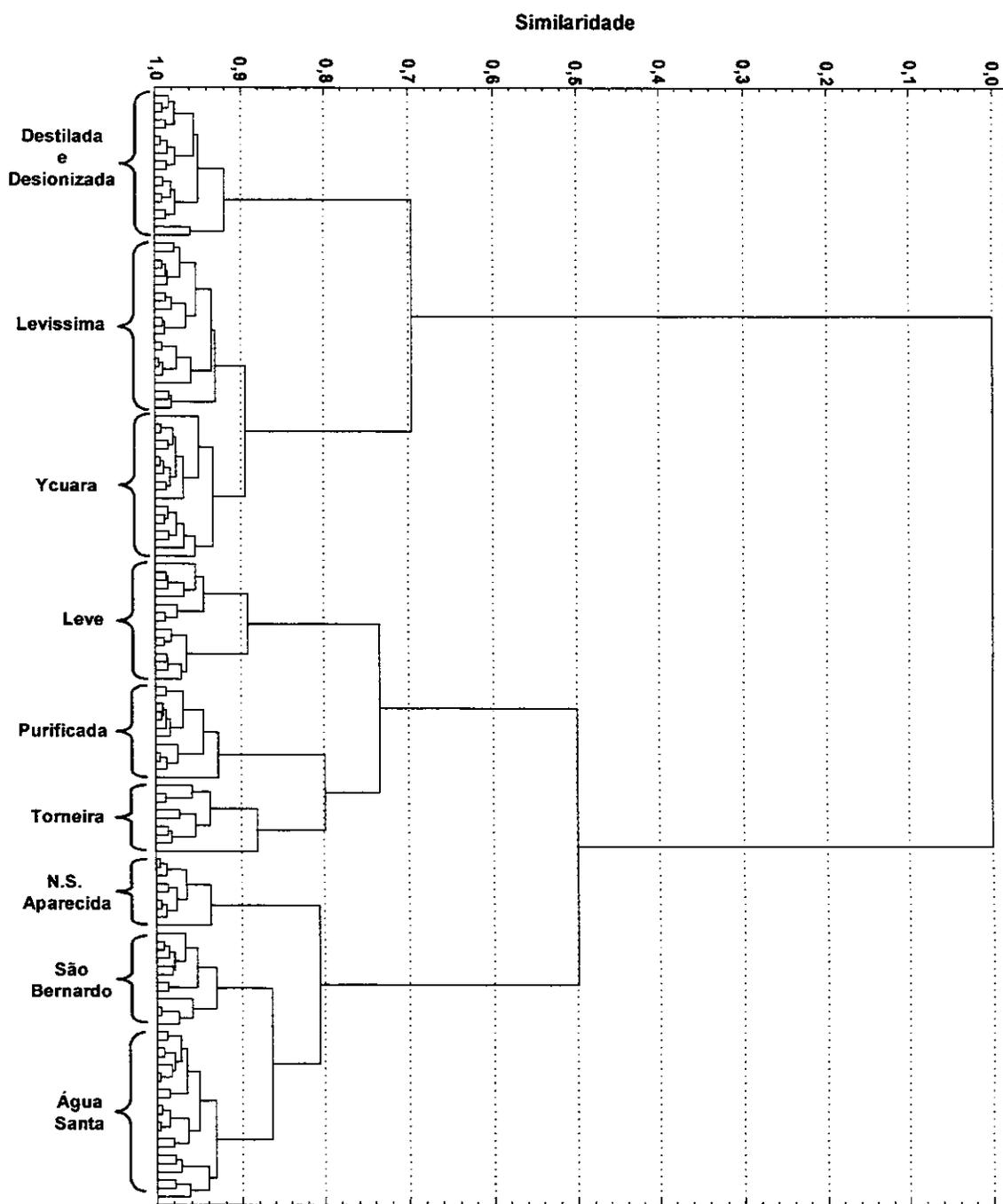


Figura 35: Dendograma construído com a informação de 4 variáveis (502 e 657 nm com EBT e 468 e 595 nm com murexida) empregando-se distância euclidiana e conexão completa.

V - Conclusões

O trabalho desenvolvido mostrou que um fotômetro multicanal baseado em um arranjo de LEDs pode ser empregado em metodologias que envolvam análise multivariada dos dados.

O estudo para a determinação simultânea de metais em soluções aquosas indicou uma margem de erro que é aceitável para algumas aplicações analíticas. A escolha de reagentes cromogênicos que proporcionem uma boa diferenciação dos espectros de absorção dos complexos de interesse podem melhorar o desempenho do instrumento neste tipo de análise. A boa classificação das águas por meio de métodos de reconhecimento de padrão mostrou que a informação obtida a partir de medidas com os LEDs podem apresentar um forte caráter discriminatório. A escolha de sistemas químicos que permitam a diferenciação fotométrica das amostras é de fundamental importância para o sucesso da aplicação do instrumento em análises discriminatórias.

O custo total para a construção do fotômetro, incluindo a interface eletrônica para o controle e aquisição de dados, foi de cerca de US\$ 400. Este valor é bastante inferior ao encontrado no mercado para a maioria dos espectrofotômetros multicanais, e indica, portanto, que o instrumento construído pode vir a ser uma alternativa econômica para diversas aplicações.

Como perspectivas, a adaptação de LEDs que emitam radiação em outras regiões do espectro visível e a implantação de um feixe de luz de referência poderão ampliar a faixa de aplicação e melhorar a precisão das medidas com o instrumento. O desenvolvimento de um algoritmo que permita a multiplexação dos sinais através da transformada de Hadamard pode melhorar também a relação Sinal/Ruído. Para possibilitar a aplicação do fotômetro em análises de campo, novos estudos poderão ser realizados empregando-se baterias como fonte de energia e um microcontrolador para o controle e aquisição de dados. Um novo instrumento, semelhante ao descrito neste trabalho, será desenvolvido pelo Grupo de Instrumentação e Automação em Química Analítica (GIA) da Unicamp para a realização de medidas na região do infravermelho próximo (NIR).

VI - Referências

1. COSCIONE, R. A.; ANDRADE, J. C.; POPPI, R. J.; MELLO, C.; VAN RAIJ, B. and ABREU, M.F.; **Multivariate calibration applied to a highly interfering chemical system: The determination of aluminium and iron in plants using xylenol orange and partial least-squares regression**; Anal. Chim. Acta, 2000, 423, 31-40.
2. EKLOV, T.; MARTENSON, P. and LUMDSTROM, I.; **Selection of variables for interpreting multivariate gas sensor data**; Anal. Chim. Acta, 1999, 381, 221-232.
3. DESPAGNE, F. and MASSART D. L.; **Neural Networks in multivariate calibration**, Analyst, 1998, 123, 157R
4. ARAÚJO, M. C. U.; SALDANHA, T. C. B.; GALVÃO, R. K. H.; YONEYAMA, T.; CHAME, C. H.; VISANI, V.; **The Successive projections algorithm for variable selection in spectroscopic multicomponent analysis**; Chemometrics and Intel. Lab. Systems, 2001, 57, 65.
5. HAUSER, P. C.; RUPASINGHE, T. W. T. and CATES N. E.; **A multi-wavelength photometer based on light-emitting diodes**; Talanta, 1995, 42, 4, 605-612.
6. PASQUINI, C.; RAIMUNDO JR; I. M.; **Um Fotômetro Simples Para Análise Por Injeção em Fluxo**; Química Nova, 1984, 24-28.
7. CANTRELL M. K. and INGLE J. D., **The Slim Spectrometer**, Anal. Chem., 2003, 75, 27-35.
8. GROS, N.; **spectrometer with microreaction chamber and tri-colour light emitting diode as a light source**; 2004, Talanta, 62, 143-150.

9. ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; **A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters**, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 409, 227-235.
10. LIU, H. and DASUPTA, P. K.; **Dual-wavelength photometry with light emitting diodes. Compensation of refractive index and turbidity effects in flow injection analysis**; *Anal. Chim. Acta*, 1994, 347-353.
11. LI, Q.; MORRIS, K. J.; DASGUPTA, P. K.; RAIMUNDO Jr., I. M. and TEMKIM, H.; **Portable flow-injection analyser with liquid-core waveguide based fluorescence, luminescence, and long path length absorbance detector**; *Anal. Chim. Acta*, 2003, 479, 151-165.
12. BROOK, T. E.; TAIB, M. N. and NARAYANASWAMY, R., **Extending the range of a fibre-optic relative-humidity sensor**, *Sens. Act. B*, 1997, 38-39, 272-276.
13. TROJANOWICZ, M. and SZPUNAR-LOBINSKA, J.; **simultaneous flow-injection determination of aluminium and zinc using LED photometric detection**; *Anal. Chim. Acta.*; 1990, 230, 125-130.
14. TROJANOWICZ, M. and SZPUNAR-LOBINSKA, J. and MICHALSKI, Z.; **Multicomponent analysis with a computerized flow injection system using LED photometric detection**; *Mikrochim. Acta*, 1991, 1, 159-169.
15. HAUSER P.C. and RUPASINGHE T. W. T., **Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer**, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 357, 1056-1060.
16. FLASCHKA, H.; McKEITHAN, C. and BARNES, R.; **Light emitting diodes and phototransistors in photometric modules**; *Anal. Lett.*, 1973, 6, 585.

17. www.chemetrics.com/v2000.htm, acessado em 22 de março de 2004.
18. LYDDY-MEANNEY, A. J.; ELLIS, P.S.; WORSFOLD, P.J.; Butler, E. C. V. and MCKELVIE, I. D.; **compact flow analysis system for surface mapping of phosphate in marine waters** , Talanta, 2002, 58, 1043-1053.
19. TODA, K.; DASGUPTA, P. K.; LI, J. and TARVER, G.A.; **Fluorometric Field instrument for continuous measurement of atmospheric hydrogen sulfide**, Anal. Chem. , 2001, 73, 5716-5724
20. DASGUPTA, P. K.; BELLAMY, H.S; LIU, H.; LOPEZ, J.L.; LOREE, E. L.; MORRIS. K.; PETERSEN, K. and MIR, K. A.; **Light emitting diode based flow-trought optical absorption detectors**, Talanta, 1993, 40, 53-74.
21. DASGUPTA, P. K.; EOM, I.; MORRIS, K. J. and LI, J.; **Light emitting diode based detectors. Absorbance, Fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-trough cell**, Anal. Chim. Acta, 2003, 500, 337-364.
22. FLOYD T. L.; **Electronic Devices**, Prentice Hall, New Jersey, 1996
23. SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**; trad. Ignez Caracelli, 5. Ed., Bookman, Porto Alegre, 2002.
24. ARAÚJO, M. C. U.; SANTOS, S. R. B.; SILVA, E. A. e VÉRAS, G.; **“Um fotômetro de fluxo para análises clínicas a base de um diodo emissor de luz bicolor”**, Quím. Nova, 1996, 20, 137-145
25. www.ledmuseum.org, acessado em 15 de abril de 2004.
26. www.superbrightleds.com, acessado em 15 de abril de 2004.

27. HILLEBRAND, S.; SCHOFFEN, J.R.; MANDAJI, M.; TERMIGNONI, C.; GRIENEISEN, H. P. H. and KIST, T. B. L.; **Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis**, *Electrophoresis*, 2002, 23, 2445-2448.
28. HAUSER, P. C.; RUPASINGHE, T. W. T.; LUCAS, C.C. and McCLURE, A.; **Process monitor for an ammoniacal nickel solution employing an infrared LED and a log-ratio amplifier**, *Analyst*, 1995, 120, 2635-2638.
29. PASQUINI, C.; RAIMUNDO JR; I. M.; **Um Fotômetro Simples Para Análise Por Injeção em Fluxo**; *Química Nova*, 1984, 24-28.
30. CANTRELL M. K. and INGLE J. D., **The Slim Spectrometer**, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 27-35.
31. GROS, N.; **spectrometer with microreaction chamber and tri-colour light emitting diode as a light source**; 2004, *Talanta*, 62, 143-150.
32. ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; **A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters**, *Anal. Chim. Acta*, 2000, 409, 227-235.
33. LIU, H. and DASUPTA, P. K.; **Dual-wavelength photometry with light emitting diodes. Compensation of refractive index and turbidity effects in flow injection analysis**; *Anal. Chim. Acta*, 1994, 347-353.
34. LI, Q.; MORRIS, K. J.; DASGUPTA, P. K.; RAIMUNDO Jr., I. M. and TEMKIM, H.; **Portable flow-injection analyser with liquid-core waveguide based fluorescence, luminescence, and long path length absorbance detector**; *Anal. Chim. Acta*, 2003, 479, 151-165.

35. BROOK, T. E.; TAIB, M. N. and NARAYANASWAMY, R., **Extending the range of a fibre-optic relative-humidity sensor**, *Sens. Act. B*, 1997, 38-39, 272-276.
36. TROJANOWICZ, M. and SZPUNAR-LOBINSKA, J.; **simultaneous flow-injection determination of aluminium and zinc using LED photometric detection**; *Anal. Chim. Acta.*; 1990, 230, 125-130.
37. TROJANOWICZ, M. and SZPUNAR-LOBINSKA, J. and MICHALSKI, Z.; **Multicomponent analysis with a computerized flow injection system using LED photometric detection**; *Mikrochim. Acta*, 1991, 1, 159-169.
38. HAUSER P.C. and RUPASINGHE T. W. T., **Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer**, *Fresenius_J. Anal. Chem.*, 1997, 357, 1056-1060.
39. SALDANHA, T.C.B. e ARAÚJO, M. C. U., **Análise multicomponente simultânea por espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS**, *Quím. Nova*, 1999, 22(6), 847-853.
40. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, S.M.; VOLPE, P. L. O., **"Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial"**, *Quím. Nova*, 1999, 22(5), 724-731.
41. BEEBE, K. R.; PELL, R. J. and SEASHOLTZ; **Chemometrics: a practical guide**; John Wiley, New York, 1981.
42. GELADI, P. and KOWALSKI, B. R.; **Partial least-squares regression: a tutorial**; *Anal. Chim. Acta*, 1986, 185, 1-17.

43. THANASOULIAS, N. C.; PILIOURIS, E. T.; KOTTI, M-S. E. and EVMIDRIS, N. P.; **Application of multivariate chemometrics in forensic soil discrimination based on the UV-Vis spectrum of the acid fraction of humus**; *Forensic Science International* 130 (2002) 73
44. ZAGATTO, E. A. G.; **Análises Químicas Multielementares em Sistemas FIA-ICP-GSAM e Classificações dos Solos do Estado de São Paulo**, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.
45. THANASOULIAS, N. C.; PARISIS, N. A. and EVMIDRIS, N. P.; **Multivariate chemometrics for the forensic discrimination of blue ball-point inks based on their Vis Spectra**; *Forensic Science International* 138 (2003) 75
46. BRODNJAK-VONEINA, D.; DOBENIK, D.; NOVIC, M. and ZUPAN, J.; **Chemometrics characterisation of the quality of river water**; *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 87.
47. SCARMINIO, I. S.; **Análises espectrométricas de águas minerais e suas classificações por meio de reconhecimento de padrões**; Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.
48. WOLD, S.; ESBENSEN, K. and GELADI, P.; **Principal component analysis**; *Chem. and Intel. Labor. Systems*; 1987, 2, 37-52.
49. MALCOME-LAWES, D. J.; **Microcomputers and laboratory instrumentation**; 2nd edition, Plenum Press, London, 1988.
50. www.rs-components.com, acessado em 21 de maio de 2004.

51. BRITO, V. O. and RAIMUNDO Jr., I. M.; **Simultaneous multiple injection in monosegmented flow analysis**; *Anal. Chim. Acta*, 1998, 371, 317.
52. MILLER, J.C. and MILLER, J.N.; **Statistics for Analytical Chemistry**; 3rd edition, Ellis Horwood, 1993.
53. KOMPANY-ZAREH, M.; MASSOUMI, A. and PEZESHK-ZADEH, S.; **Simultaneous spectrophotometric determination of Fe and Ni with xylenol orange using principal component analysis and artificial neural networks in some industrial samples**; *Talanta*, 1999, 48, 283.
54. SACORAGUE, L. A.; **Avaliação do uso de espectroeletróquímica na determinação simultânea de metais empregando métodos quimiométricos**; Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
55. TIKONOV, V. N.; **Complex formation of metal ions with xylenol orange**; *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 1986, 41(8), 1353.
56. BREITKREITZ, M. C.; RAIMUNDO Jr., I. M.; ROHWEDDER, J. J. R.; PASQUINI, C.; DANTAS FILHO, H. A.; JOSÉ, G. E. and ARAÚJO, M.C.U.; **Determination of total sulfur in diesel fuel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration**; *Analyst*, 2003, 128, 1204.
57. YUANKIAN, L.; JUNGMEI, H.; JINGGUO, Y.; BO, Z. and YUANQING, H.; **Multi-component analysis by flow injection-diode array detection-spectrophotometry using partial least squares calibration model for simultaneous determination of zinc, cadmium and lead**, *Anal. Chim. Acta*, 2002, 461, 181.

58. www.abinam.com.br, acessado em 3 de maio de 2004.
59. www.uniagua.org.br, acessado em 3 de maio de 2004.
60. SNELL, F. D.; **Photometric and fluorometric methods of analysis: Metals**; John Wiley and Sons, New York, 1972
61. ONISHI, H.; **Photometric determination of traces of metals**, 4th edition, Chemical analysis vol.3, Part II-A, John Wiley and Sons, New York, 1985.