

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica

Dissertação de Mestrado

Desenvolvimento de Um Espectrofotômetro
Multicanal para Análise Multivariada em Sistema de
Fluxo

Eduardo Osório de Cerqueira

Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

Abril de 1997

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

C335d Cerqueira, Eduardo Osório de
Desenvolvimento de um espectrofotômetro multicanal
para análise multivariada em sistema de fluxo / Eduardo
Osório de Cerqueira. -- Campinas, [SP : s.n.], 1997.

Orientador: Ronei Jesus Poppi

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química.

1. Quimiometria. 2. Espectrofotometria. 3. *Gra-
diente em fluxo. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Química.

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	
T.º	11/11/1997
C.º	335d
V.º	88
NUMERO B.º	31901
PROC.	281/94
C.º	D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/10/97
N.º UPS	CM 00104045-3

Dedico à minha mãe Zélia, e aos meus irmãos Ricardo e Alfredo, que acreditaram em mim e sempre me apoiaram em todos os momentos de minha vida.

**Àquela que será minha futura companheira,
com quem compartilharei meus dias.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ronei Poppi, pela orientação, por todo apoio e pela dedicação ao longo dessa jornada.

Aos professores Célio, Ivo, Jarbas e Adriana, por toda cooperação e amizade.

Aos amigos do laboratório de Instrumentação e Automação em Química Analítica. Paulo, Cleidiane, Henrique, Fernando, Bellato, Ileana, Maggie, Saliba, Jeferson, Renato Guchard, Carminha, Renato Sanches e Viviane, pela troca de idéias, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos dos laboratórios adjacentes. Fernanda, Roberta, Ailton, Soraya, Paulo Cesar, Raquel, Pedro, Raquel Sofia, Rosana, e Rose, entre outros, que provavelmente esqueci de citar, mas que foram tão importantes quanto, pela agradável convivência e amizade.

Ao instituto de Química e a seus funcionários, principalmente ao pessoal da oficina mecânica, pelo apoio técnico e prontidão.

À CAPES pela bolsa de estudo.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Aos amigos de outros institutos por todos os momentos agradáveis.

Aos amigos da república onde moro, pela convivência diária.

À Carol pela amizade e companheirismo, mesmo à distância.

Por fim a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a triunfar nessa jornada.

SUMÁRIO

Resumo		iv
Abstract		v
Introdução		01
Capítulo 1	Construção do espectrofotômetro com arranjo linear de fotodiodos	05
1.1	Funcionamento dos arranjos lineares de fotodiodos	05
1.2	Montagem	08
1.2.1	Parte óptica	11
1.2.2	Parte eletrônica e interfaceamento	13
1.2.3	Desenvolvimento do programa para o controle do espectrofotômetro	16
1.2.3.1	Saida e ajuda	18
1.2.3.2	Calibração de comprimentos de onda	18
1.2.3.3	Aquisição de espectros	20
1.2.3.4	Monitoramento de sistemas de análise por injeção em fluxo	22
1.2.3.5	Monitoramento de sistemas de fluxo contínuo	24
1.2.3.6	Controle de linha	24
1.2.3.7	Utilização da troca dinâmica de dados (DDE) do Windows para realizar a conversação entre o Visual Basic e o Matlab	25
1.3	Avaliação do espectrofotômetro	28
1.3.1	Avaliação da faixa espectral	28
1.3.2	Avaliação da possibilidade de realizar medidas fotométricas (Lei de Beer)	30
1.3.3	Avaliação da precisão	31

1.3.4	Avaliação da resolução	32
1.3.5	Avaliação do tempo de aquisição dos espectros	33
Capítulo 2	Sistema de fluxo	34
2.1	Gradientes gerados por dispersão em sistemas de fluxo	34
2.2	Construção do gradiente	36
2.3	Otimização do gradiente	39
2.3.1	Modelo de calibração multivariada utilizado para determinar os valores de pH em fluxo	42
2.3.2	Calibração espectrofotométrica entre as absorbâncias da misturas de indicadores e os valores de pH	44
2.3.2.1	Calibração com PCR	46
2.3.2.2	Calibração com o PLS	47
2.3.3	Previsão dos valores do gradiente de pH utilizando o modelo PCR linear	49
Capítulo 3	Calibração multivariada de ordem superior em sistema de fluxo	53
3.1	Introdução	53
3.2	Base algébrica	55
3.3	Teoria do modelo RA (Rank Annihilation)	56
3.4	Teoria do modelo GRAM (Generalized Rank Annihilation Method)	59
3.5	Validação dos modelos utilizados através de simulação computacional	65
3.5.1	Simulação de dados usando o RA (Rank Annihilation)	67
3.5.2	Simulação de dados usando o GRAM (Generalized Rank Annihilation Method) com transformação de similaridade	69

3.6	Aplicação dos modelos às superfícies de dados experimentais	72
3.6.1	Modelagem de dados experimentais com o RA (Rank Annihilation)	73
3.6.2	Modelagem de dados experimentais com o GRAM (Generalized Rank Annihilation Method) com transformação de similaridade	76
	Conclusão	86
	Perspectivas de trabalhos futuros	87
	Referências bibliográficas	88
	Apêndices	93
1	- Sub-rotina que executa a calibração temporal das estruturas de <i>loop</i> .	93
2	- Sub-rotina que gerencia a aquisição de espectros.	95
3	- Sub-rotina que gerencia a correção de luz de fundo.	100
4	- Sub-rotina que executa a DDE (Dinamic Data Exchange) entre o Matlab e o Visual Basic.	105
5	- Programa (em linguagem Matlab) do modelo RA.	106
6	- Programa (em linguagem Matlab) do modelo GRAM.	107
7	- Programa (em linguagem Matlab) para a primeira transformação de similaridade no modelo GRAM.	112
8	- Programa (em linguagem Matlab) para a segunda transformação de similaridade no modelo GRAM.	113

Resumo

Autor: Eduardo Osório de Cerqueira

Orientador: Ronei Jesus Poppi

Neste trabalho investigou-se a aplicação de métodos quimiométricos para a análise de dados multidimensionais (superfícies), obtidos em sistemas de fluxo por procedimentos que empregam um gradiente de concentração gerado por dispersão, e detecção espectrofotométrica multicanal por arranjo linear de fotodiodos. Essas técnicas podem possibilitar a análise mesmo na presença de interferentes com a necessidade de um reduzido número de padrões.

Para isso desenvolveu-se um espectrofotômetro multicanal com detecção por arranjo linear de fotodiodos que pudesse ser adaptado como unidade de detecção num sistema de fluxo. Tal espectrofotômetro possibilita a aquisição de espectros em tempo reduzido de modo a poder monitorar o gradiente de pH gerado.

Foi gerado um gradiente de pH em fluxo através da dispersão de fosfato de sódio em uma mistura de ácido bórico e ácido cítrico numa cela de homogeneização. O pH a cada instante foi monitorado através de calibração multivariada, a partir de espectros de uma série de indicadores ácido-base.

Foram obtidos no sistema de fluxo, espectros de soluções contendo fenolftaleína, timolftaleína, vermelho de metila e azul de bromotimol, individualmente e em misturas binárias ternárias e quaternárias. Utilizando o método generalizado de aniquilação de posto (GRAM) com transformação de similaridade, foram determinadas as concentrações, os perfis de concentração com o tempo e os espectros dos respectivos indicadores nas diversas misturas.

Abstract

Author : Eduardo Osório de Cerqueira

Adviser : Ronei Jesus Poppi

In this work was searched the application of chemometric methods for analysis of multiway data, obtained in flow systems that use a concentration gradient generated by dispersion, and multichannel spectrophotometric detection by photodiode array. These techniques can turn analysis even in presence of interference and with a reduced number of standards.

It was developed a multichannel spectrophotometer with photodiode array detection to be adapted as a detection unit in a flow system. This spectrophotometer make possible spectra acquisition in reduced times, being able to follow a generated pH gradient.

It was generated a pH gradient by sodium phosphate dispersion in a boric acid and citric acid mixture into a homogenization cell. The pH at each time was monitored by multivariate calibration, from the spectra of a set of acid-base indicators.

It was obtained in a flow system, spectra of solutions of phenolphthalein, thymolphthalein, methyl red and bromotymol blue, individually, and in mixtures of two, three and four indicators. By using the generalized rank annihilation method (GRAM) with similarity transformation, it was possible to determine the concentrations, the time concentration profile and the spectra of respective indicators in several mixtures.

Introdução

A análise em fluxo contínuo [1] é uma técnica analítica de reconhecido potencial e utilizada em um número cada vez maior de aplicações, seja no desenvolvimento de novas metodologias ou na adaptação das já existentes.

Uma maneira de aumentar ainda mais o potencial desta técnica analítica, principalmente para a análise de misturas mais complexas, é com a incorporação de detectores multicanais de varredura rápida, como os espectrofotômetros baseados em arranjos lineares de fotodiodos de silício (Diode array detector) [2]. Esse tipo de detector é capaz de adquirir um espectro completo na região do ultravioleta/visível em tempos da ordem de milisegundos, podendo facilmente monitorar eventos que ocorrem com o tempo.

Novas possibilidades muito atraentes podem ser abertas quando se aliam aos sistemas de fluxo com detecção multicanal, procedimentos que empregam um gradiente de concentração gerado por dispersão [3]. Esse princípio foi explorado por Betteridge e Fields [4], que analisaram misturas binárias de íons metálicos pela formação de complexos utilizando a dependência do pH na sua formação, com detecção espectrofotométrica clássica (sinais obtidos num único comprimento de onda). A chamada *Titulação em análise por injeção em fluxo* [5] é outra aplicação desenvolvida baseada na exploração de gradiente de concentração da amostra injetada. Neste caso, um ácido (ou base) é injetado num fluxo de base (ou ácido) e a zona dispersa desse ácido (ou base) é gradualmente neutralizado pela base (ou ácido), fornecendo informações sobre as espécies presentes a partir dos eventos que ocorrem no tempo.

A conjunção de sistemas de fluxo / Gradiente de concentração / Detecção multicanal é bastante complexa do ponto de vista da análise dos dados. Podem ser obtidas superfícies (tempo x comprimento de onda x absorbância) com vários máximos e mínimos. Um exemplo desse procedimento foi a realização de titulações simultâneas de ácidos orgânicos fracos, a partir das medidas dos espectros na região do ultravioleta, nas suas formas ácida e básica [6]. Devido à

necessidade de métodos mais sofisticados para a interpretação dos resultados obtidos, técnicas quimiométricas de calibração multivariada têm sido utilizadas [7].

É importante notar que só a partir da utilização de detectores multicanais em sistemas fluxo / gradiente de concentração, pode-se tirar proveito, com todas as vantagens conhecidas e testadas, das metodologias quimiométricas existentes. Não se obtém mais um único pico como resposta (sistema univariado clássico), e sim curvas ou superfícies que podem fornecer informações sobre várias espécies simultaneamente (sistema multivariado). Desta maneira, determinações multicomponente [8], compensação de interferentes [9] e detecção de amostras anômalas [10] puderam ser realizadas em sistemas de fluxo, de um modo muito mais simples e rápido.

Tem-se utilizado até esse momento, nas aplicações em sistemas de fluxo para determinações quantitativas, os procedimentos quimiométricos clássicos para calibração multivariada como o Método dos Mínimos Quadrados Parciais (*Partial least squares* - PLS) [11], a Regressão de Componentes Principais (Principal Component Regression PCR) [12] ou ainda a Regressão Linear Múltipla (RLM) [13]. Entretanto, essas metodologias não são totalmente adequadas para o tratamento das superfícies obtidas como resposta. O que tem sido realizado é uma transformação inicial nos dados de modo que possam ser utilizados pelos programas existentes.

Recentemente, novos métodos quimiométricos específicos para o tratamento de dados multidimensionais (tridimensionais ou maiores) começaram a aparecer na literatura química [14]. Aplicações têm surgido com a finalidade de efetuar modelagem teórica em cromatografia [15], estudos de poluição ambiental [16] e análise multivariada de imagens [17]. Para determinações quantitativas multicomponente foi adaptado por S. Wold *et. al.* [18] o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para sistemas multidimensionais, e desenvolvidos o Método Generalizado de Aniquilação de Posto (Generalized Rank Annihilation Method - GRAM) por Kowalski *et. al.* [19], e o método da Bilinearização Residual (Residual Bilinearization Method - RBL) por J. Öhman *et. al.* [20].

Neste trabalho pretende-se investigar a aplicação de métodos quimiométricos para a análise de dados multidimensionais (superfícies), obtidos

em sistemas de fluxo por procedimentos que empregam um gradiente de concentração gerado por dispersão, e detecção espectrofotométrica multicanal por arranjo linear de fotodiodos. Essas técnicas possibilitam a análise, mesmo na presença de interferentes, utilizando um reduzido número de padrões.

Para isso foi necessário construir um espectrofotômetro multicanal com detecção por arranjo linear de fotodiodos que pudesse ser adaptado como unidade de detecção num sistema de fluxo.

A construção do equipamento foi necessária porque os aparelhos comerciais disponíveis não apresentam a versatilidade necessária à obtenção de superfícies de resposta e posterior tratamento quimiométrico das mesmas. O desenvolvimento do equipamento, tanto a nível de instrumentação quanto a nível de programação, permite que o mesmo seja facilmente adaptado, o que dificilmente seria possível com um aparelho comercial. O primeiro capítulo deste trabalho descreve a instrumentação utilizada para a construção de espectrofotômetro, bem como os programas necessários para o controle do mesmo. Neste caso optou-se pela construção de um espectrofotômetro com leitura por arranjo linear de fotodiodos visando a aplicação a ser realizada, que exige rapidez de leitura e abrangência de todo o espectro visível. A leitura por arranjo linear de fotodiodos permite uma rápida e reprodutiva aquisição de espectros, visto que, não há movimentação do elemento dispersivo e a alternância entre os fotodiodos do arranjo linear pode ser feita por sinais externos provenientes de um computador. Os fatores limitantes são então, o tempo de resposta do arranjo linear de fotodiodos e a velocidade de processamento do microcomputador.

Recentemente tem-se dado grande atenção ao fenômeno de dispersão e a exploração prática do gradiente de concentração por ele gerado. No caso, o gradiente de concentração gerado altera o pH do meio de modo a promover reações e/ou equilíbrios químicos que dependem do pH, e desse modo servindo como mais um fator de separação de espécies. O segundo capítulo deste trabalho descreve a construção e otimização do sistema de fluxo utilizado, bem como do gradiente de pH gerado em fluxo.

Por fim, os métodos quimiométricos de calibração multivariada para dados de ordem superior conseguem quantificar amostras de uma mistura por

comparação entre a superfície de resposta da amostra em questão e a superfície de resposta gerada por padrões previamente estabelecidos. Estes padrões são submetidos às mesmas condições de análise da amostra desconhecida cujos constituintes se deseja quantificar. Desse modo pode-se realizar análises relativamente rápidas necessitando de um número reduzido de ensaios. O terceiro capítulo deste trabalho descreve toda a teoria dos modelos de calibração utilizados bem como a utilização dos mesmos para o tratamento de dados simulados (validação dos modelos) e experimentais.

Capítulo 1

Construção do espectrofotômetro com arranjo linear de fotodiodos

1.1- Funcionamento dos arranjos lineares de fotodiodos

Os arranjos lineares de fotodiodos são disponíveis em circuitos integrados compostos por um número de elementos fotossensíveis que varia entre 64 e 4096, sendo mais utilizados os de 512 e 1024 [21]. São preparados pela oxidação da superfície de um substrato tipo-n [22] de modo a produzir uma fina camada de óxido de silício cuja espessura varia entre 0,3 a 0,4 μm . Através de um processo fotolitográfico são abertas pequenas janelas lado a lado na camada do óxido, onde é difundido um semiconductor do tipo-p [22] de modo a formar junções p-n [22]. A figura 1.1 mostra um esquema da geometria de um arranjo linear de fotodiodos [23].

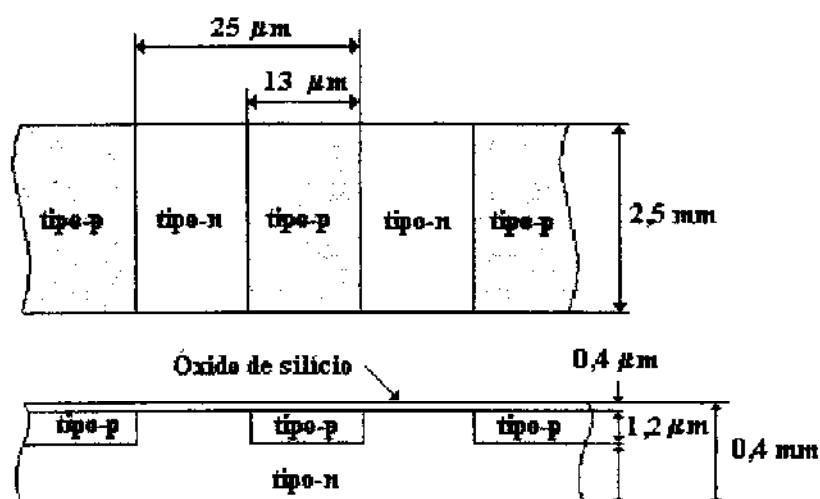


Figura 1.1- Esquema da geometria de um arranjo linear de fotodiodos

Os fotodiodos do arranjo linear apresentam detecção simultânea, mas sua leitura é realizada de maneira seqüencial. A leitura do arranjo é realizada através de dois sinais lógicos de nível TTL, denominados pulso de "clock" (baixo-alto-baixo) e pulso de "start" (baixo-alto-baixo). A cada fotodiodo é conectado um transistor-chave (transistor de efeito de campo), o qual é endereçado pelo circuito de varredura seqüencial.

No começo da leitura, o elemento capacitivo (diodo) está completamente carregado. As cargas são estocadas pela polarização reversa formada na junção p-n. A absorção de luz gera carregadores de carga (buracos na parte p e elétrons na parte n) que se combinam com as cargas armazenadas de polaridade oposta e as neutraliza. As cargas geradas na parte n são distribuídas igualmente entre as duas camadas p adjacentes. A perda de carga é medida durante o processo de leitura dos fotodiodos, através da corrente necessária para recarregar os "capacitores".

A figura 1.2 mostra a função de resposta de um arranjo de fotodiodos, onde a região de semiconductor do tipo-p é responsável por 52% da carga gerada, e 36% é proveniente da região de semiconductor de tipo-n adjacente [23].

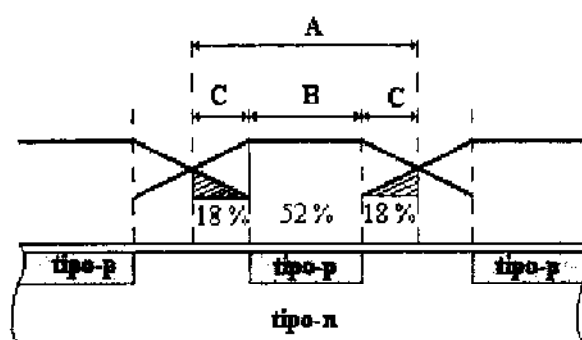


Figura 1.2 - Função de resposta idealizada de um fotodiodo do arranjo devido à radiação incidente sobre 25 μm a partir do centro do fotodiodo (A), fotodiodo (região-p) de 13 μm (B) e região-n da matriz de 6 μm (C)

A leitura do arranjo é iniciada com um pulso de "start" seguido por pulsos de "clock". A cada pulso de "clock", os transistores de efeito de campo (FET) são endereçados sequencialmente. No momento que o transistor associado ao fotodiodo é endereçado pelo circuito de varredura seqüencial (figura 1.3), o seu potencial de polarização inverte e a corrente que flui através do fotodiodo e do transistor (recarga do fotodiodo) aparece na saída de vídeo na forma de um sinal. Esse sinal é proporcional à quantidade de luz que incidiu no fotodiodo bem como do tempo de exposição ao qual o fotodiodo foi submetido. A figura 1.3 mostra um diagrama simplificado de um arranjo linear de fotodiodos. O capacitor mostrado nesta figura (conectado em paralelo ao fotodiodo) não é um componente físico, mas sim a representação da capacitância da junção p-n.

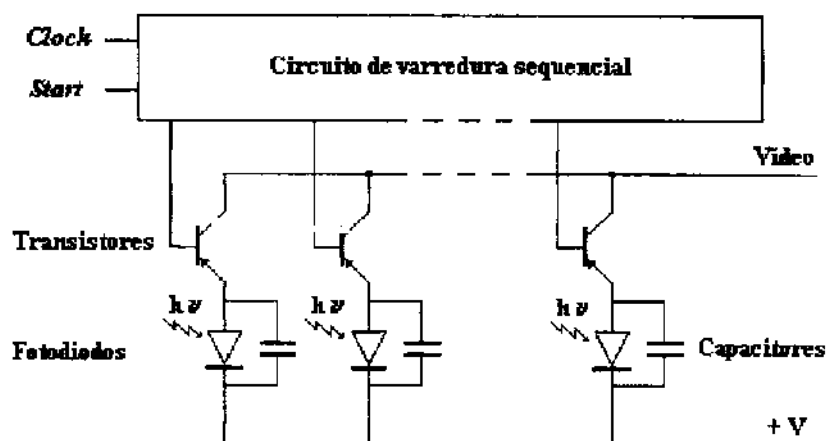


Figura 1.3 - Diagrama simplificado de um arranjo linear de fotodiodos

Uma vez obtido o sinal analógico, o mesmo é amplificado e extraído por um circuito amostrador / retentor ("sample / hold") e em seguida é digitalizado por um conversor A/D (analógico digital).

A utilização do arranjo linear de fotodiodos possibilita uma rápida aquisição de espectros, uma vez que não existe a necessidade de movimentação do elemento dispersivo (grade de difração). Isso faz com que esses dispositivos

sejam empregados em situações onde existe a necessidade de uma rápida aquisição de espectros, como no acompanhamento de reações e sistemas de fluxo [24].

1.2 - Montagem do Espectrofotômetro com Arranjo Linear de Fotodiodos

Na montagem do espectrofotômetro foi desenvolvido tanto o "hardware" (instrumento) quanto o "software" (programa) para o gerenciamento do aparelho. Desse modo conseguiu-se ter acesso a qualquer adaptação necessária na adequação do aparelho para diversas metodologias de análise espectrofotométrica em sistemas de fluxo.

Foi utilizado um monocromador (ORIEL, modelo 77400), "projetado" especialmente para ser utilizado em conjunção com arranjos lineares de fotodiodos. Este modelo é compacto (dimensões 15 cm x 15 cm x 7 cm), tem uma distância focal 12,5 cm e dispõe de uma rede de difração de 600 linhas/mm, sendo posicionado de modo a projetar a região do visível sobre o arranjo linear de fotodiodos. Juntamente com este monocromador foram utilizadas cabos de fibras ópticas de vidro, sendo uma delas com uma das extremidades retangular de dimensões 0,135 x 2,5 mm que é utilizada como fenda na entrada do monocromador. Em conjunção, foi utilizado um suporte para cubeta e uma fonte de luz regulável (tungstênio/halogênio) para a região do visível.

Um arranjo linear com 1024 fotodiodos, série - S, gerenciado por uma placa-mãe (EG&G Reticon, modelo RC1000) e uma placa-satélite (EG&G Reticon, modelo RC1001) foi utilizado como detector do espectrofotômetro. Este sensor

apresenta uma área sensível retangular de 2,56 cm de largura por 0,25 cm de altura, sobre a qual incide a luz proveniente do monocromador de modo que em cada fotodiodo do arranjo linear incide luz relativa a um pequeno intervalo de comprimentos de onda. Desse modo, com a óptica utilizada, o arranjo linear de fotodiodos praticamente abrange toda a região visível do espectro. A figura 1.4 mostra o aspecto físico do circuito integrado com o arranjo linear de fotodiodos.

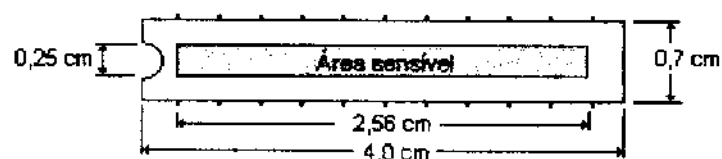


Figura 1.4 - Dimensões do chip que contém o arranjo linear de fotodiodos.

Os fotodiodos do arranjo linear utilizado (RL1024S) não apresentam a mesma sensibilidade em todo o espectro, por isso são necessárias rotinas de correção no tempo de integração (tempo de exposição à luz) para corrigir ou pelo menos minimizar esse comportamento. A figura 1.5 mostra a resposta espectral relativa dos fotodiodos do arranjo RL1024S [23]. A partir da figura 1.5 pode-se notar que os fotodiodos respondem mais intensamente na região entre 600 e 900 nm e praticamente não apresentam resposta em comprimentos de onda abaixo de 200 e acima de 1000 nm. Essa função de resposta foi fornecida pelo próprio fabricante do arranjo linear de fotodiodos.

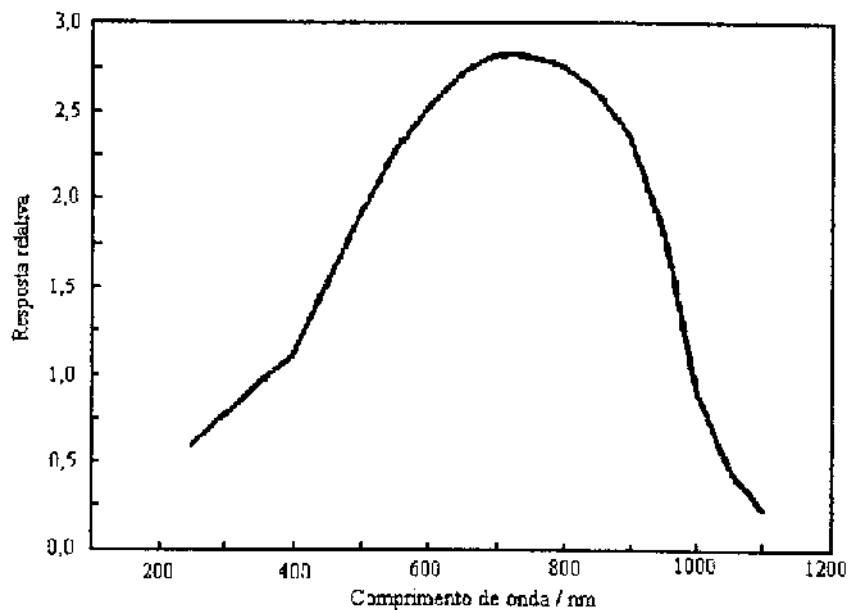


Figura 1.5 - Resposta espectral relativa do arranjo de linear de fotodiodos

O arranjo linear RL1024S utilizado, fabricado pela EG&G Reticon possui em seu circuito na verdade dois conjuntos de 1024 elementos idênticos alternados, sendo um deles exposto diretamente à luz através de uma janela de quartzo, e o outro mantido no escuro, não exposto à radiação (chamado "dummy"). De forma sequencial, a leitura dos fotodiodos é alternada por um pulso de "clock" e a cada mudança os fotodiodos geram um sinal transiente (ruídos). Este transiente é então facilmente eliminado por uma leitura diferencial entre o fotodiodo sensível a luz e o diodo "dummy" adjacente, pois o mesmo gera apenas o transiente (ele é insensível à luz). Isto é feito através de um circuito de integração diferencial encontrado na placa-mãe.

Os sinais de vídeo gerados são pré-processados analogicamente pelas placas de controle RC1000 (placa mãe) e RC1001 (placa satélite), fornecidas pelo fabricante do arranjo de fotodiodos. Um diagrama de blocos dessas placas é mostrado na figura 1.6. Essas duas placas possuem circuitos analógicos e digitais que são interligados separadamente, e por recomendação do fabricante, devem

ser mantidas o mais próximo possível para otimizar a relação sinal/ruído. A presença do circuito digital nas placas, possibilita ao usuário a utilização de pulsos de "clock" e "start" gerados por um oscilador de frequência variável ajustável manualmente através de uma série de chaves internas à placa. Para obter maior controle da leitura dos fotodiodos do arranjo, optou-se por gerar tais pulsos externamente através do computador associado a uma interface com conversor analógico / digital (A/D).

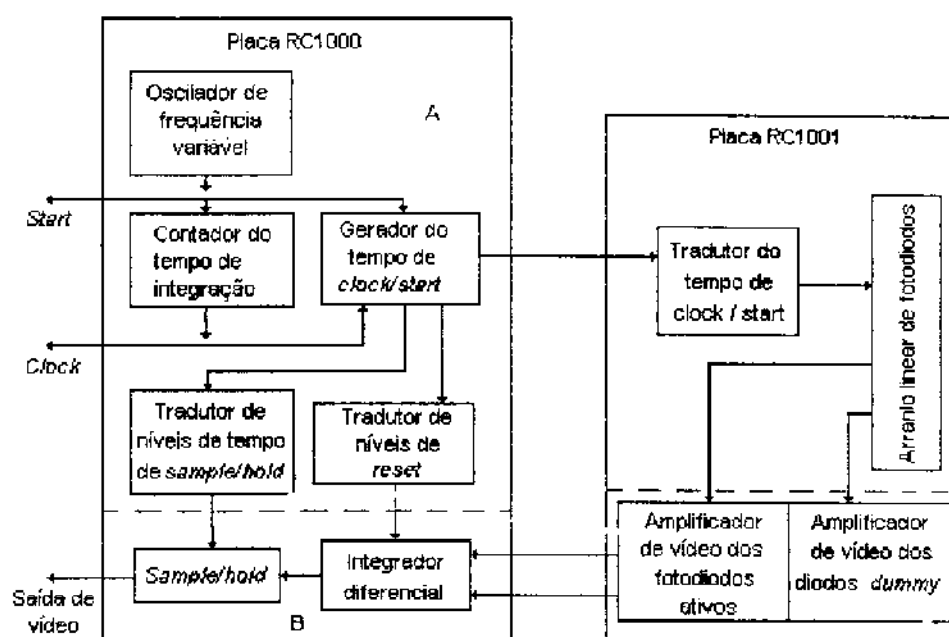


Figura 1.6 - Diagrama em blocos das placas RC1000 e RC1001. A linha tracejada divide a seção digital (A) da analógica (B).

1.2.1 - Parte óptica

Utilizou-se uma base de alumínio (1,00 cm de espessura) como mesa óptica, na qual foi fixado o monocromador sobre um suporte com altura regulável. O arranjo linear de fotodiodos foi colocado na placa-satélite presa a um posicionador com ajustes nas posições X-Y-Z, de modo a ajustar o arranjo de fotodiodos no plano focal do monocromador. Sobre essa mesma base foram

fixadas a placa-mãe e as fontes de alimentação para arranjo de fotodiodos e suas placas controladoras (+15V, -15V e +5V). A Figura 1.7 ilustra um esquema do posicionamento desses componentes.

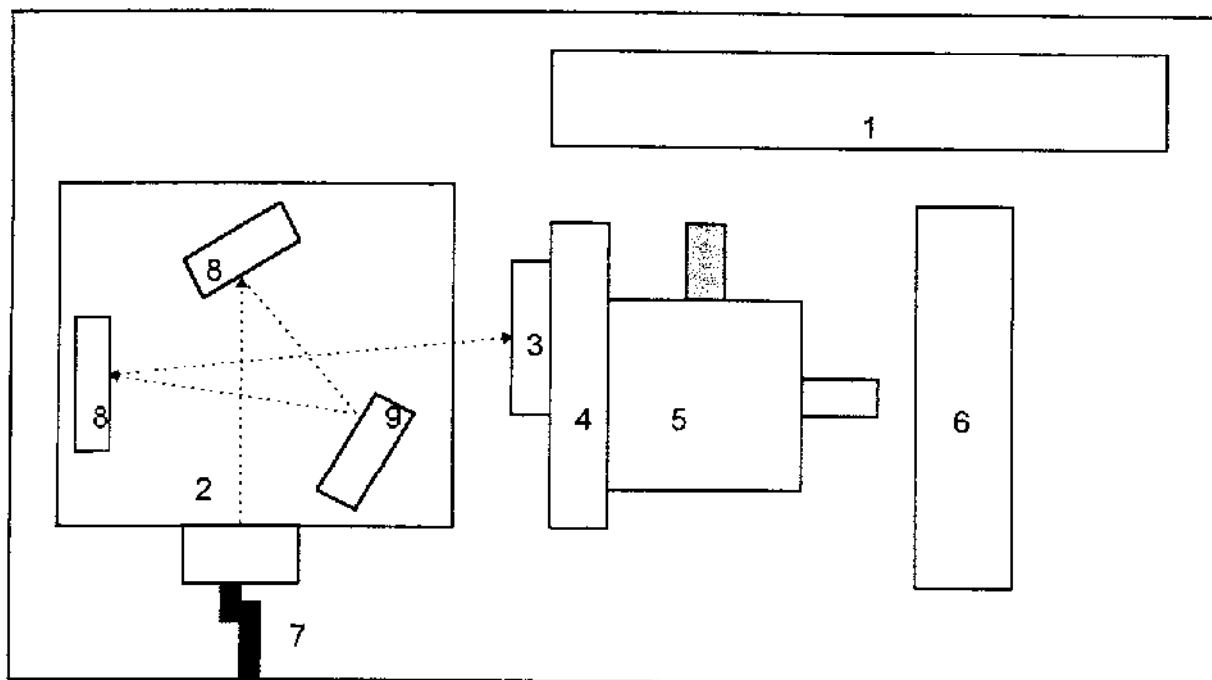


Figura 1.7- Esquema da montagem dos componentes do espectrofotômetro.

1. Placa-mãe controladora, 2. Monocromador, 3. Arranjo linear de fotodiodos, 4. Placa - satélite controladora, 5. Posicionador X-Y-Z, 6. Fontes de alimentação, 7. Fibra óptica, 8. Espelhos, 9. Grade de difração.

Um cabo de fibras ópticas é utilizado para conduzir a luz, proveniente de uma lâmpada de tungstênio/halogênio de 10 W, até uma cubeta de vidro (Hellma), posicionada num compartimento específico para acoplar os cabos de fibras ópticas. Após a luz passar pela cubeta, outro cabo de fibras ópticas (este com uma extremidade em forma de fenda) conduz a luz até o monocromador.

Um esquema geral da montagem final do aparelho é mostrado na Figura 1.8.

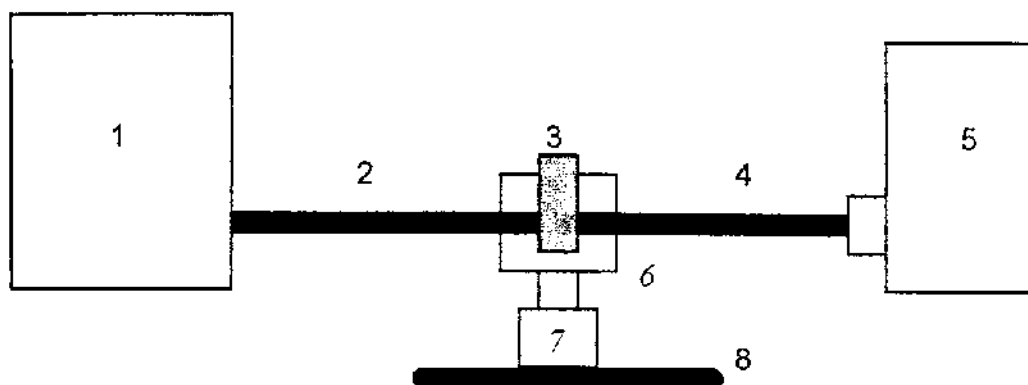


Figura 1.8 - Esquema da montagem dos componentes do sistema

1. Espectrofotômetro, 2. Cabo de fibra óptica com fenda na extremidade, 3. Cubeta, 4. Cabo de fibra, 5. Fonte de luz, 6. Suporte para Cabos de fibra óptica e cubetas, 7. Suporte, 8. Base de alumínio.

1.2.2 - Parte eletrônica e interfaceamento

A leitura do arranjo linear de fotodiodos envolve três etapas:

1. Varredura de inicialização - Um pulso de "start" e uma sequência de pulsos de "clock" carregam todos os "capacitores" associados aos fotodiodos do arranjo linear. É importante salientar que como a varredura dos fotodiodos é sequencial, os fotodiodos iniciais serão carregados primeiro que os seguintes, e isso acarretará em distorções no tempo de integração.

2. Tempo de integração - Aguarda-se um tempo suficiente para a luz incidente sensibilizar os fotodiodos. Utilizou-se tempos diferentes para diversas faixas de fotodiodos, pois os últimos fotodiodos, sensibilizados com luz na região do azul respondem menos intensamente que os primeiros fotodiodos, sensibilizados com luz na região do vermelho. Para as medidas de absorbância e transmitância foi utilizado um tempo de integração na forma de "escada" conforme mostrado na figura 1.9.

Como os pulsos internos do computador que controlam o relógio no ambiente de programas construídos em Visual Basic 3.0 [25] têm uma precisão de 1/18 segundos (baixa precisão nessa escala de tempo), optou-se por controlar o tempo em unidades de "loop". Um "loop" (estrutura de "FOR-NEXT") equivale ao tempo em que o computador executa as instruções "FOR" e "NEXT" sem nenhuma outra linha de comando entre eles. Isso ocorre muito mais rapidamente que os pulsos que regulam o relógio interno do computador (aproximadamente 5 μ s). A velocidade com que os "loops" são contados (executados) depende da velocidade de processamento do computador e da velocidade de "clock" interno do mesmo (geralmente medidos em MHz). Por isso foi necessário construir-se uma rotina de calibração temporal das estruturas de "loop". Essa rotina é inicializada junto com o programa que controla o espectrofotômetro e é mostrada no apêndice 1.

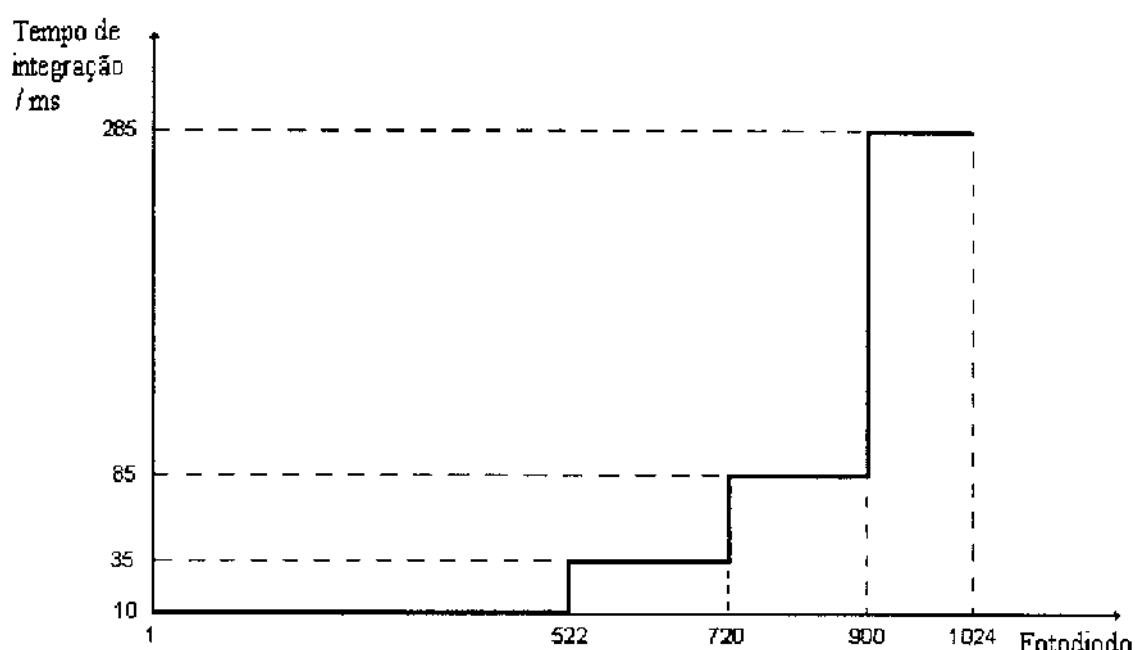


Figura 1.9 - Variação do tempo de integração em função do fotodiodo

Assim para os primeiros 522 fotodiodos, é esperado um tempo de 10 ms, para os fotodiodos 523 a 720 tem-se um tempo de integração de 35 ms, para os

fotodiodos 720 a 900 são esperados 85 ms e para os 124 últimos fotodiodos são esperados 285 ms. Isso permite uma boa sensibilidade em todos os fotodiodos do arranjo. Para medidas de intensidade pura (espectro de emissão) tem-se um tempo de integração constante para todos os fotodiodos, e controlado pelo usuário de modo a otimizar a intensidade do sinal (quanto maior o tempo de integração, mais intensamente os fotodiodos responderão).

3. Varredura de leitura - Novamente um pulso de “start” inicia o processo, e entre cada pulso da sequência de pulsos de “clock”, o sinal da saída analógica (placa-mãe) é amostrado, convertido para um sinal digital e transferido para o computador. Novamente tem-se uma distorção do tempo de integração na leitura dos fotodiodos, porém as duas distorções se anulam, desde que também seja simulada (e depois desconsiderada) uma leitura na varredura de inicialização.

Para o controle e aquisição de dados foi utilizada uma interface Advantech modelo PCL-711S [26], que possui um conversor analógico/digital de 12 “bits”, um conversor digital / analógico de 12 “bits” e 16 linhas de comunicação digitais de entrada/saída (I/O). Essa interface foi conectada em um “slot” de expansão de um microcomputador tipo IBM - PC 486 DX/2 66 MHz com 8 MHz de memória RAM. Um esquema das ligações entre a placa controladora do arranjo linear de fotodiodos, a interface e o microcomputador é mostrado na Figura 1.10.

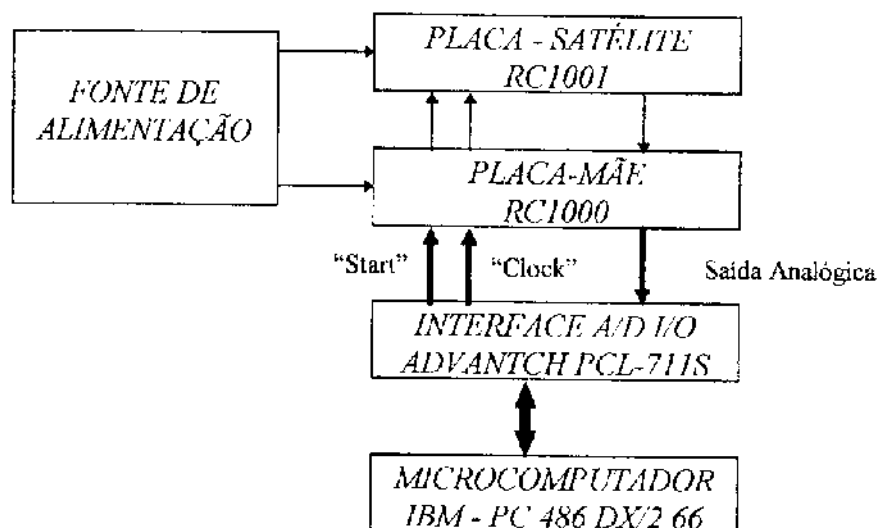


Figura 1.10 Diagrama esquemático da ligação entre o microcomputador, interface A/D, dispositivos de entrada e saída (I/O) e as placas controladoras do arranjo de fotodiodos.

1.2.3 - Desenvolvimento do programa para o controle do espectrofotômetro

O programa para o controle do espectrofotômetro foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 3.0 da Microsoft® para o ambiente Windows. Optou-se por utilizar essa linguagem devido à sua maior interatividade com o usuário, uma vez que trabalhando-se no ambiente gráfico do Windows existe a possibilidade da utilização de janelas, barras de menus, textos em diferentes fontes e cores assim como gráficos mais bem elaborados, além da possibilidade de importar dados, gráficos e figuras criados por outros programas para o Windows. A linguagem Visual Basic 3.0 é orientada por eventos (tais como o acionamento dos botões do *mouse*, entre outros) o que facilita a tomada de decisões por parte do usuário durante a execução do programa e, desse modo, a opção entre sub-rotinas dentro do mesmo. Outra vantagem da utilização do Visual Basic é que a quantidade de dados possível de ser manipulada está somente limitada à memória do

microcomputador. Este fato é bastante relevante para as aplicações a serem realizadas, onde pretende-se manipular arquivos com muitos espectros, sendo cada espectro uma leitura dos 1024 fotodiodos.

A principal dificuldade a ser enfrentada na programação com o Visual Basic é que não existem funções para o controle de baixo nível, como acesso a portas de comunicação e endereços de memória. Essa dificuldade foi contornada utilizando-se bibliotecas de acesso dinâmico (dynamic link library - DLL) do repositório de programas para Windows da Universidade de Indiana - Estados Unidos (<ftp.cica.indiana.edu>), acessados via Internet, denominada INPOUT.DLL. Esta biblioteca tem as funções INP (para ler dados em um endereço de memória) e OUT (para enviar dados a um endereço de memória). Também foi necessário o desenvolvimento de uma DLL em linguagem Visual C++ 2.0 [27] para desabilitar dispositivos periféricos (que é utilizada em casos onde se requer precisão temporal). Essa rotina em Visual C++ é necessária porque o ambiente Windows por ser multi-tarefa fica susceptível à interrupções produzidas pelo *mouse*, teclado e demais periféricos. Durante uma estrutura de repetição do tipo "FOR - NEXT" essas interrupções não são consideradas, porém o computador fica atualizando a posição do cursor na tela, e isso causa uma perda do sincronismo temporal.

Na tela de abertura do programa gerenciador do espectrofotômetro desenvolvido, intitulado "Fenix Manager", encontra-se uma barra de menus, com as seguintes opções: Exit, Calibration, Spectrum, FIA, Continuous Flow, Line Control e Help. A figura 1.11 mostra a tela de abertura do programa que controla o espectrofotômetro.

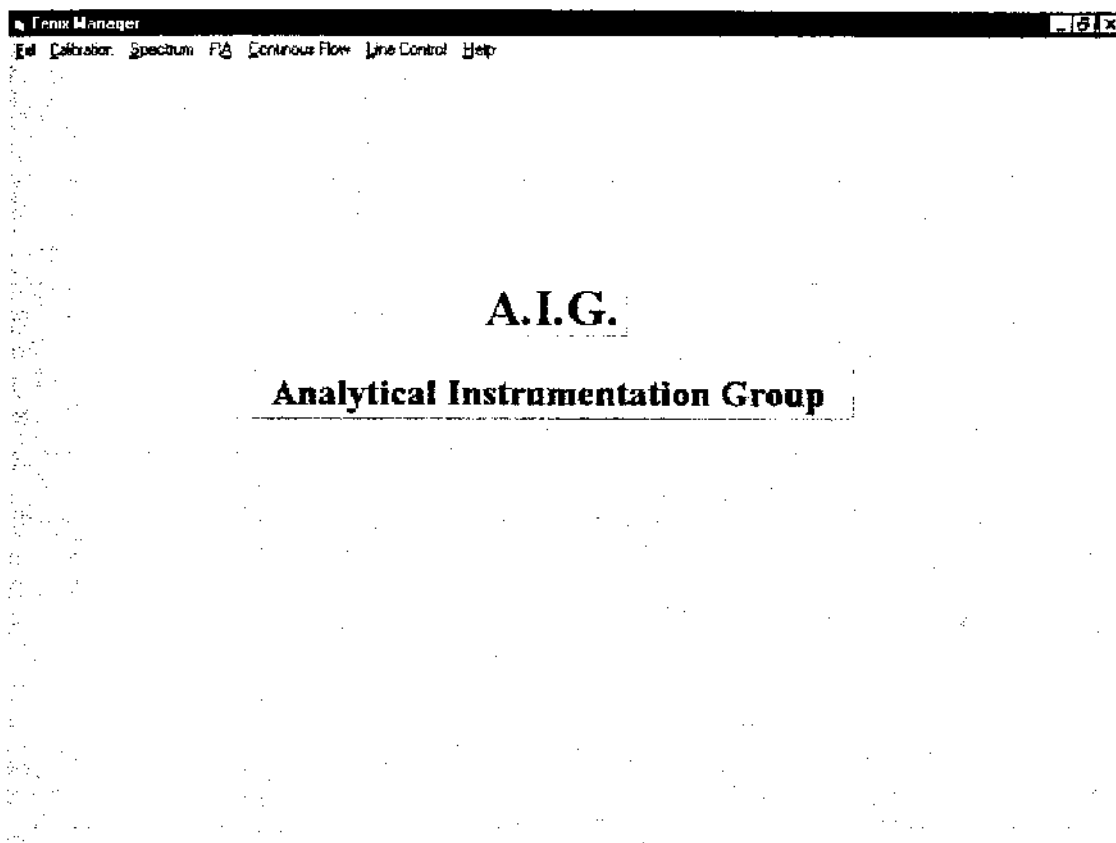


Figura 1.11 - Tela de abertura do programa "Fenix Manager", que controla o espectrofotômetro

1.2.3.1 - Saída e ajuda

A opção "Exit" acessa uma sub-rotina que desliga o programa, e a opção "Help" mostra as funções básicas do equipamento.

1.2.3.2 - Calibração de comprimentos de onda

A opção "Calibration" habilita uma janela com ferramentas (sub-rotinas) que permitirão ao usuário calibrar a faixa de comprimentos de onda na qual o aparelho irá realizar leituras. A figura 1.12 mostra a tela da sub-rotina que controla a calibração de comprimentos de onda no espectrofotômetro.

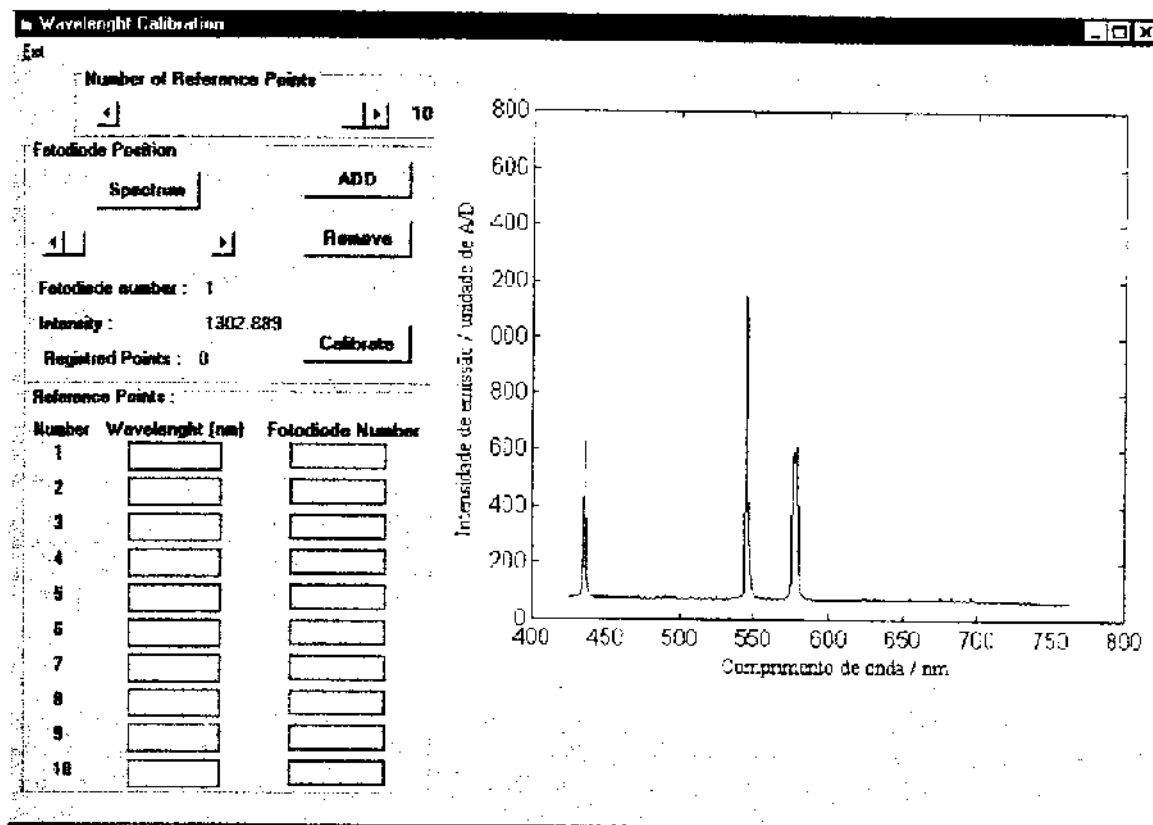


figura 1.12 - Subrotina de calibração de comprimentos de onda.

A calibração é realizada a partir da obtenção de um espectro cujos comprimentos de onda são conhecidos na faixa em que se deseja trabalhar (picos de um espectro da luz emitida por vapor de mercúrio por exemplo). Após a incisão dessa fonte de luz, o usuário deve habilitar a rotina que executa a leitura de calibração, e então entrar com os dados referentes a posições dos pontos que se conhece na faixa a ser utilizada.

Para concluir a calibração, o usuário deve habilitar a rotina que executa uma regressão linear (método dos mínimos quadrados) entre o número do fotodiodo que realizou a leitura de um determinado ponto, e o valor de comprimento de onda conhecido para esse ponto, em todos os pontos inseridos pelo usuário (de 2 a 10). Essa mesma rotina, calcula por extrapolação o valor de comprimento de onda do

primeiro e do último ponto, e os salva em um arquivo chamado "paramet.txt" que será acessado pelo programa toda vez que se necessitar da escala de comprimentos de onda.

1.2.3.3 - Aquisição de espectros

O programa "Fenix Manager" permite a utilização do instrumento como um espectrofotômetro convencional através da opção "Spectrum", a qual habilita uma janela com definições de parâmetros e opções para a aquisição de espectros de intensidade (emissão), absorbância e transmitância. A figura 1.13 mostra a janela referente a essa sub-rotina.

Entre esses parâmetros, o usuário define a faixa de comprimentos de onda a ser utilizada, o título e condições experimentais da leitura, o tempo de exposição dos fotodiodos à luz (tempo de integração), a utilização de filtro digital e/ou correção de linha de base e o tipo de espectro a ser utilizado. O filtro digital é na verdade uma média móvel entre os pontos do espectro [28]. A correção de linha de base é realizada subtraindo-se o valor da média dos dez menores valores do espectro no espectro total, desse modo há um deslocamento de todo o espectro. Essa opção só deve ser utilizada quando houver realmente necessidade, para não comprometer a resposta do espectro. Quanto ao tipo de espectro, pode-se analisar espectros de intensidade (emissão), absorbância e transmitância.

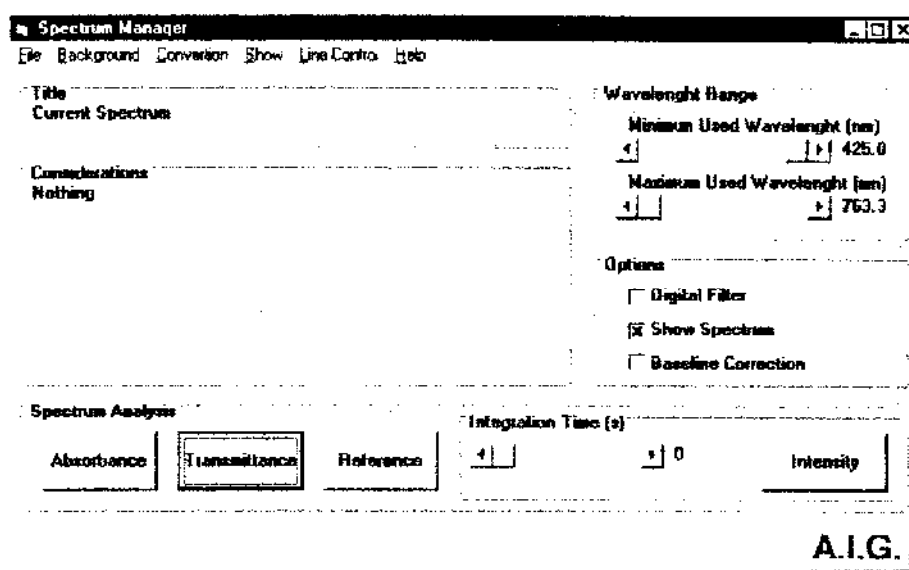


figura 1.13 - Janela de controle do espectrofotômetro.

Os arquivos gerados pelas leituras do espectrofotômetro apresentam além das medidas dos fotodiodos, todas as informações definidas pelo usuário relativas ao espectro medido. A janela mostrada na figura 1.13 apresenta também opções de manipulação desses arquivos, tais como: salvar, carregar ou imprimir um espectro.

Antes da realização de qualquer leitura, o usuário deve certificar-se de que o aparelho não esteja recebendo nenhuma luz externa (bloqueando a entrada do cabo de fibras ópticas) e deve habilitar a rotina de "Background", que desconta a luz espúria de todas as medidas subsequentes. Esta rotina também desconta os *bits* relativos a parte negativa da leitura, uma vez que o conversor analógico/digital utilizado é bipolar e utiliza 10^{11} bits para a parte negativa.

As subrotinas em Visual Basic que controlam a aquisição de espectros e de correção da leitura de fundo (luz espúria e parte relativa aos valores negativos de conversão A/D) são mostrados nos apêndices 2 e 3 respectivamente.

A opção "Conversion" converte os espectros de absorbância em transmitância e vice-versa.

A opção "Show" habilita outra janela que mostra os espectros medidos. O gráfico dos espectros é feito em Matlab e depois transmitida ao programa em Visual Basic 3.0 através de uma DDE (Dynamic Data Exchange) conforme será explicado posteriormente.

A opção "Line Control" acessa outra janela que controla a linha de fluxo conforme também será explicado posteriormente.

1.2.3.4 - Monitoramento de sistemas de Análise por Injeção em Fluxo

Outra opção do programa de gerenciamento do equipamento é a utilização do mesmo como sistema de detecção em análise por injeção em fluxo (FIA) [29]. A opção "FIA" da barra de menu da janela de abertura do programa habilita uma janela com definições dos parâmetros e opções para esse tipo de aplicação. A figura 1.14 mostra a janela com as opções para controlar um sistema de análise por injeção em fluxo.

Para tal intento, o usuário deve especificar parâmetros do espectro, tais como a faixa de comprimentos de onda a ser utilizada, o título e condições experimentais da leitura, a utilização de filtro digital e/ou correção de linha de base e o tipo de espectro a ser utilizado. Além disso, deve-se especificar os parâmetros do sistema FIA, ou seja, o tempo de injeção, o intervalo temporal entre a injeção e o início das leituras dos espectros, o número de espectros a serem obtidos, o intervalo temporal entre esses espectros e a vazão das tubulações. Deve-se realizar a correção de luz espúria, de maneira idêntica a usada na rotina que

gerencia o espectrofotômetro convencional.

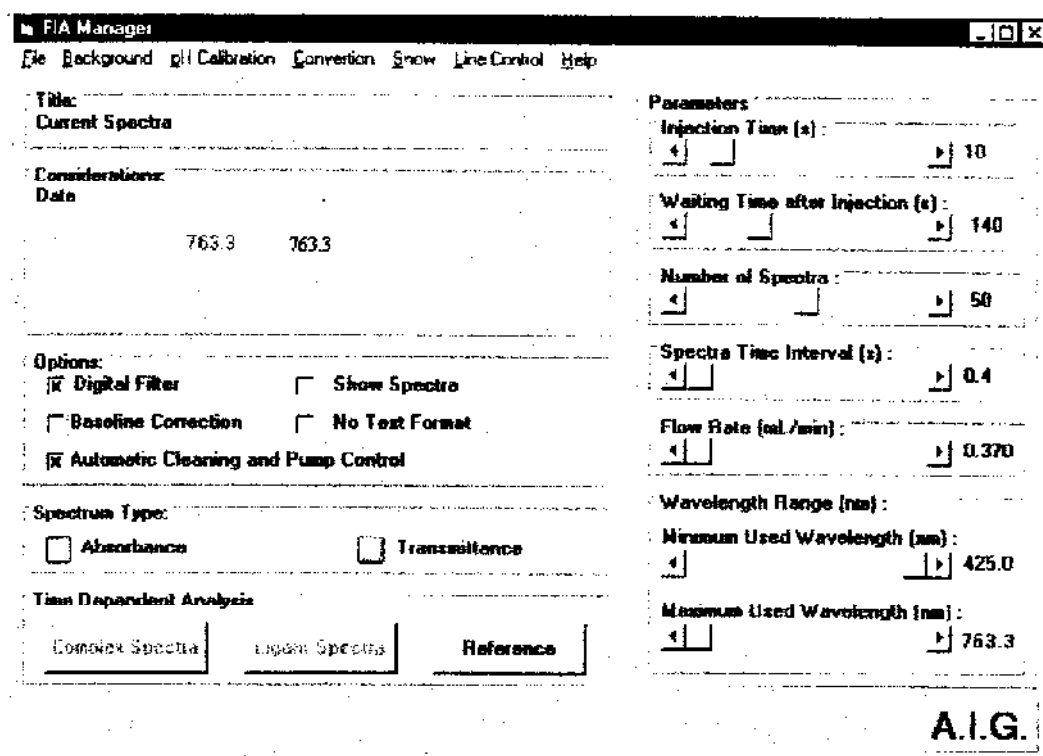


Figura 1.14 - Janela da subrotina que controla o sistema FIA

Como resposta desse tipo de aplicação, tem-se uma superfície de absorbância (ou transmitância) em função do comprimento de onda e do tempo em que as leituras foram realizadas.

Novamente tem-se opções para a manipulação dos arquivos gerados, que permitem mostrar, converter, salvar, carregar ou imprimir as superfícies de dados gerados.

1.2.3.5 - Monitoramento de sistemas de fluxo contínuo

Existe uma opção para o monitoramento de eventos que ocorrem com o tempo, como reações químicas ou equilíbrios que dependam de um gradiente gerado em fluxo.

A opção que habilita essa rotina cria uma janela análoga à janela para o gerenciamento de sistema FIA, exceto que nesse caso não existe uma injeção, mas sim uma permutação de fluxo entre duas soluções distintas. Os demais parâmetros e opções, são idênticos. A figura 1.15 mostra a janela com opções para o controle do sistema de fluxo contínuo.

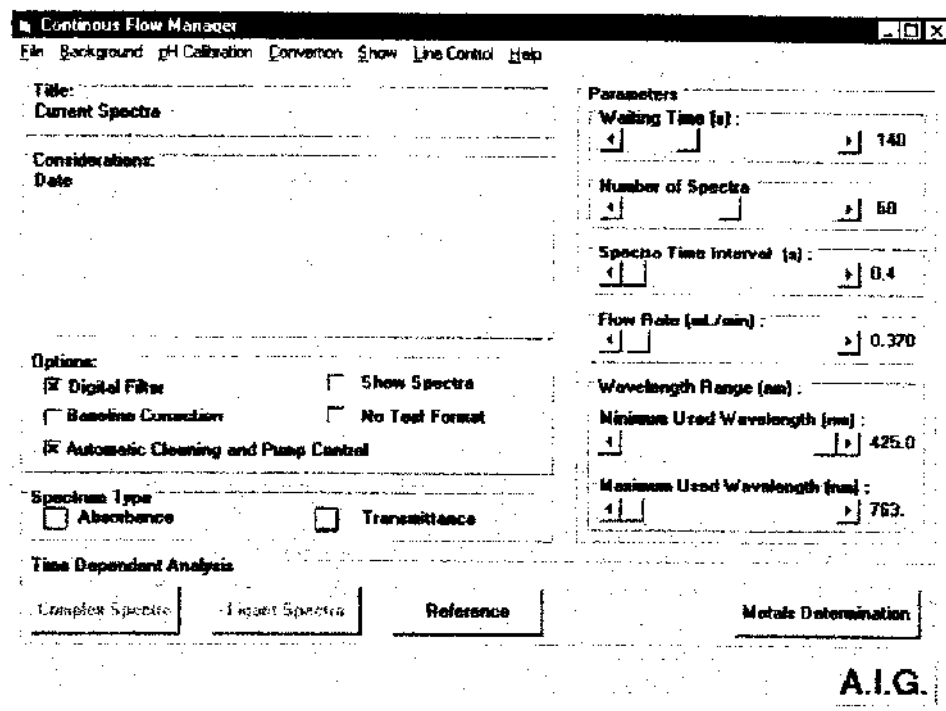


Figura 1.15 - Janela com opções para o controle do sistema de fluxo contínuo.

1.2.3.6 - Controle de linha

Essa opção habilita uma janela com rotinas que permitem ao usuário controlar a bomba peristáltica utilizada (Ismatec IPC) acoplada ao espectrofotômetro através de uma comunicação serial do tipo RS232 [30]. Dentre os parâmetros da bomba peristáltica que podem ser controlados nessa rotina estão a vazão e o controle liga/desliga. A janela com opções para o controle de linha é mostrada na figura 1.16.

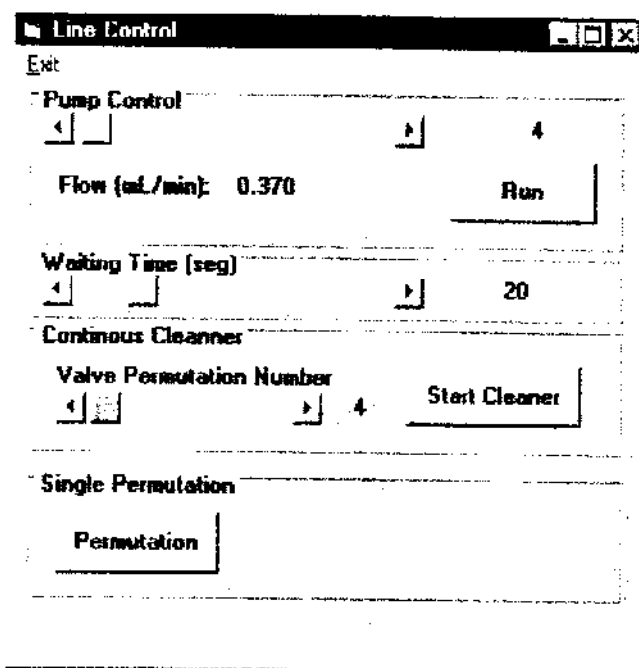


Figura 1.16 - Janela com opções para o controle da bomba peristáltica e da(s) válvula(s) solenóide.

Também encontra-se nessa janela, o controle sobre a(s) válvulas solenóides que controlam a injeção (no caso do sistema FIA) ou a simples permutação (no caso do sistema de fluxo), bem como uma opção para limpeza da tubulação, através de aberturas e fechamentos sucessivos da(s) válvula(s) solenóide(s).

1.2.3.7 - Utilização da Troca dinâmica de dados (DDE) do Windows para realizar a conversação entre o Visual Basic e o Matlab

Para a visualização e impressão dos espectros foi utilizada uma das propriedades existentes no ambiente Windows, que é a possibilidade de realizar a chamada "troca dinâmica de dados" (Dynamic Data Exchange - DDE) [31] entre o Visual Basic e o Matlab 4.2 [32].

O ambiente Windows é caracterizado por ser multi-tarefa, ou seja, vários aplicativos podem ser executados simultaneamente. A "troca dinâmica de dados"

(DDE) é um mecanismo existente no sistema operacional Windows 95, que torna possível que duas aplicações que estejam sendo executadas simultaneamente "conversem" uma com a outra continuamente, trocando dados e executando funções. A DDE automatiza operações manuais, sendo muito interessante sua utilização em casos onde possam ser utilizados recursos disponíveis num aplicativo que não se encontram em outro. Desta forma, desenvolveu-se o programa para o controle do espectrofotômetro utilizando-se o Visual Basic e para a apresentação dos gráficos, impressão e realização de cálculos avançados, foi utilizado o Matlab por possuir muitos recursos gráficos e de cálculo que dificilmente poderiam ser implementados pelo Visual Basic.

O Matlab (Matrix Laboratory) [32] é um ambiente computacional de alta performance em computação numérica e visualização de dados, onde podem ser realizados cálculos matemáticos com matrizes de qualquer grandeza (a princípio limitado apenas pela memória do computador) de modo que o mesmo é facilmente utilizável para cálculos quimiométricos. O Matlab integra análise numérica, computação matricial, processamento de sinais e visualização gráfica em um ambiente que possui comandos similares aos utilizados em álgebra linear, inclusive no que se refere à notação dos comandos.

O sistema de representação gráfica do Matlab possui uma variedade de sofisticadas técnicas de apresentação e visualização de dados, inclusive objetos gráficos, tais como, gráficos de linhas e de superfície, cuja aparência pode ser controlada ajustando os valores das propriedades desses objetos.

O Matlab apresenta também a capacidade de executar programas, desenvolvidos em linguagem própria, que permitem a utilização seqüencial de

qualquer função do Matlab (funções internas), ou de outras subrotinas geradas anteriormente.

A versão 4.2 do Matlab (ou superior) também possui a capacidade de realizar a troca dinâmica de dados (DDE), podendo assim comunicar-se internamente com outros aplicativos que possuam essa habilidade. A visualização de espectros, por exemplo, é na verdade a execução de um sub-programa feito em linguagem própria do Matlab. O apêndice 4 mostra a rotina que executa a DDE e mostra o gráfico dos espectros.

No programa desenvolvido para o controle do espectrofotômetro, o Visual Basic carrega o Matlab, e este fica em segundo plano, ou seja, minimizado pelo Windows. A aquisição de dados, como já mostrado, é realizada por rotinas desenvolvidas para o Visual Basic. Após esta aquisição, os dados são gravados em um RAM-drive, e carregados automaticamente para o Matlab, que gera o gráfico para a apresentação do espectro. A figura correspondente ao gráfico criado pelo Matlab, é então transferida para o Visual Basic (via DDE), onde uma nova janela é aberta para mostrá-la. A figura 1.17 mostra o gráfico de uma superfície de resposta gerada pela DDE entre o Matlab 4.2 e o Visual Basic 3.0.

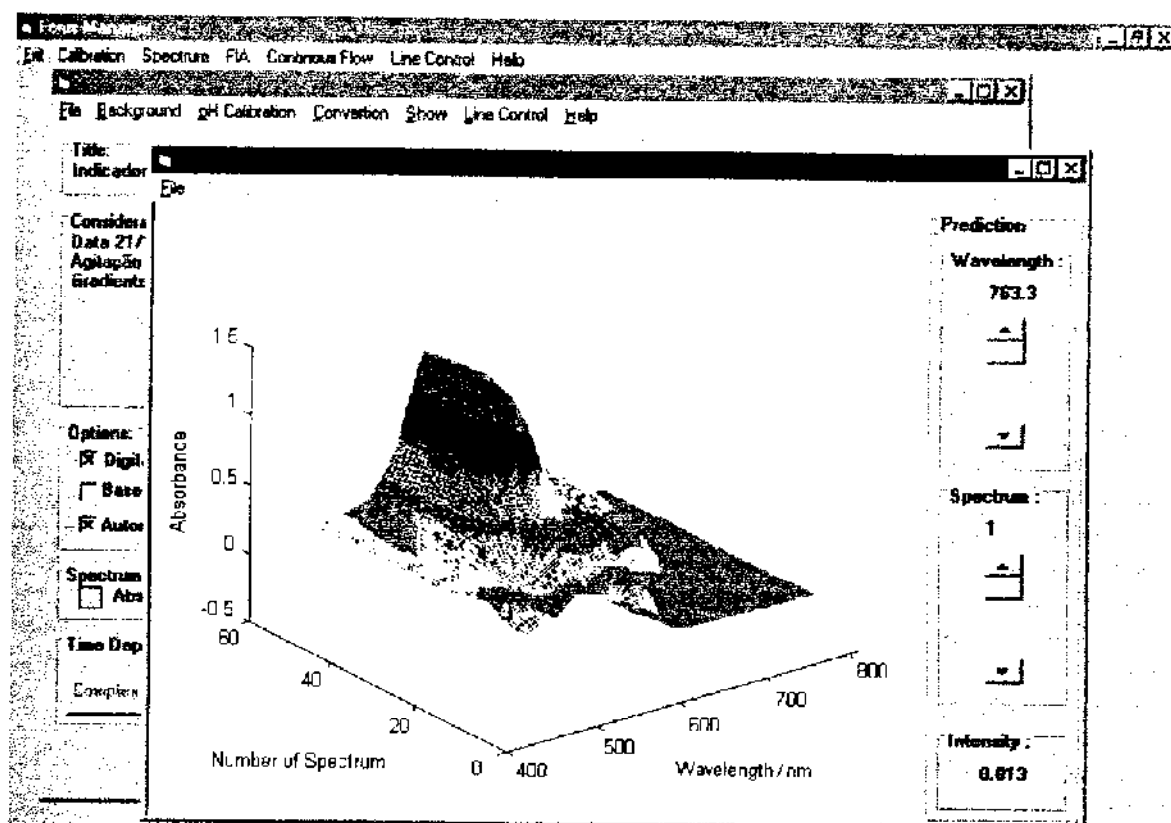


figura 1.17 - Utilização de DDE entre o Visual Basic e o Matlab para a visualização de uma superfície de resposta.

1.3 - Avaliação do espectrofotômetro

Após a construção do espectrofotômetro, sua performance foi avaliada conforme recomendado pela ASTM (American Society for Testing Materials) [33] no que se refere à faixa espectral, possibilidade de realizar medidas fotométricas, precisão, resolução e tempo mínimo possível para obtenção reprodutível de um espectro.

1.3.1 - Avaliação da faixa espectral

A faixa de comprimentos de onda acompanhada com a presente configuração óptica, foi determinada pela calibração de quatro picos de uma

lâmpada de mercúrio [33] aos respectivos fotodiodos, através de uma regressão linear. Dessa forma obteve-se que a faixa de comprimentos de onda acompanhada corresponde de leituras de 425,0 nm até 763,3 nm, ou seja, igual a 338,3 nm.

A figura 1.18 mostra o espectro de emissão de uma lâmpada de mercúrio na região do visível, com o qual foi calibrado os comprimentos de onda do espectrofotômetro. É possível verificar que existem picos nos comprimentos de onda 579,07; 576,96; 546,07 e 435,84 nm [33]. Com esses dados fez-se um ajuste linear de modo a calibrar os fotodiodos do arranjo linear com os respectivos comprimentos de onda. O comprimento de onda é dado pela equação de regressão linear

$$\lambda \text{ (nm)} = 764,3 - 0,992 \times (\text{número do grupo de fotodiodos}),$$

cujo coeficiente de correlação é de 0,99999

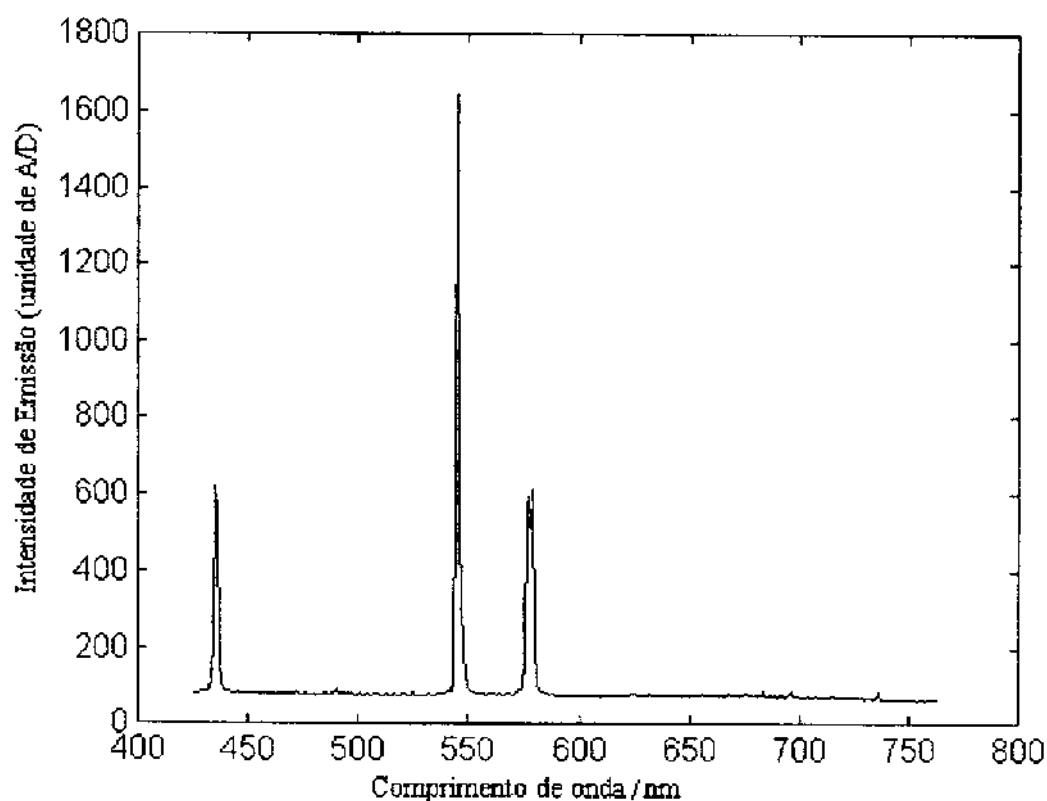


Figura 1.18 - Espectro de Emissão (parcial) de uma lâmpada de mercúrio

1.3.2 - Avaliação da possibilidade de realizar medidas fotométricas (Lei de Beer)

Para estudar a dependência da absorbância com a concentração (lei de Beer) foram amostrados espectros de 15 soluções de KMnO_4 numa faixa de 0 a $4,08 \times 10^{-3}$ mol/L, preparadas por diluição de uma solução estoque preparada conforme a referência bibliográfica 34, em diversas concentrações (inclusive nula). Os espectros das soluções de KMnO_4 são mostrados na figura 1.19.

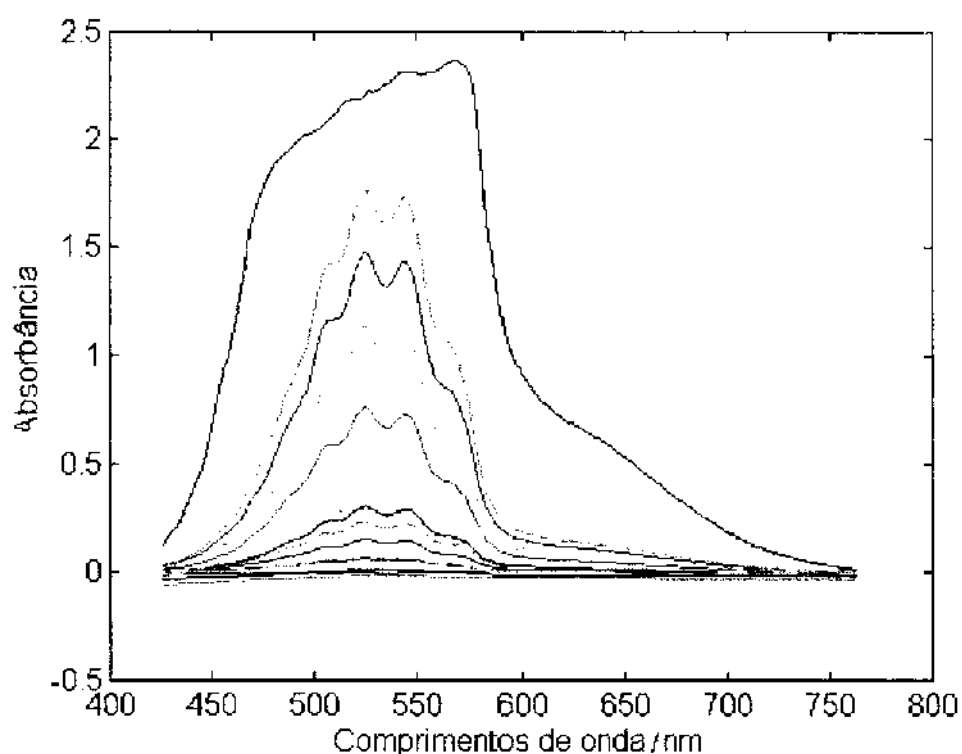


Figura 1.19 - Espectros de uma série de soluções de KMnO_4 .

O espectrofotômetro construído só apresentou resposta linear numa faixa de 12 soluções de KMnO_4 com concentrações variando entre $8,16 \times 10^{-4}$ mol/L a $1,30 \times 10^{-5}$ mol/L, ou seja, numa faixa de resposta de 0,012 a 1,756 unidades de absorbância. O critério usado para a escolha da faixa de comportamento linear foi o valor do coeficiente de correlação linear (R) do ajuste entre os valores de

absorbância (em 524,5 nm) e as respectivas concentrações das soluções de permanganato de potássio. Para essa faixa de concentração (12 soluções de KMnO_4) obteve-se uma regressão linear com coeficiente de correlação igual a 0,999. A figura 1.20 mostra o ajuste linear entre as concentrações das soluções de permanganato de potássio e os respectivos valores de absorbância em 524,5 nm.

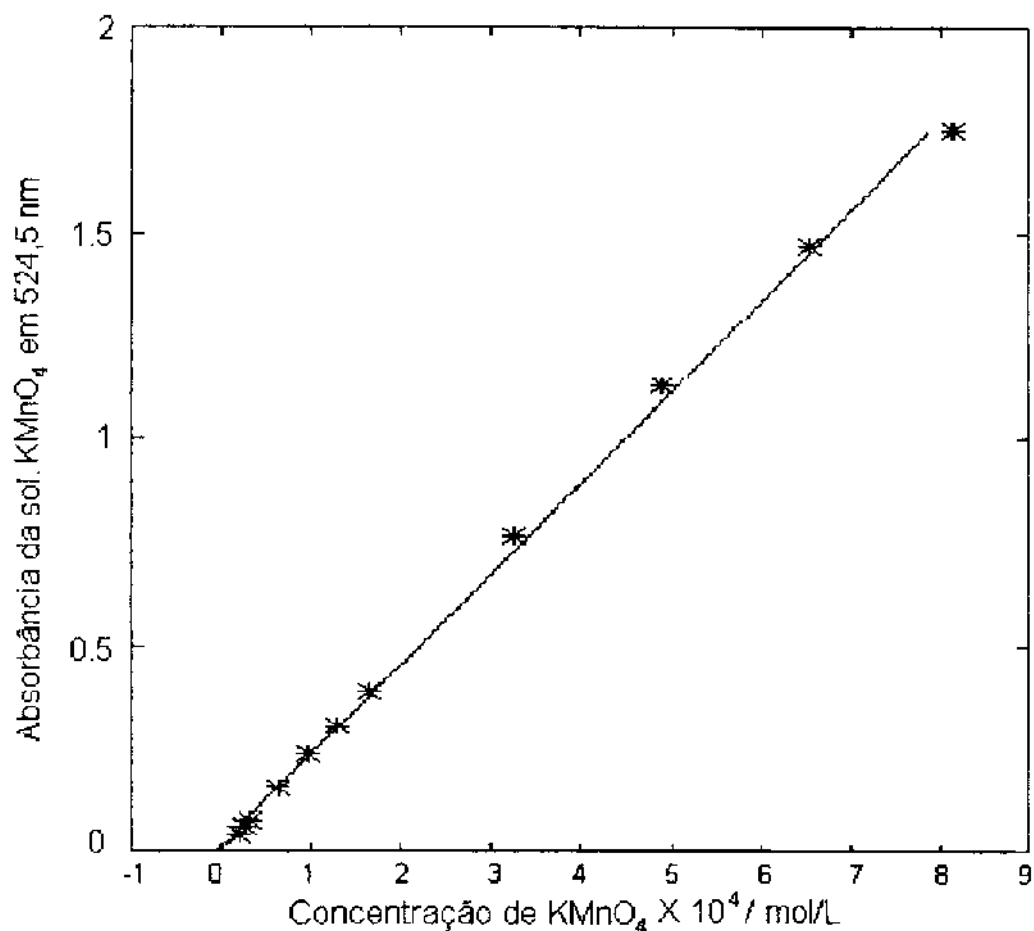


Figura 1.20 - Ajuste linear entre as concentrações e as absorbâncias das soluções de KMnO_4 medidas em 524,5 nm.

1.3.3 - Avaliação da precisão

A precisão do instrumento foi avaliada tomando-se a estimativa conjunta do desvio padrão de 20 medidas de absorbância de soluções de KMnO_4 , em 12 concentrações distintas. Obteve-se uma estimativa para o erro padrão igual a

0,003 unidades de absorvância, que considerando a faixa amostrada, encontra-se dentro dos padrões normalmente encontrados nos espectrofotômetros.

1.3.4 - Avaliação da resolução

A resolução em detectores por arranjos lineares de fotodiodos é estimada pela dispersão recíproca, que representa uma medida de quanto o espectro espalha-se por unidade de diodo [35,36]. Uma vez que a faixa de comprimentos de onda analisada é de 338,36 nm, e se espalha por 1024 diodos, a dispersão é de 0,33 nm/diodo. Toma-se a resolução como 2 a 2,5 vezes o valor da dispersão, pois o perfil de resposta de um arranjo de fotodiodos é trapezoidal (figura 1.02) e não retangular, gerando assim uma sobreposição parcial de informações espectrais piorando a resolução. Desse modo, podemos estimar a resolução do espectrofotômetro como aproximadamente 0,8 nm por fotodiodo.

Como essa resolução é relativamente alta para trabalhar-se com espectros de absorvância na região do visível, onde se tem bandas de absorção e não picos, e visando gerar arquivos menores, optou-se por tomar a média de três fotodiodos adjacentes para cada ponto do espectro. Isso acaba por gerar espectros com 341 pontos ao invés dos 1024 iniciais (a leitura de último fotodiodo é ignorada). Desse modo a resolução do espectrofotômetro construído passa a ser de aproximadamente 2,4 nm.

1.3.5 - Avaliação do tempo de aquisição dos espectros

O espectrofotômetro construído leva, em média, cerca de 600 ms para fazer uma leitura completa do arranjo linear de fotodiodos. Porém para a aquisição de cada espectro são realizadas três leituras, tomando cada ponto como sendo a média de três fotodiodos adjacentes em três espectros, ou seja, a média de nove leituras de fotodiodo. Nessas condições, o espectrofotômetro consegue realizar uma leitura completa de espectro (incluindo o tempo de processamento do cálculo das médias) de aproximadamente 1,98 s.

Capítulo 2

Sistema de fluxo

2.1 - Gradientes gerados por dispersão em sistemas de fluxo

O espectrofotômetro construído foi utilizado como unidade de detecção em um sistema de fluxo contínuo [10]. Este sistema garante, de forma reprodutível, a adição de solventes e reagentes continuamente (por confluência), sem qualquer contato manual e eliminando possíveis fontes de erro.

Em sistemas de fluxo, o gradiente de concentração, formado pela injeção de uma amostra no fluido carregador, contém um infinito número de elementos contendo diferentes concentrações da espécie injetada [29]. Qualquer elemento de fluido ao longo do gradiente formado por dispersão corresponde a um bem definido e reprodutível valor de dispersão. Então o coeficiente de dispersão da amostra e do reagente em cada um desses elementos de fluido possuem uma dependência temporal, desde o momento da injeção até o ponto em que toda a amostra injetada for transportada pelo fluido carregador. A figura 2.1 ilustra a dispersão de uma amostra injetada em um fluxo carregador.

No presente caso, ao invés de injetar-se uma amostra, preferiu-se permutar o fluxo entre duas soluções através do controle de uma válvula solenóide. Desse modo, tem-se um gradiente de uma espécie cuja concentração da solução começa inicialmente baixo e tende a um valor fixo igual à razão entre as vazões das linhas presentes no sistema de fluxo multiplicado pela respectiva concentração.

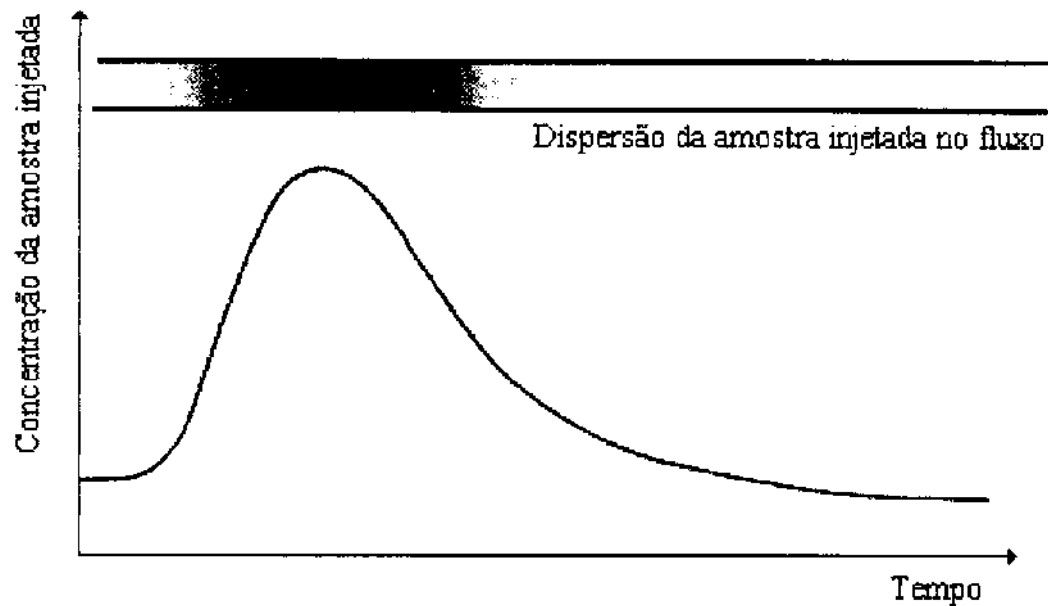


Figura 2.1 - Gradiente de concentração gerado pela injeção de uma amostra em um fluxo carregador.

A razão dessa escolha é que desse modo o gradiente gerado é apenas ascendente, e não há redundância de informação, pois no caso de gerar-se o gradiente por injeção, tem-se variação ascendente quando a amostra injetada chega à cela, e descendente quando a amostra injetada é arrastada pelo fluxo carregador, gerando assim os mesmos fenômenos duas vezes.

A figura 2.2 mostra o perfil do gradiente de concentração gerado neste processo e ilustra a tomada de espectros em cada ponto do gradiente formado.

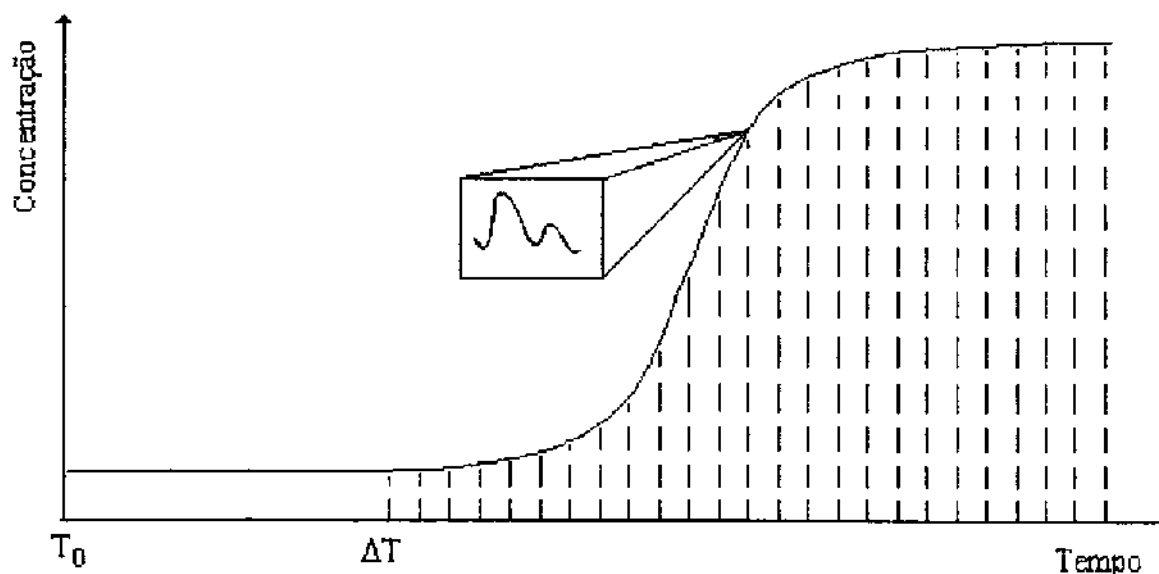


Figura 2.2 - Perfil de concentração gerado pela permutação entre duas soluções distintas. O tempo é contado a partir do momento da permutação (T_0), aguarda-se um intervalo (ΔT) para a solução permutada chegar à cela de homogeneização (ver figura 2.1), e em seguida começa a amostragem dos espectros.

2.2 Construção do gradiente

O espectrofotômetro construído foi aplicado na determinação simultânea de diversos indicadores em um sistema de fluxo utilizando um gradiente de pH gerado na própria linha. Foram tomados espectros em pontos diferentes (determinados pela velocidade de amostragem dos espectros) do gradiente. A resposta obtida é uma superfície: absorvância / comprimento de onda / pH (tempo), e determina-se a concentração dos indicadores, assim como os espectros individuais e os perfis de concentração, utilizando calibração multivariada de ordem superior [37] entre a superfície de resposta de espécies cujas concentrações são conhecidas e da amostra a ser determinada.

Para melhor poder diferenciar a sobreposição das bandas, criou-se um gradiente de pH no sistema de fluxo utilizado através da dispersão de uma solução básica em uma mistura de soluções ácidas, de modo a formar sistemas tampão ao

longo do gradiente e variando o pH lentamente. Como cada indicador absorve diferentemente em cada pH, o gradiente gerado, além dos espectros, é mais um fator de diferenciação das espécies constituintes da mistura de indicadores.

O gradiente de pH foi gerado a partir da dispersão de uma solução de Na_3PO_4 0,200 mol/L, em uma mistura de ácido cítrico 0,050 mol/L e ácido bórico 0,200 mol/L, em uma câmara de dispersão. A câmara de dispersão consiste em um compartimento de aproximadamente 1 mL de volume com um agitador magnético em seu interior de modo a promover uma alta dispersão.

A mistura de indicadores conflui com uma linha de água destilada deionizada e posteriormente com a mistura de ácidos. Após a permutação da válvula solenóide, o fluxo da mistura de ácidos é substituído por uma solução de fosfato de sódio, e a medida que esse vai chegando na câmara de dispersão, o pH na linha vai aumentando lentamente, gerando assim um gradiente de pH. Aguarda-se então um certo tempo, determinado experimentalmente, de modo que a base chegue à cela de dispersão e comece a variação de pH. Nesse ponto começa o gradiente de pH e inicia-se a rotina que toma os espectros, um a cada tempo (cada qual em valores de pH distintos) produzindo uma superfície de resposta (Absorbância / Comprimento de onda / pH). Todos esse procedimentos são realizados de maneira sistemática por uma rotina programada por computador, obtendo-se alta reprodutibilidade. O esquema do sistema de fluxo utilizado é mostrado na Figura 2.3.

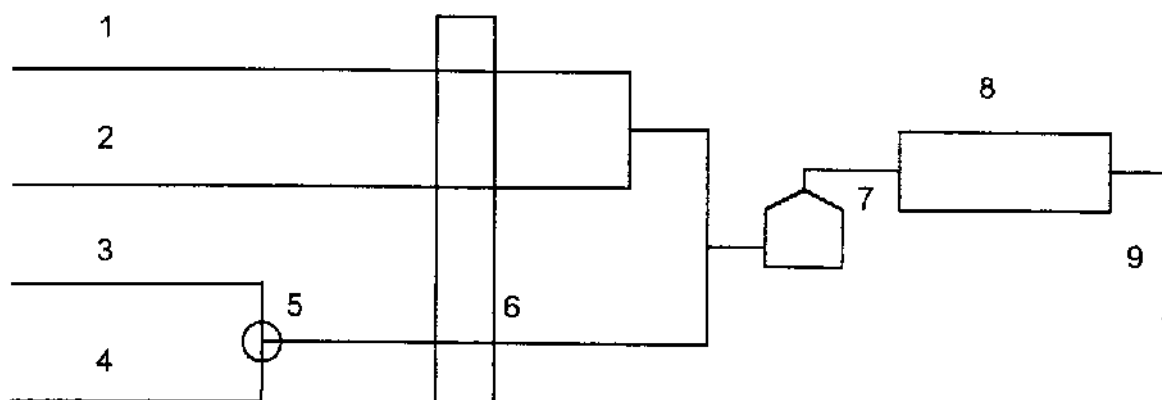


Figura 2.3 - Esquema do sistema de fluxo utilizado. 1. Amostra (mistura de indicadores), 2. Água deionizada, 3. Sol. de fosfato de sódio 0,200 mol/L, 4. Mistura contendo ácido cítrico 0,050 mol/L e ácido bórico 0,200 mol/L, 5. Válvula solenóide (três vias), 6. Bomba peristáltica, 7. Câmara de dispersão, 8. Detector, 9. Descarte.

A bomba peristáltica bombeia continuamente e simultaneamente todas as linhas (exceto as linhas 3 e 4 que são bombeadas alternadamente pelo controle da válvula solenóide), com a mesma vazão. As soluções são adicionadas por confluência e seguem para a unidade de detecção passando primeiramente por uma cela de homogeneização. Desse modo a concentração final da solução que passa a ser bombeada com a permutação da válvula solenóide tende a ser igual a um terço da concentração inicial. É interessante observar que no sistema de fluxo utilizado, a amostra é bombeada continuamente, de modo que a taxa de amostragem é essencialmente a taxa com que os espectros são realizados.

Uma vez fixadas todas as variáveis do processo, tais como vazão das linhas, concentração dos reagentes e solventes, o sistema de fluxo permite a realização de medidas espectrofotométricas nas mesmas condições, ou seja, com grande reprodutibilidade e rapidez.

Variando os parâmetros do fluxo pode-se gerar gradientes de pH diferentes, e conseqüentemente diversas superfícies de resposta para a mesma amostra.

A mistura de indicadores utilizada para a calibração do gradiente de pH foi uma adaptação do indicador de I. M. Kolthoff [39], e é formada por:

- 80,0 mL de solução de vermelho de metila 10^{-3} mol/L (60 % de etanol);
- 40,0 mL de solução de azul de bromotimol 10^{-3} mol/L (20 % de etanol);
- 20,0 mL de solução de fenolftaleína 10^{-2} mol/L (60 % de etanol);
- 40,0 mL de solução de timolftaleína 10^{-3} mol/L (60 % de etanol);
- 208,0 mL de etanol;

e diluído a 1000 mL de modo a manter a mistura final com um teor alcoólico de 30%.

Após confluir o tampão com a mistura de indicadores na proporção de duas vezes o volume de tampão para cada volume da mistura de indicadores, a solução resultante (após a tomada do espectro) foi coletada e mediu-se o pH com o auxílio de um pH-metro digital (potenciômetro com eletrodo de vidro combinado) Corning pH / ion analyzer 350.

Os tampões utilizados bem como os valores de pH medidos experimentalmente são mostrados na Tabela 2.1.

Após tomar o espectro da mistura de indicadores em cada tampão, faz-se a modelagem dos mesmos aos respectivos valores de pH utilizando calibração multivariada. Em seguida, utilizando o modelo de calibração construído, pode-se determinar os valores de pH do gradiente gerado a partir da superfície de resposta da mistura de indicadores no gradiente de pH.

Os espectros da mistura de indicadores nos diversos tampões são mostrados na figura 2.5.

Tabela 2.1 - Tampões utilizados na calibração do gradiente de pH gerado em fluxo

Tampão	Volume de sol. Ácida	Volume de sol. alcalina	pH medido experimentalmente
1	155 mL	45 mL	4,246
2	144 mL	56 mL	4,842
3	134 mL	66 mL	5,497
4	126 mL	74 mL	5,989
5	118 mL	82 mL	6,504
6	109 mL	91 mL	7,003
7	99 mL	101 mL	7,623
8	92 mL	108 mL	8,189
9	85 mL	115 mL	8,826
10	78 mL	122 mL	9,324
11	69 mL	131 mL	9,826
12	60 mL	140 mL	10,397
13	54 mL	146 mL	10,986
14	49 mL	151 mL	11,693

Solução ácida: Ácido bórico 0,200 mol/L + Ácido cítrico 0,050 mol/L, **Solução alcalina:** Fosfato de sódio 0,100 mol/L

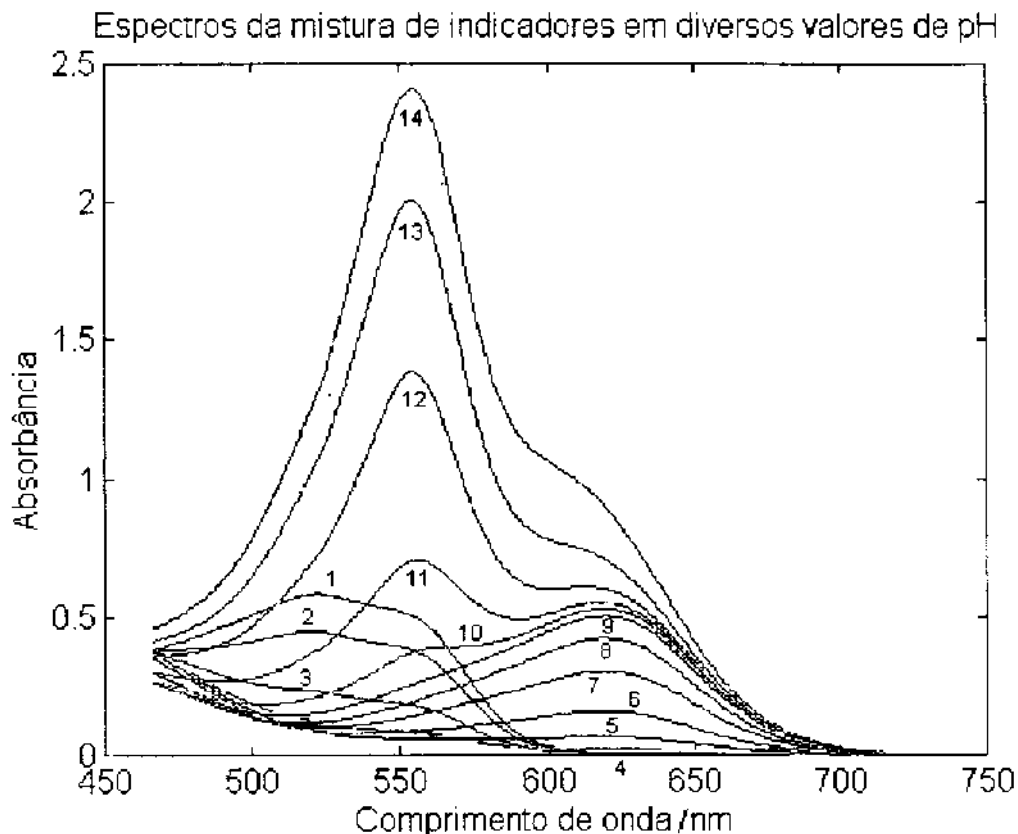


Figura 2.5 - Espectros da mistura de indicadores em diversos valores de pH distintos. Os números se referem aos tampões da tabela 2.1, nos quais foram tomados os respectivos espectros

2.3.1 - Modelo de calibração multivariada utilizado para determinar os valores de pH em fluxo

A matriz de dados (X) gerada a partir da digitalização dos espectros tomados em fluxo (um espectro em cada pH) pode ser decomposta em um somatório de produtos de vetores "scores" e vetores "loadings" (componentes principais), acrescido de uma matriz de erros (resíduos) [40]. A figura 2.6 ilustra a decomposição da matriz de dados no somatório do produto entre "scores" (vetores linha) e "loadings" (vetores coluna)

$$X = TP' + E = \sum t_h p_h' + E \quad ; \text{ Onde } h \text{ é o número de componentes principais}$$

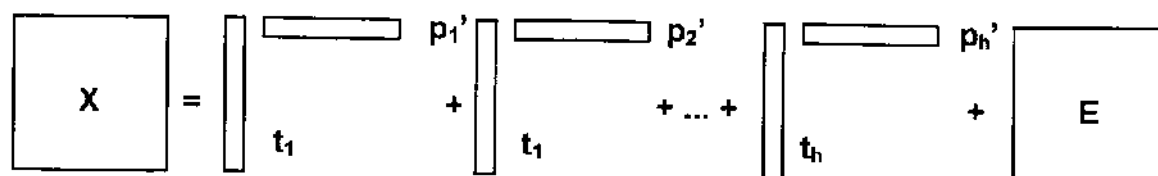


Figura 2.6 - Esquema da decomposição da matriz de dados.

Considerando cada espectro (amostra) como um ponto no espaço multidimensional formado pelas variáveis (absorbâncias, nos respectivos comprimentos de onda), a direção de maior dispersão dos pontos é o primeiro "loading" (p_1') e a projeção desse ponto (amostra) nessa nova direção é o primeiro "score" (t_1). Subtraindo a matriz de dados X do produto $t_1 p_1'$ obtém-se uma matriz de resíduos, a qual é submetida novamente ao processo, de modo a se obter uma série de produtos de "loadings" e "scores", e no final uma matriz de erros tão pequena quanto se queira.

De maneira análoga pode-se decompor a matriz de respostas Y , onde cada linha é constituída por um valor de pH, obtendo outro conjunto de "loadings" e "scores".

O modelo PLS [11] (Partial Least Squares) é obtido através de um processo iterativo, onde se otimiza ao mesmo tempo a projeção das amostras sobre o(s) *loading(s)* e o ajuste por uma função matemática (geralmente linear) dos *scores* da matriz X aos *scores* da matriz Y de modo a minimizar os desvios. Essa otimização simultânea ocasiona pequenas distorções nas direções dos "loadings", de modo que, rigorosamente eles perdem a ortogonalidade, levando à pequenas redundâncias de informação.

O modelo PCR [11] (Principal Component Regression) é obtido fazendo uma regressão linear entre os “scores” da matriz **X** e os valores de **Y**.

Na etapa de previsão, para o modelo PLS, faz-se a projeção dos dados de novas amostras (com os quais se deseja prever os valores de pH) na direção dos “loadings” usados na etapa de calibração, obtendo-se novos “scores”. Através dos parâmetros do modelo da etapa de calibração, obtém-se os respectivos valores de *scores* para o bloco de variáveis dependentes (**Y**). Então faz-se a transformação inversa à projeção e obtém-se os valores para **Y** (valores de pH).

Na etapa de previsão, para o modelo PCR, de maneira análoga, faz-se a projeção dos dados (com os quais se deseja prever os valores de pH) na direção dos *loadings* usados na etapa de calibração, obtendo-se os *scores* e pela função de regressão linear, obtém-se diretamente o valor de **Y** correspondente.

Se existirem não linearidades entre o espectro e os valores de pH, dificilmente se conseguirá relacionar os “scores” por uma função linear, de modo que se terá que utilizar componentes principais adicionais, funções não lineares para fazer o ajuste entre “scores” [41] ou redes neurais [42].

2.3.2 - Calibração espectrofotométrica entre a absorbância da mistura de indicadores e os valores de pH

Para a calibração multivariada entre os espectros da mistura de indicadores (425,0 a 763,3 nm) nos diversos tampões (tabela 2.1) e os valores de pH utilizou-se os modelos de PCR e PLS.

A escolha do número de componentes principais foi feita por validação cruzada, ou seja, tomou-se os 14 espectros, excluiu-se um deles, fez-se o modelo,

e com o modelo construído fez-se a previsão do valor de pH relativo ao espectro excluído da modelagem. Com isso pode-se estimar um erro relativo da medida de pH da amostra excluída. Repetiu-se o processo com as demais amostras excluindo uma a uma de modo a ser possível estimar um erro de previsão em cada amostra. A partir dos erros para todas amostras obteve-se a estimativa do erro médio. O erro médio menor foi obtido com 5 componentes principais conforme mostra a figura 2.7. Assim, a previsão dos valores de pH do gradiente gerado foi realizada com 5 componentes principais.

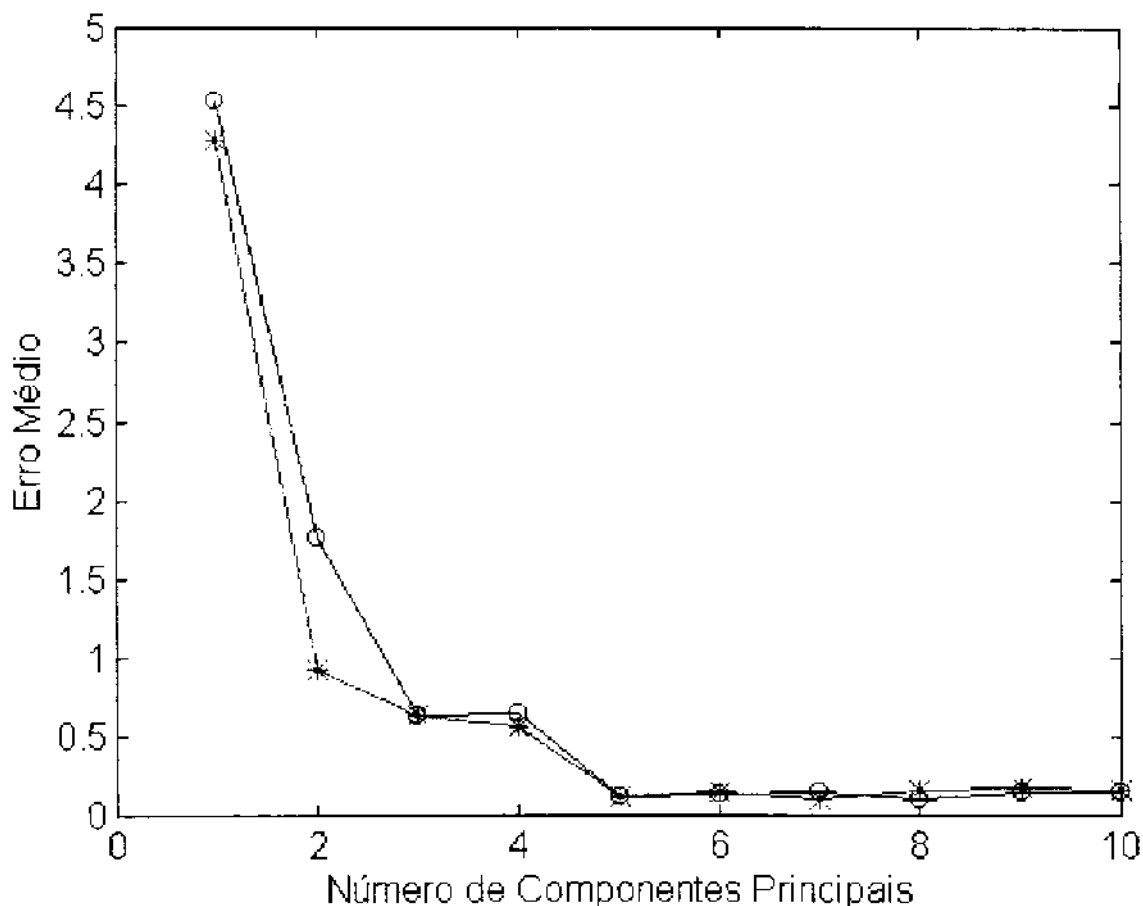


Figura 2.7 - Distribuição dos resíduos (desvio padrão médio) dos modelos de PLS (*) e PCR (o) encontrados por validação cruzada.

Seria esperado, a princípio, que fossem necessárias apenas quatro componentes principais, visto que existem quatro indicadores na mistura e o

percentual de variância explicada pela 5ª componente principal é baixo. Entretanto com quatro componentes principais, o erro médio na estimativa do pH sobe de 0,12 para 0,65. Tal fato pode ser explicado devido ao comportamento espectrofotométrico dos indicadores, onde existe uma mudança de coloração, havendo a necessidade de mais uma componente principal para explicar tal variação.

2.3.2.1 - Calibração com PCR

A tabela 2.2 mostra a variância explicada pelo modelo PCR com 5 componentes principais para fazer a calibração dos espectros com linha de base corrigida, usando todas as variáveis (341 valores de absorbância).

Tabela 2.2 - Variância explicada pelo modelo PCR

Comp. Princ.	Porcentagem de variância explicada na matriz X	
	Pelo C .P.	Acumulado
1	90,42	90,42
2	6,09	96,51
3	3,30	99,81
4	0,16	99,97
5	0,03	100,00

A tabela 2.3 mostra as estimativas dos erros obtidos pela validação cruzada conforme descrita anteriormente utilizando o modelo PCR com 5 componentes principais.

Tabela 2.3 - Estimativa dos erros obtidos com o modelo PCR

pH real (medido experimentalmente)	pH estimado	Erro (pH real - pH estimado)
4,246	4,457	-0,211
4,842	4,715	0,127
5,497	5,472	0,024
5,989	5,949	0,040
6,504	6,478	0,026
7,003	7,092	-0,088
7,623	7,668	-0,045
8,189	8,232	-0,043
8,826	8,974	-0,148
9,324	9,180	0,144
9,826	9,684	0,142
10,397	10,467	-0,070
10,986	11,043	-0,057
11,693	11,458	0,234
Erro médio:		0,120

2.3.2.2 - Calibração com o PLS

A tabela 2.4 mostra a variância explicada pelo modelo PLS com 5 componentes principais para fazer a calibração dos espectros com linha de base corrigida, usando todas as variáveis (341 valores de absorbância).

Tabela 2.4 - Variância explicada pelo modelo PLS

Componente principal	Quantidade de variância explicada			
	Matriz X		Matriz Y	
	C.P.	Acumulado	C.P.	Acumulado
1	90,31	90,31	79,47	79,47
2	6,07	96,39	19,75	99,21
3	3,42	99,81	0,57	99,78
4	0,08	99,88	0,17	99,95
5	0,12	100,00	0,05	99,99

A tabela 2.5 mostra as estimativas dos erros obtidos pela validação cruzada conforme descrita anteriormente utilizando o modelo PLS com 5 componentes principais.

Embora os erros na previsão com o PCR e PLS sejam muito parecidos (há diferença entre eles apenas na quarta casa decimal), optou-se por utilizar o PCR devido ao menor erro na previsão.

Tabela 2.5 - Estimativa dos erros obtidos com o modelo PLS

pH real (medido experimentalmente)	pH estimado	Erro (pH real - pH estimado)
4,246	4,457	-0,211
4,842	4,715	0,127
5,497	5,473	0,024
5,989	5,949	0,040
6,504	6,478	0,026
7,003	7,092	-0,089
7,623	7,668	-0,044
8,189	8,232	-0,043
8,826	8,974	-0,148
9,324	9,180	0,144
9,826	9,684	0,142
10,397	10,467	-0,070
10,986	11,043	-0,057
11,693	11,456	0,237
Erro Médio		0,120

2.3.3 - Previsão dos valores do gradiente de pH utilizando o modelo PCR linear.

Com a possibilidade de estimar os valores de pH do gradiente gerado, ajustou-se os parâmetros de modo a conseguir uma faixa de valores de pH que possa distinguir os diversos indicadores presentes na mistura e posteriormente

quantificá-los com os modelos de calibração multivariada de ordem superior. Os parâmetros otimizados são listados abaixo:

- Tempo de espera de 140 segundos após a permutação da válvula peristáltica;
- 50 leituras de espectro por superfície;
- Intervalo de 0,4 segundos entre cada leitura;
- Vazão de 0,37 mL/min para todas as linhas do sistema de fluxo mostrado na figura 2.3.

Tomaram-se dez superfícies de resposta (dez replicatas) da mistura de indicadores no gradiente de pH gerado, e com o modelo de calibração multivariada construído com o PCR estimou-se os valores de pH do gradiente, bem como o desvio padrão na determinação do mesmo. A figura 2.8 mostra o perfil do gradiente de pH gerado com os parâmetros otimizados.

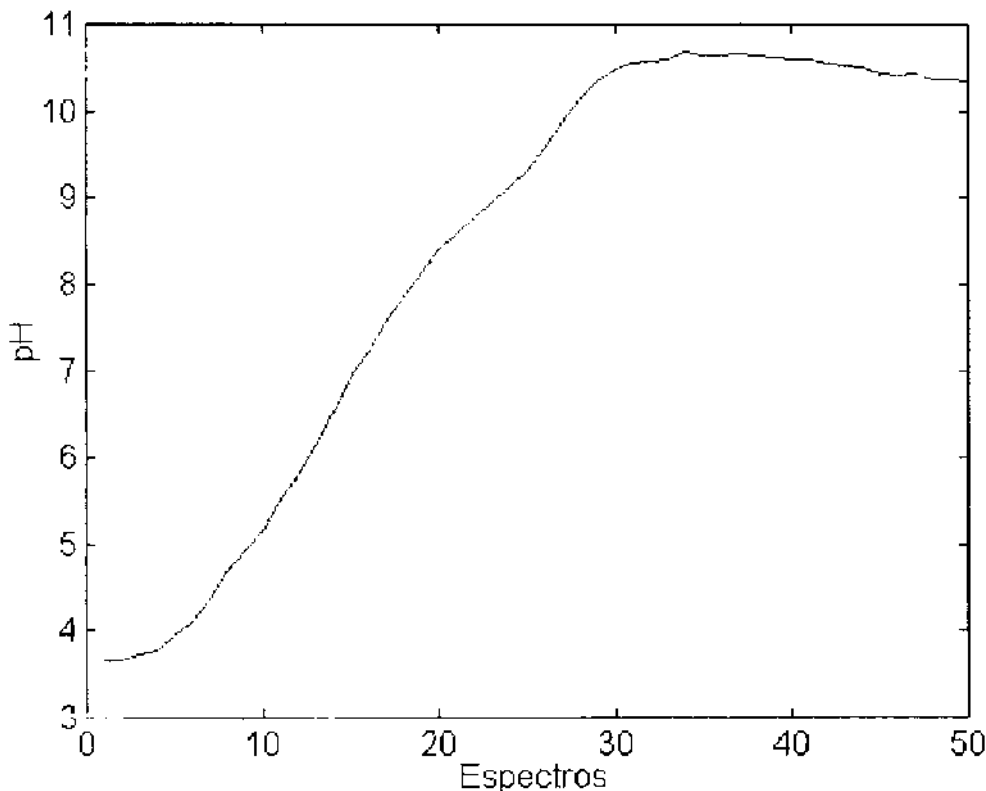


Figura 2.8 - Estimativa do gradiente de pH gerado em fluxo.

A escala de tempo utilizada se refere à amostragem dos espectros, ou seja, cada unidade equivale ao tempo de espera entre a permutação da válvula e o início da tomada dos espectros (140 s) acrescido do intervalo entre os espectros (0,4 s) mais o tempo necessário à obtenção de cada espectro (1,98 s) multiplicado pela respectiva ordem na tomada do espectro. Desse modo tem-se:

$$\text{Tempo (s)} = 140 + (0,4 + 1,98) * \text{número do espectro.}$$

A figura 2.9 mostra a estimativa do desvio padrão entre as 10 replicatas na medida dos valores do gradiente de pH utilizando os parâmetros otimizados. É importante observar que tal desvio padrão reflete tanto o erro na previsão utilizando o modelo de PCR construído como os erros experimentais associados às medidas, tais como flutuações de vazão nas linhas de fluxo, ou flutuações na fonte de luz.

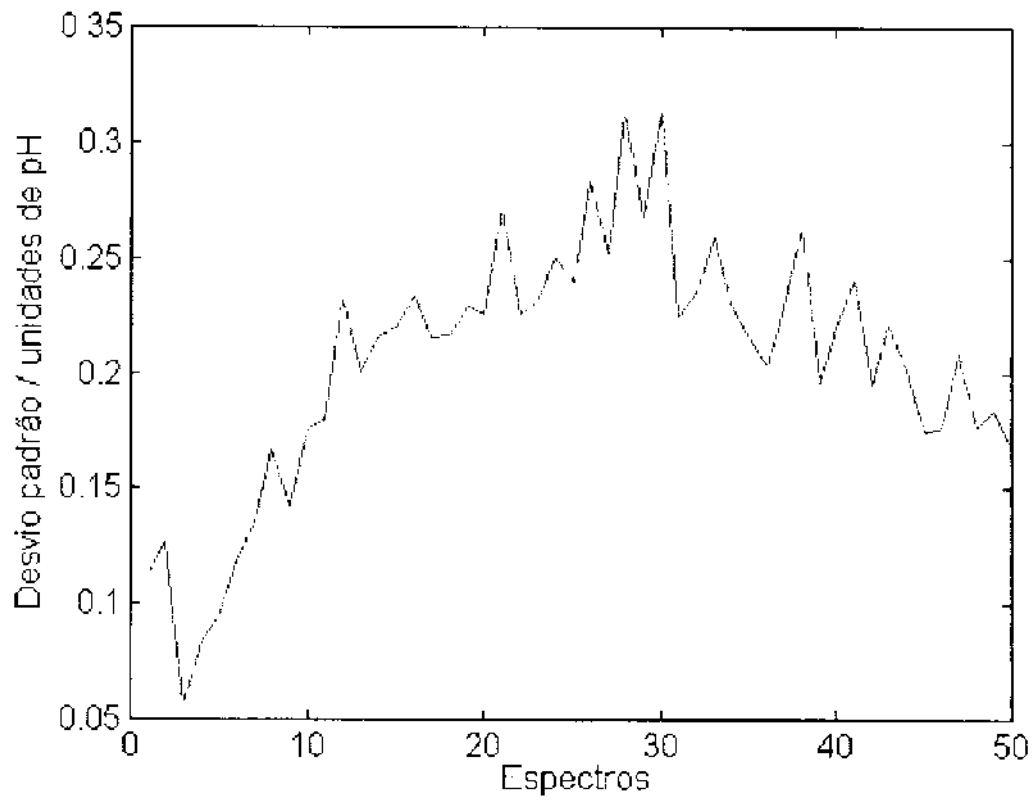


Figura 2.9 - Estimativa do desvio padrão entre dez determinações do gradiente de pH gerado em fluxo.

Capítulo 3

Calibração multivariada de ordem superior em sistemas de fluxo

3.1 - Introdução

As superfícies de dados geradas por espectros tomados em sistemas de fluxo com exploração de gradiente contém uma grande quantidade de informações que dificilmente podem ser avaliadas e quantificadas sem um tratamento de dados mais complexo. Na maioria dos casos, tanto o perfil de composição das espécies com o pH quanto os espectros de espécies distintas são semelhantes e há uma grande sobreposição nos dados. Tais superfícies de respostas, quando digitalizadas (de modo que cada espectro da superfície gera um vetor linha), formam uma matriz de dados bilineares, onde o perfil de composição das espécies com o pH é independente dos espectros tomados.

Cada amostra analisada é então representada por uma superfície de resposta (absorbância x comprimento de onda x tempo) formada por uma sucessão de espectros tomados em tempos pré-determinados, de modo a amostrar pontos diferentes do gradiente de pH gerado em fluxo. Desse modo, a matriz de dados (formada por valores de absorbância) referente a uma amostra possui o número de colunas igual à quantidade de comprimentos de onda analisados em cada espectro, e o número de linhas igual à quantidade de espectros tomados cada qual em um tempo distinto, como mostrado na figura 3.1.

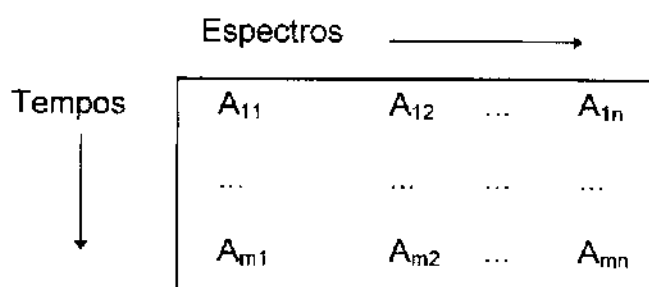


Figura 3.1 - Representação matricial de uma superfície de resposta composta por "m" espectros tomados em tempos distintos, e com "n" comprimentos de onda distintos em cada espectro.

Para a análise dos dados de matrizes bilineares foi utilizado o método de RA - aniquilação de posto (do inglês Rank Annihilation) [43] e o GRAM - método generalizado de aniquilação de posto (do inglês Generalized Rank Annihilation) [19]. Ambos os modelos comparam a superfície de resposta de uma amostra de composição desconhecida com a de uma amostra padrão de composição conhecida e previamente quantificada. O modelo RA pode ser utilizado para quantificar uma espécie quando se tem uma padrão composto por essa única espécie, também presente na amostra que se deseja analisar. O modelo GRAM é uma generalização do modelo RA, onde a amostra padrão e a amostra desconhecida precisam apenas ter uma ou mais espécies em comum, não havendo a necessidade da amostra padrão conter todas as espécies contidas na amostra desconhecida, e vice-versa.

A aplicabilidade do GRAM tem sido demonstrada no tratamento de dados gerados em cromatografia [44, 45] e em determinações cinéticas [46].

Para uma melhor compreensão da álgebra envolvida nos modelos de tratamento de dados, foi utilizada a seguinte notação:

- Vetores - letras minúsculas em negrito (ex: **x**);
- Matrizes - letras maiúsculas em negrito (ex: **X**);
- Escalares - letras minúsculas sem negrito (ex: λ);
- Matrizes diagonais - letras maiúsculas sem negrito (ex: **S**).

3.2 - Base algébrica

Antes de iniciar com a teoria dos modelos de calibração multivariada de ordem superior utilizados, é interessante introduzir algumas das definições e ferramentas utilizadas em álgebra. Estas serão úteis à compreensão da álgebra matricial envolvida nos modelos utilizados.

■ Posto de uma matriz - (do inglês *rank*), é o número de vetores linearmente independentes contidos na matriz, ou seja, é a dimensão mínima do espaço vetorial no qual a matriz pode ser projetada sem perda de informação. No caso de matrizes relativas à amostras químicas, o posto da matriz é o número de espécies distintas (que respondem independentemente), desprezando os ruídos aleatórios inerentes à medidas experimentais.

■ Equação de autovalores e autovetores [40] - Quando um operador (representado por uma matriz) é aplicado a um espaço vetorial e o produto dessa operação retorna o próprio espaço vetorial multiplicado por um valor constante tem-se uma equação de autovalores e autovetores.

$$\mathbf{M} \mathbf{V} = \lambda \mathbf{V}$$

onde a matriz **M** é o operador que é aplicado no espaço vetorial formados pelos vetores da matriz **V**, resultando em uma constante (Λ) multiplicada pelo próprio espaço vetorial (**V**).

■ Decomposição em valores singulares (SVD) [40] - permite decompor uma matriz em autovetores. A matriz decomposta é igual ao produto de três matrizes de modo que o produto das duas primeiras pela transposta da terceira retorna a matriz original. Uma representação dessa decomposição é mostrada na figura 3.2.

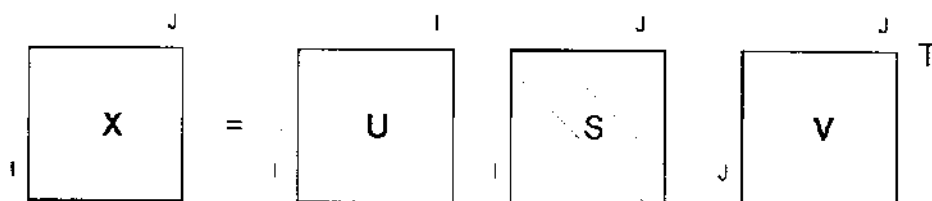


Figura 3.2 - Representação esquemática da decomposição em valores singulares.

onde as matrizes **U** e **V** são ortonormais. A matriz **S** é uma matriz diagonal cujos elementos chamados “valores singulares” são iguais à raiz quadrada dos autovalores. As colunas de **U** são autovetores de $X X^t$, abrangendo assim o espaço vetorial das linhas de **X**. As colunas de **V** são autovetores de $X^t X$, abrangendo assim o espaço vetorial das colunas de **X**.

3.3 - Teoria do modelo de aniquilação de posto - RA (*Rank Annihilation*)

Um instrumento bilinear é aquele que apresenta uma matriz resposta **N**, para uma espécie pura, do tipo

$$N = x c_n y' \quad (3.01)$$

onde $\mathbf{x}$ e $\mathbf{y}$ são vetores coluna que representam as respostas em cada ordem (espectro puro e perfil de concentração dependente do pH no caso), e c_n é a concentração da respectiva espécie.

Para uma amostra desconhecida com mais de uma espécie, a matriz de resposta pode ser descrita como

$$\mathbf{M} = \sum_{k=1}^h \mathbf{x}_k c_{k,m} \mathbf{y}_k^t = \mathbf{X} \mathbf{C}_m \mathbf{Y}^t \quad (3.02)$$

onde h é o número total de componentes, $\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}$ são matrizes cujas colunas são $\mathbf{x}_k$ e $\mathbf{y}_k$ e $\mathbf{C}_m$ é uma matriz diagonal cujos elementos são $c_{k,m}$.

De forma análoga, pode-se decompor a matriz de resposta para a amostra de calibração (padrão) como

$$\mathbf{N} = \mathbf{X} \mathbf{C}_n \mathbf{Y}^t. \quad (3.03)$$

Existindo espécies presentes na amostra desconhecida que não pertencem à amostra de calibração, alguns elementos da diagonal de $\mathbf{C}_n$ serão nulos.

As matrizes $\mathbf{M}$ e $\mathbf{N}$ tem em comum os blocos $\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}^t$ (os dados de calibração e análise da amostra desconhecida foram gerados pela mesma técnica nas mesmas condições), diferindo apenas nas concentrações. Resolvendo para as equações 3.02 e 3.03, temos

$$\mathbf{X} \mathbf{C}_m = \mathbf{M}(\mathbf{Y}^t)^+ \quad (3.04)$$

$$\mathbf{X} \mathbf{C}_n = \mathbf{N}(\mathbf{Y}^t)^+ \quad (3.05)$$

onde o sinal "+" sobrescrito indica a pseudo-inversa. Multiplicando a equação 3.04 por $\mathbf{C}_n$ e a equação 3.05 por $\mathbf{C}_m$ e combinando os termos temos:

$$\mathbf{N}(\mathbf{Y}^t)^+ \mathbf{C}_m = \mathbf{M}(\mathbf{Y}^t)^+ \mathbf{C}_n \quad (3.06)$$

substituindo $\mathbf{Z} = (\mathbf{Y}^t)^+$ temos:

$$\mathbf{N} \mathbf{Z} \mathbf{C}_m = \mathbf{M} \mathbf{Z} \mathbf{C}_n \quad (3.07)$$

Quando os componentes dos dados de calibração são um subconjunto dos componentes dos dados da amostra desconhecida, $\mathbf{Z}$ e $\mathbf{C}_m$ podem ser resolvidos pela decomposição em valores singulares de $\mathbf{M}$ ($\mathbf{M} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^t$). Truncando essa decomposição apenas para os valores significativos temos $\mathbf{M} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^t$. Essa truncagem é feita tomando apenas as "i" colunas significativas de $\mathbf{U}$ e $\mathbf{V}$ e a submatriz formada no canto superior direito da matriz $\mathbf{S}$ com dimensões "h" por "h". A constante "h" é o número de componentes principais, ou seja, a princípio é o número de espécies presentes na amostra desconhecida. Isso garante que as matrizes sejam quadradas, e portanto inversíveis. Resolvendo a equação 3.07 temos:

$$\mathbf{N} \mathbf{Z} \mathbf{C}_m = \mathbf{M} \mathbf{Z} \mathbf{C}_n = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^t \mathbf{Z} \mathbf{C}_n \quad (3.08)$$

substituindo $\mathbf{Z} = \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}'$, na equação (3.08) onde $\mathbf{Z}' = \mathbf{S} \mathbf{V}^t \mathbf{Z}$ temos:

$$\mathbf{N}(\mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}') \mathbf{C}_m = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^t (\mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}') \mathbf{C}_n \quad (3.09)$$

Utilizando as propriedades de ortogonalidade da matriz $\mathbf{V}$ ($\mathbf{V}^t \mathbf{V} = \mathbf{I}$, onde $\mathbf{I}$ é a matriz identidade, com os últimos elementos da diagonal nulos (parte que foi truncada em $\mathbf{V}$) temos:

$$(\mathbf{N} \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1}) \mathbf{Z}' \mathbf{C}_m = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{I} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}' \mathbf{C}_n = \mathbf{U} (\mathbf{S} \mathbf{S}^{-1}) \mathbf{Z}' \mathbf{C}_n = \mathbf{U} \mathbf{Z}' \mathbf{C}_n \quad (3.10)$$

multiplicando a esquerda por $\mathbf{U}^t$ e a direita por $\mathbf{C}_m^{-1}$ temos:

$$(\mathbf{U}^t \mathbf{N} \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1}) \mathbf{Z}' (\mathbf{C}_m \mathbf{C}_m^{-1}) = (\mathbf{U}^t \mathbf{U}) \mathbf{Z}' \mathbf{C}_n \mathbf{C}_m^{-1} \Rightarrow \mathbf{U}^t \mathbf{N} \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1} \mathbf{Z}' = \mathbf{Z}' \mathbf{\Lambda}; \quad (3.11)$$

onde $\mathbf{\Lambda} = \mathbf{C}_n \mathbf{C}_m^{-1}$. É possível encontrar $\mathbf{\Lambda}$ resolvendo a equação de autovalores e autovetores. Como o posto da matriz $\mathbf{N}$ é igual a 1, haverá apenas uma solução não nula para os autovalores $\mathbf{\Lambda}$, logo a solução para $\lambda = (\mathbf{C}_n \mathbf{C}_m^{-1})$, onde λ é o elemento não nulo de $\mathbf{\Lambda}$, será o traço da matriz $(\mathbf{U}^t \mathbf{N} \mathbf{V} \mathbf{S}^{-1})$. A partir da definição de

λ , obtém-se facilmente o valor da concentração do analito desejado. Os autovetores $\mathbf{Z}^*$ permitem-nos calcular os componentes puros ($\mathbf{X}$ e $\mathbf{Y}^t$)

$$\mathbf{Z}^* = \underline{\mathbf{S}} \underline{\mathbf{V}}^t \mathbf{Z} = \underline{\mathbf{S}} \underline{\mathbf{V}}^t (\mathbf{Y}^t)^+ \quad (3.12)$$

$$\mathbf{Y}^t = (\underline{\mathbf{V}} \underline{\mathbf{S}}^{-1} \mathbf{Z}^*)^+ \quad (3.13)$$

Pela definição $\mathbf{M} = \mathbf{X} \mathbf{C}_m \mathbf{Y}^t = \underline{\mathbf{U}} \underline{\mathbf{S}} \underline{\mathbf{V}}^t$, logo:

$$\mathbf{X} \mathbf{C}_m = \mathbf{M} (\mathbf{Y}^t)^+ = \underline{\mathbf{U}} \underline{\mathbf{S}} \underline{\mathbf{V}}^t \underline{\mathbf{V}} \underline{\mathbf{S}}^{-1} \mathbf{Z}^* = \underline{\mathbf{U}} \mathbf{Z}^* \quad (3.14)$$

Se a amostra padrão tiver mais que um componente, de modo a ser um “subconjunto” da amostra desconhecida, a matriz de dados referentes à amostra padrão $\mathbf{N}$ terá componentes que são um subconjunto dos componentes presentes na matriz de dados referentes à amostra desconhecida $\mathbf{M}$. Nesse caso, a equação 3.11 terá vários autovalores não nulos. A solução será um conjunto de autovalores λ e seus respectivos autovetores $\mathbf{Z}^*$, com número igual ao posto da matriz de calibração (padrão). Como $\Lambda = \mathbf{C}_n \mathbf{C}_m^{-1}$, ou seja, $\lambda_k = c_{k,n} c_{k,m}^{-1}$ para cada componente k , uma vez encontrados os espectros puros e os perfis de concentração das espécies com o pH puros, pode-se facilmente associar as respostas às respectivas espécies, e desse modo $c_{k,m} = c_{k,n} \lambda_k^{-1}$.

A rotina em Matlab para a modelagem com o RA encontra-se no apêndice 5.

3.4 - Teoria do método generalizado de aniquilação de posto - GRAM (Generalized Rank Annihilation Method)

Quando a amostra desconhecida contém espécies que não estão presentes na amostra padrão e vice-versa, temos o caso mais geral na determinação

simultânea da concentração de espécies em misturas. Tanto a superfície relacionada à amostra padrão quanto a da amostra desconhecida contém dados relativos às espécies distintas e espécies em comum. Neste caso o posto da soma das matrizes é maior que o posto de qualquer uma das matrizes independentes e menor que o a soma dos postos das duas matrizes.

Isso gera problemas na resolução da equação de autovalores e autovetores (equação 3.07). No caso anterior (RA) faz-se a projeção das informações relativas à amostra padrão (matriz **N**) sobre uma base formada pelos autovetores, isto é, pelos vetores puros (componentes principais) da amostra desconhecida (matriz **M**), pois os mesmos formavam uma base na qual podia ser descrita a resposta de todas as espécies da amostra padrão **N** (o conjunto formado pelas espécies da amostra padrão **N** estava contido no conjunto formado pelas espécies da amostra desconhecida **M**). No caso atual, uma simples projeção de uma das matrizes sobre as componentes principais da outra matriz, qualquer que seja a ordem, acarreta numa distorção das informações contidas nas matrizes, pois nenhuma delas pode gerar uma base para descrever as informações da outra, uma vez que há um ou mais espécies em uma que não existem na outra.

A equação 3.07 pode ser rescrita como:

$$\mathbf{M} \mathbf{Z} = \mathbf{N} \mathbf{Z} \mathbf{\Lambda} ; \mathbf{\Lambda} = \mathbf{C}_m \mathbf{C}_n^{-1} \quad (3.15)$$

Para a resolução da equação 3.15 fornecer autovalores e autovetores reais e positivos é necessário inicialmente que as matrizes sejam quadradas, inversíveis e não singulares (por exemplo: matrizes quadradas e simétricas que possuem autovalores reais e maiores que zero).

Uma transformação das matrizes **N** e **M** deve ser realizada de modo que formem-se matrizes quadradas, mantendo inalterado o posto de ambas. Para essa transformação é necessário determinar dois conjuntos de vetores ortonormais p_i e q_i que formarão a base para a representação das duas matrizes de dados em questão. Os vetores p_i formarão as colunas de uma nova matriz **P** e os vetores q_i as colunas de outra nova matriz **Q**. As matrizes **P** e **Q** são calculados a partir da decomposição em valores singulares de duas novas matrizes formadas colocando-se **M** e **N** lado a lado e uma sobre a outra:

$$\mathbf{M} \mid \mathbf{N} = \mathbf{P} \mathbf{S}_1 \mathbf{V}^t \quad (3.17)$$

$$\begin{array}{c} \mathbf{M} \\ \mathbf{N} \end{array} = \mathbf{U} \mathbf{S}_2 \mathbf{Q}^t \quad (3.18)$$

onde **P**, **V**, **U** e **Q** são autovetores e S_1 e S_2 são matrizes de valores singulares (matrizes diagonais). Determinadas as matrizes **P** e **Q**, a equação 3.07 pode ser resolvida substituindo as matrizes **M** e **N** pelas projeções $\mathbf{M}_{PQ}$ e $\mathbf{N}_{PQ}$ das mesmas sobre a base formada por **P** e **Q**.

$$\mathbf{M}_{PQ} = \mathbf{P}^t \mathbf{M} \mathbf{Q} = (\mathbf{P}^t \mathbf{X}) \mathbf{C}_m (\mathbf{Q}^t \mathbf{Y})^t \quad (3.19)$$

$$\mathbf{N}_{PQ} = \mathbf{P}^t \mathbf{N} \mathbf{Q} = (\mathbf{P}^t \mathbf{X}) \mathbf{C}_n (\mathbf{Q}^t \mathbf{Y})^t \quad (3.20)$$

$$\mathbf{M}_{PQ} \mathbf{Z} = \mathbf{N}_{PQ} \mathbf{Z} \mathbf{\Lambda} \quad ; \mathbf{\Lambda} = \mathbf{C}_m \mathbf{C}_n^{-1} \quad (3.21)$$

Para resolver essa equação de autovalores e autovetores, foi utilizado o algoritmo QZ [32, 47]. Somente é possível garantir que os autovalores e autovetores da equação 3.21 são reais e maiores que zero se $\mathbf{M}_{PQ}$ e $\mathbf{N}_{PQ}$ forem positivos e não singulares. Como tanto $\mathbf{M}_{PQ}$ quanto $\mathbf{N}_{PQ}$ são matrizes quadradas reais e assimétricas, não se pode afirmar que o algoritmo QZ só produzirá autovalores e autovetores reais.

Quando não são produzidos autovalores e autovetores reais pode-se obter autovalores complexos que ocorrem em pares conjugados $(\lambda_j, \lambda_{j+1})$ com os respectivos autovetores também em pares conjugados (z_j, z_{j+1}) . Uma matriz de transformação de similaridade $T^{\otimes}$ pode transformar o conjunto de autovalores e autovetores complexos em reais sem perder informação. As dimensões de $T^{\otimes}$ são idênticas às da matriz de autovalores Λ . Para elementos de Λ que são reais, a matriz $T^{\otimes}$ assume valores da matriz identidade. Para autovalores e autovetores que ocorrem em pares conjugados, a sub-matriz de $T^{\otimes}$ é dada pela equação 3.22.

$$\begin{bmatrix} T^{\otimes}_{j,j} & T^{\otimes}_{j,j+1} \\ T^{\otimes}_{j+1,j} & T^{\otimes}_{j+1,j+1} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ i & -i \end{bmatrix} \quad (3.22)$$

Uma vez determinada a matriz $T^{\otimes}$, os autovalores e autovetores são transformados em $\Lambda^{\otimes}$ e $Z^{\otimes}$ de acordo com as equações 3.23 e 3.24.

$$Z^{\otimes} = Z (T^{\otimes})^{-1} \quad (3.23)$$

$$\Lambda^{\otimes} = T^{\otimes} \Lambda (T^{\otimes})^{-1} \quad (3.24)$$

Os complexos conjugados em Λ são transformados em reais em blocos de 2 x 2 em $\Lambda^{\otimes}$. De modo que $\Lambda^{\otimes}$ e $Z^{\otimes}$ permanecem como uma solução para a equação 3.21, quando devidamente substituídos por Λ e Z respectivamente.

A transformação de similaridade introduzida pelas equações 3.23 e 3.24 somente se aplica quando autovalores reais são associados a autovetores reais e quando autovalores complexos ocorrem em pares conjugados associados a pares conjugados de autovetores complexos. De fato, pelo algoritmo QZ os autovalores e autovetores calculados nem sempre se apresentam dessa forma. Por exemplo

um autovalor real pode estar associado a um autovetor complexo ou a um par conjugado de autovetores complexos ou a um par de autovetores complexos que não são conjugados. Assim outra transformação de similaridade deve ser introduzida a fim de corrigir essas possíveis anomalias. Analogamente a transformação de similaridade anterior, a nova transformação de similaridade é definida por uma matriz $T^{\oplus}$, a qual possui as mesmas dimensões de $T^{\otimes}$, segundo as equações 3.25 e 3.26.

$$Z^{\oplus} = Z (T^{\oplus})^{-1} \quad (3.25)$$

$$\Lambda^{\oplus} = T^{\oplus} \Lambda (T^{\oplus})^{-1} \quad (3.26)$$

Quando λ_j é um autovalor real e corresponde a um autovetor complexo z_j , há dois diferentes argumentos θ_1 e θ_2 nas linhas de z_j . A soma dos valores desses dois argumentos é sempre igual a π , ou seja, os dois elementos de z_j pertencem ao mesmo plano, logo pode-se encontrar um novo argumento δ que rotaciona o autovetor z_j em um plano real. O elemento da diagonal de $T^{\oplus}$, $t^{\oplus}_{jj} = e^{i\delta}$ pode ser usado para transformar z_j de complexo para real sem mudar sua magnitude.

Quando λ_j e λ_{j+1} ocorrem em pares complexos conjugados e os autovetores correspondentes z_j e z_{j+1} não são pares de complexos conjugados, a soma dos argumentos em cada linha de z_j e z_{j+1} é uma constante ($\theta_{k,j} + \theta_{k,j+1} = \text{cte}$). Assim, é possível encontrar dois novos argumentos α e β que rotacionam esses dois autovetores simultaneamente de modo a originar pares complexos conjugados z_j e z_{j+1} . Os elementos da matriz de transformação $T^{\oplus}$ que executam essa rotação são $t^{\oplus}_{jj} = e^{i\alpha}$ e $t^{\oplus}_{j+1,j+1} = e^{i\beta}$. Dessa maneira α e β podem ser calculados pela escolha de duas linhas quaisquer das duas colunas de argumentos $\theta_j + \theta_{j+1}$. Esses

argumentos são substituídos no sistema de equações não homogêneas formado pelas equações 3.27 e 3.28. Qualquer solução válida dessas equações resolve α e β :

$$\theta_{kj} - \alpha = -(\theta_{k,j+1} - \beta) \quad (3.27)$$

$$0_{k+1,j} - \alpha = -(\theta_{k+1,j+1} - \beta) \quad (3.28)$$

Usando essas duas técnicas, uma matriz de transformação $T^{\oplus}$ pode ser determinada de modo a gerar as matrizes de autovalores e autovetores $\Lambda^{\oplus}$ e $Z^{\oplus}$ permanecendo como solução da equação 3.21.

Em outras palavras, após o uso do algoritmo QZ para resolver a equação 3.21 as matrizes de autovalores e seus autovetores correspondentes ficam distribuídas em ordem de magnitude (do maior para o menor) dos autovalores em Λ agrupando os complexos conjugados em pares. Em seguida encontra-se a matriz de transformação de similaridade $T^{\oplus}$ a qual transforma Z e Λ em $Z^{\oplus}$ e $\Lambda^{\oplus}$. Autovalores reais ficam sempre associados a autovetores reais, e autovalores complexos conjugados ficam sempre associados a autovetores complexos conjugados. Finalmente encontramos a segunda matriz de transformação de similaridade $T^{\otimes}$ a qual converte $Z^{\oplus}$ e $\Lambda^{\oplus}$ em $Z^{\otimes}$ e $\Lambda^{\otimes}$, que não mais contém números complexos.

Uma vez que Z e Λ são transformados em $Z^{\otimes}$ e $\Lambda^{\otimes}$, os espectros puros e os perfis de concentração com o pH podem ser calculados de acordo com as equações 3.29 e 3.30. Como não há valores complexos em $Z^{\otimes}$, os espectros e perfis de concentração X e Y são reais.

$$X = P N_{PQ} Z^{\otimes} \quad (3.29)$$

$$Y = Q ((Z^{\oplus})^+)^t \quad (3.30)$$

Após estimar-se os componentes puros, a concentração dos constituintes de interesse na amostra desconhecida pode ser calculada pelas equações 3.31, 3.32 e 3.33. Uma matriz R fornece as razões entre as concentrações dos constituintes de interesse nessas duas matrizes:

$$C_m = (P^t X)^{-1} M_{PQ} ((Q^t Y)^t)^{-1} \quad (3.31)$$

$$C_n = (P^t X)^{-1} N_{PQ} ((Q^t Y)^t)^{-1} \quad (3.32)$$

$$R = C_m C_n^{-1} \quad (3.33)$$

Maiores informações dessa metodologia podem ser obtidas na referência 48.

A rotina em Matlab para a modelagem com o GRAM juntamente com as sub-rotinas utilizadas para realizar as transformações de similaridade encontram-se nos apêndices 6, 7 e 8 respectivamente.

3.5 - Validação dos modelos utilizados através de simulação computacional

A fim de avaliar a capacidade de modelagem do método de aniquilação de posto, foram realizados testes com dados simulados, onde todas as variáveis estão sob controle, podendo-se obter uma estimativa da exatidão do mesmo.

Inicialmente foram geradas funções (compostas por somatórios de gaussianas com máximos, dispersão e posições diferentes) que representam espectros puros conforme mostrado na figura 3.03.

Geraram-se também funções que representam o comportamento desses espectros no gradiente de pH, ou seja, o perfil de concentração das espécies espectroscopicamente ativas, conforme mostrado na figura 3.04.

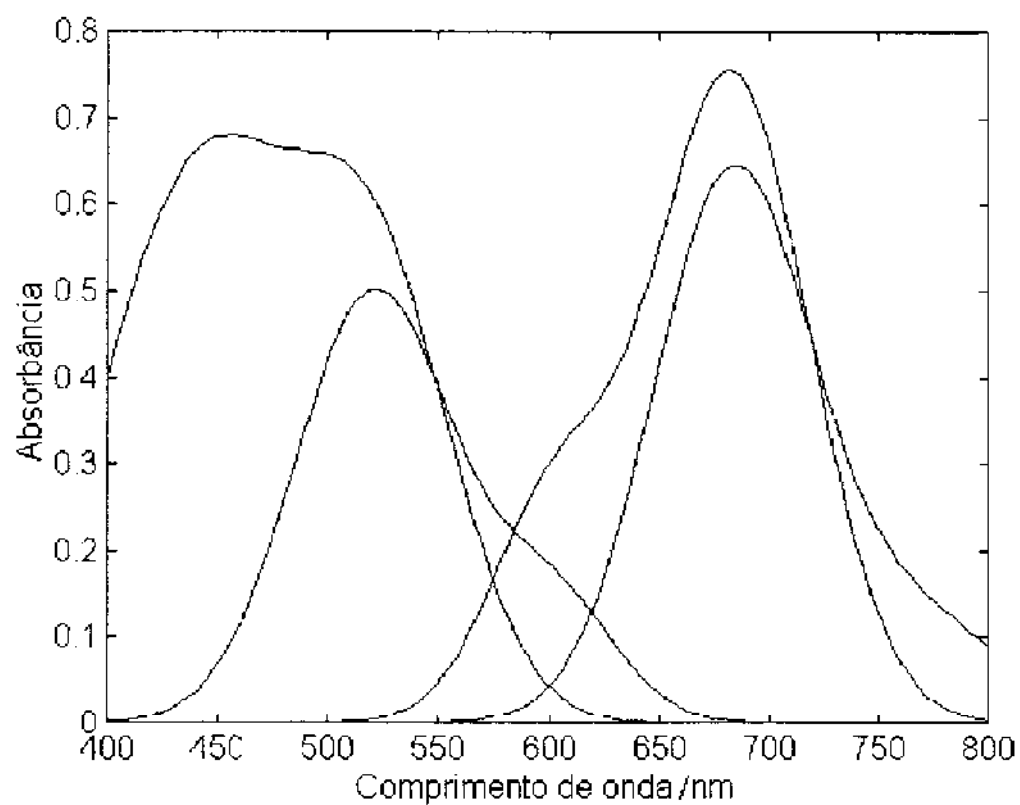


Figura 3.03 - Simulação de espectros puros

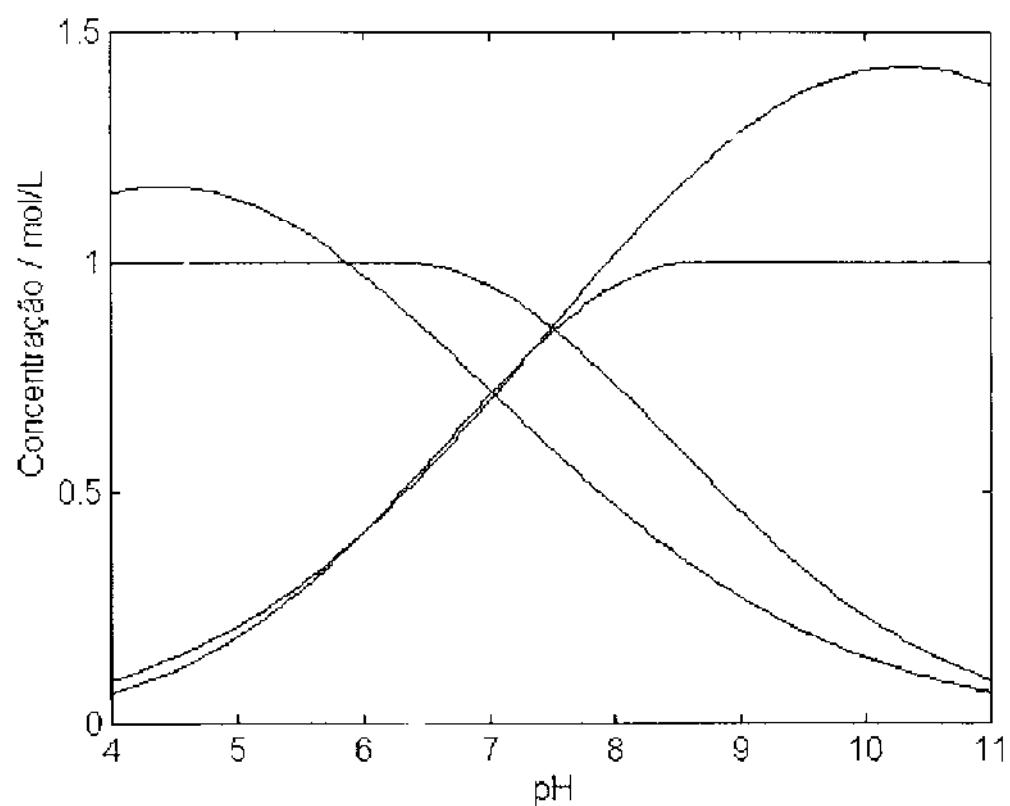


Figura 3.04 - Simulação dos perfis de concentração

No presente caso, foram simulados dados para quatro espécies distintas, a partir de quatro funções para os espectros puros e quatro funções para os perfis puros. Multiplicando-se os espectros pelos perfis obtém-se uma superfície de resposta para cada espécie. Pode-se fazer uma composição de elementos simplesmente adicionando-se os produtos dos vetores de concentração pelos vetores de perfil, e desse modo simular respostas de misturas de indicadores.

A figura 3.05 mostra a superfície gerada para a simulação da resposta das quatro espécies simultaneamente no gradiente de pH (somatório de produto dos quatro vetores de espectro pelos quatro vetores de perfil).

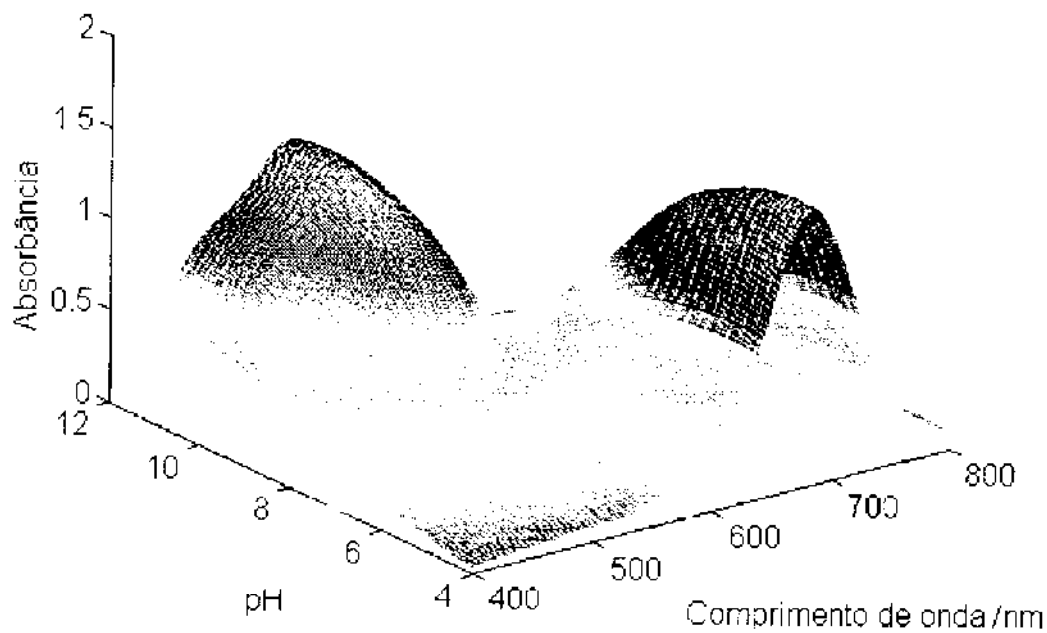


Figura 3.03 - Simulação da das quatro espécies simultaneamente.

3.5.1 - Simulação de dados usando o RA (Rank Annihilation)

Considerou-se a matriz **M** (relativa à amostra desconhecida) como sendo a composição formada pelo produto dos quatro espectros pelos quatro perfis de concentração (figura 3.03). A matriz **N** (relativa à amostra padrão) foi gerada pela composição entre o segundo espectro e o segundo perfil de concentração multiplicados por uma constante igual a 0,75 (para simular diferenças entre as concentrações da segunda espécie na amostra padrão e na amostra desconhecida). A figura 3.06 mostra a superfície de resposta formada pela matriz **N**.

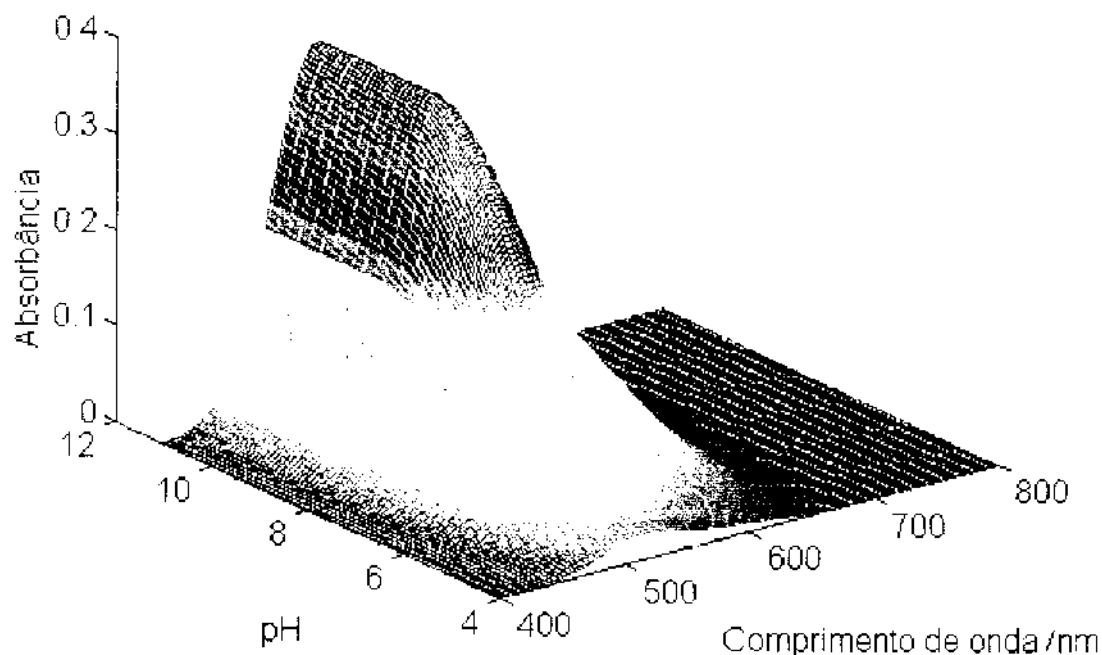


Figura 3.04 - Simulação da superfície de resposta para a amostra padrão

Através do modelo de aniquilação de posto (RA) obteve-se a estimativa da razão entre a concentração da segunda espécie na amostra padrão e na amostra desconhecida cujo valor de R (C_n/C_m) forneceu 0,75. Como a resposta deveria ser 0,75, pode-se dizer que o modelo conseguiu diferenciar completamente os demais componentes na amostra desconhecida.

Porém os dados reais apresentam ruídos aleatórios nas medidas, e pode-se simular isso acrescentando matrizes randômicas (de mesma dimensão) aos dados das matrizes N e M . Os ruídos acrescentados nas duas matrizes foram simulados para ter amplitude máxima igual a 1% do maior valor em cada superfície. Os ruídos acrescentados são distribuídos uniformemente ao longo da amplitude máxima do ruído, ou seja, não seguem uma distribuição normal. Desse modo os mesmos são mais influentes nas distorções dos dados.

Utilizando o RA nesses dados simulados obtém-se $R = C_n/C_m = 0,6769$. Como teoricamente deveria se obter 0,75, isso implica num erro de 9,74%. É interessante observar que um ruído aleatório de máximo 1% do maior valor da superfície é relativamente grande na região da superfície onde não se encontram sinais altos. Esses resultados parecem indicar que este método é muito sensível a ruídos nos dados.

3.5.2 - Simulação de dados usando o GRAM (Generalized Rank Annihilation Method) com transformação de similaridade

Considerando as mesmas matrizes de dados simulados utilizadas para a modelagem com o RA, modelando-se com o GRAM obtém-se a razão entre a concentração do segundo componente na amostra desconhecida e na amostra padrão $R = C_m/C_n = 1,3333$, quando deveria ser de 1,3993, ou seja, um erro de 4,95%.

É interessante observar que a razão obtida pelo GRAM é o inverso da razão obtida com o RA, pois no RA as componentes principais da amostra desconhecida formam uma base para a representação da matriz **N** (referente a amostra padrão), e a equação de autovalores e autovetores formada é definida de modo a obter C_n / C_m .

Com o GRAM pode-se estimar também os espectros e os perfis de concentração puros dos elementos em comum. As figuras 3.07 e 3.08 mostram essas estimativas para o segundo componente (o único em comum nas duas amostras).

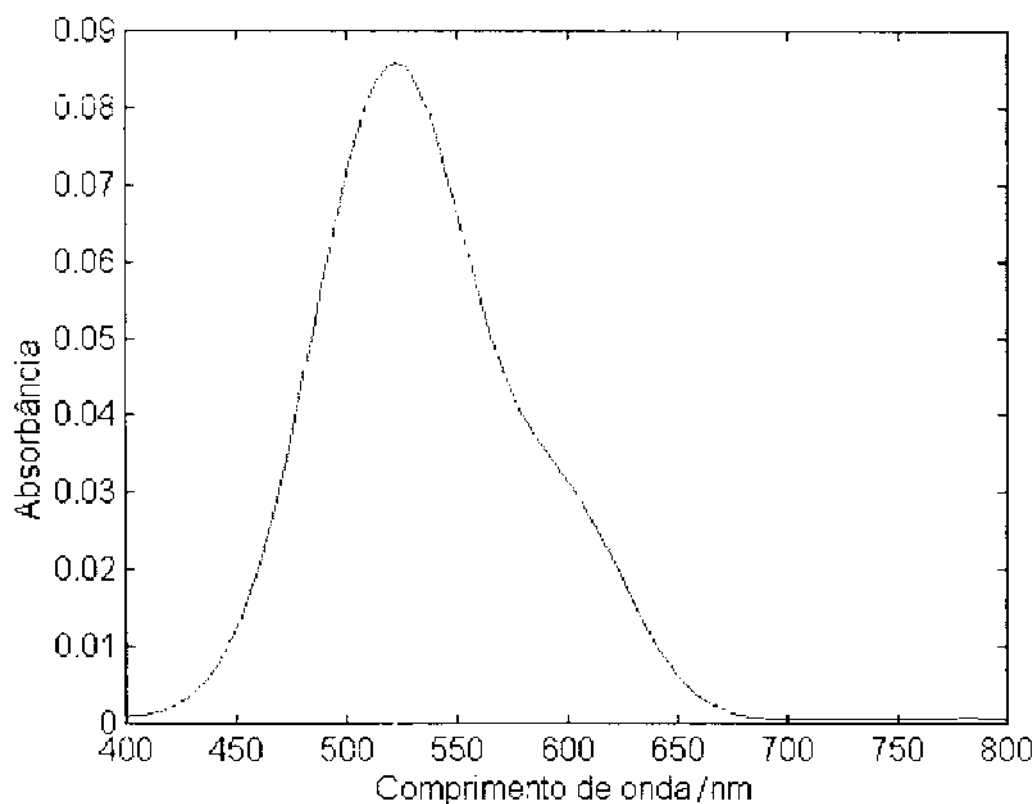


Figura 07 - Espectro do componente puro estimado pelo GRAM.

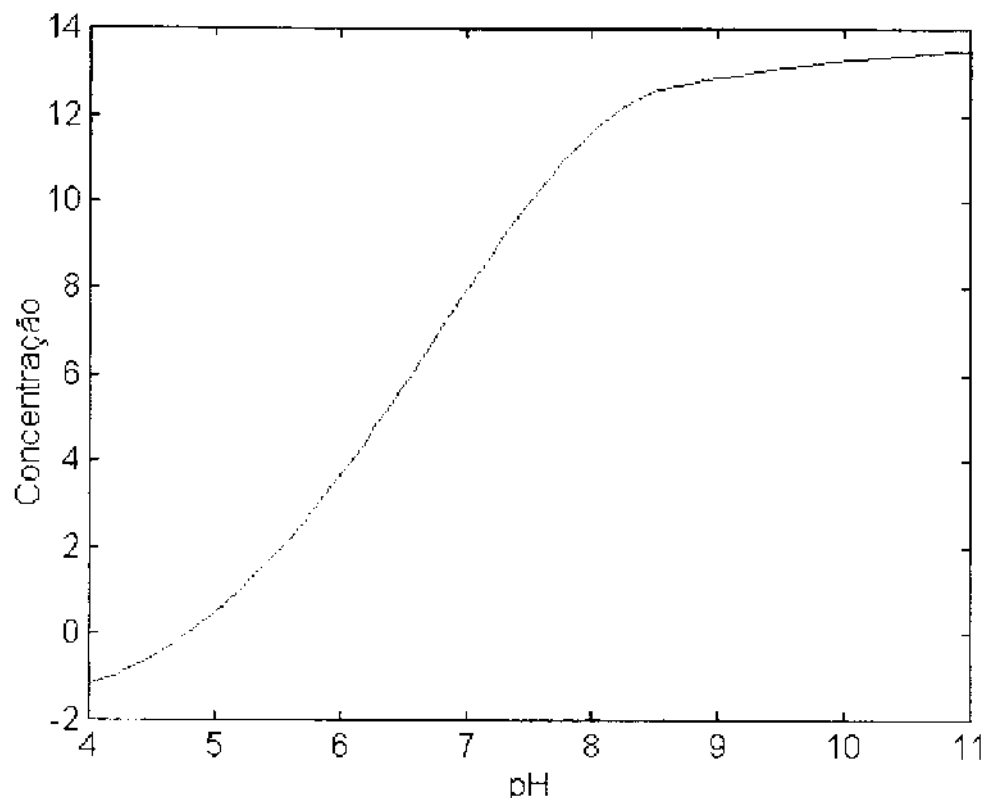


Figura3.08 - Perfil de concentração do componente puro estimado pelo GRAM.

Para um caso mais geral de simulação com o método generalizado de aniquilação de ordens GRAM, tomou-se o produto dos três primeiros vetores da matriz de espectros pelos três primeiros vetores da matriz de perfis de concentração acrescido de um erro aleatório máximo de 1% do maior valor da matriz de dados para formar a matriz de simulação de resposta da amostra padrão (**N**), e o somatório do produto dos dois primeiros e do quarto vetor da matriz de espectros pelos dois primeiros e quarto vetor da matriz de perfis de concentração multiplicados pelas constantes 0,5; 0,7 e 1,7 respectivamente também acrescidos de um ruído aleatório de no máximo 1% do maior valor da matriz de dados para formar a matriz de simulação de resposta da amostra “desconhecida” **M**. Nessa simulação o terceiro e o último vetores não são comuns às duas amostras de modo que o modelo GRAM, apenas consegue identificar e quantificar os dois primeiros elementos em comum, e a razão calculada pelo modelo deve ser de 0,5 e 0,7 respectivamente para os dois elementos em comum.

As figura 3.09 e 3.10 mostram essas superfícies com seus respectivos ruídos aleatórios para a amostra padrão e para a amostra desconhecida.

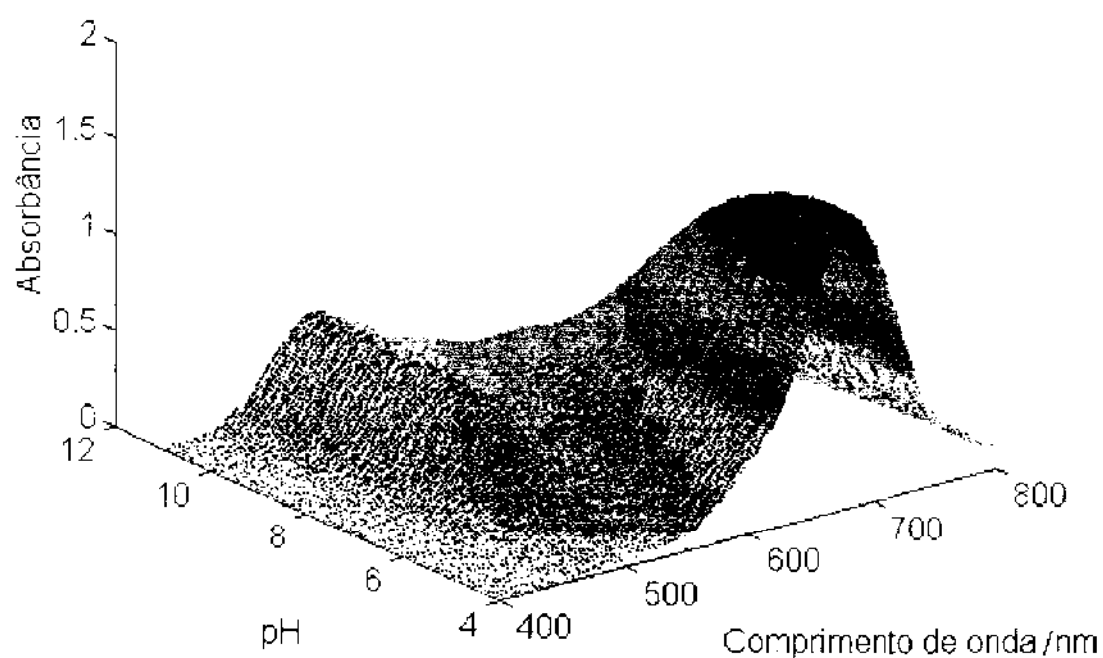


Figura 3.09 - Simulação da superfície de resposta para a amostra padrão com ruído aleatório

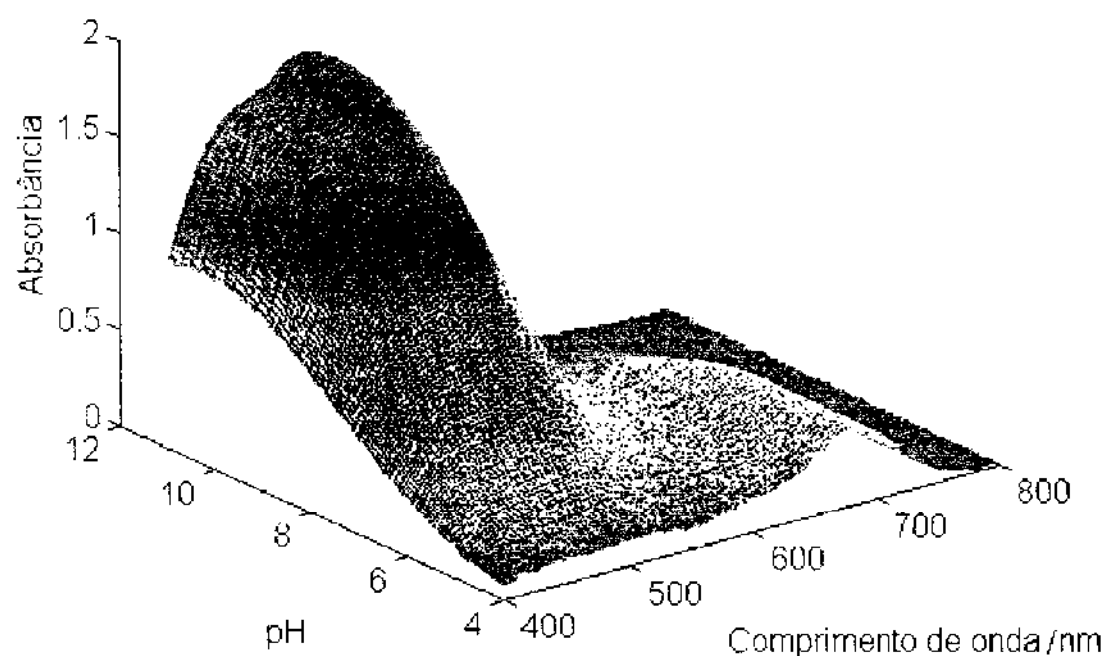


Figura 3.10 - Simulação da superfície de resposta da amostra desconhecida com ruído aleatório

Para o primeiro componente em comum entre a amostra padrão e a amostra desconhecida, o GRAM estimou a razão como $R = C_m/C_n = 0,5487$, quando deveria ser de 0,5 , ou seja, um erro de 9,75%. Para o segundo componente em comum entre as amostras, o GRAM estimou a razão como $R = C_m/C_n = 0,7127$, quando deveria ser de 0,7 , ou seja, um erro de 1,82%.

3.6 - Aplicação dos modelos às superfícies de dados experimentais

Tomando espectros das amostras (misturas de indicadores) ao longo do gradiente de pH construído na linha de fluxo, obteve-se uma superfície de respostas para cada amostra. As variáveis que controlam o gradiente de pH foram otimizadas conforme descrito anteriormente. Todas as superfícies de resposta foram tomadas nas mesmas condições, ou seja, com o gradiente de pH gerado com os mesmos parâmetros.

A tabela 3.1 mostra a composição das amostras utilizadas para a aquisição das superfícies de resposta.

Tabela 3.1 - Concentração dos indicadores nas misturas utilizadas para a aquisição de dados experimentais.

Amostra	Timolftaleína (10^{-3} mol/L)	Fenolftaleína (10^{-2} mol/L)	Azul de bromotimol (10^{-3} mol/L)	Vermelho de metila (10^{-3} mol/L)
Am01	-	2,40	-	-
Am02	1,70	2,00	-	10,00
Am03	-	-	-	8,00
Am04	1,20	1,10	3,50	11,50
Am05	-	1,90	6,00	15,00
Am06	1,50	1,30	-	-
Am07	1,00	2,50	9,00	-
Am08	1,30	1,50	-	12,00

A tabela 3.2 mostra a faixa de viragem dos indicadores utilizados nas amostras.

Tabela 3.2 - Características dos indicadores [49] utilizados nas amostras

Indicador	Intervalo de pH da faixa de viragem	Cor em meio ácido	Cor em meio básico
vermelho de metila	4,2 - 6,3	vermelho	amarelo
azul de bromotimol	6,0 - 7,6	amarelo	azul
fenolftaleína	8,3 - 10,0	incolor	vermelho
timolftaleína	8,3 - 10,5	incolor	azul

3.6.1 - Modelagem de dados experimentais com o RA (*Rank Annihilation*)

Para a modelagem com o RA utilizou-se inicialmente as matrizes de dados relativos às superfícies de resposta das amostras Am01 e Am02. A amostra Am01 foi utilizada como o padrão e a amostra Am02 foi utilizada como a amostra “desconhecida”. Em seguida utilizou-se a amostra Am03 como padrão e Am04 como amostra desconhecida. Como as soluções foram preparadas em laboratório, pode-se estimar o erro na previsão da concentração dos indicadores presentes nos dois pares de amostras (vermelho de metila e fenolftaleína respectivamente). A figura 3.13 mostra as superfícies de resposta relativas às quatro amostras.

A tabela 3.3 mostra os resultados obtidos com a modelagem dos dois pares de amostras (independentemente) com o modelo RA.

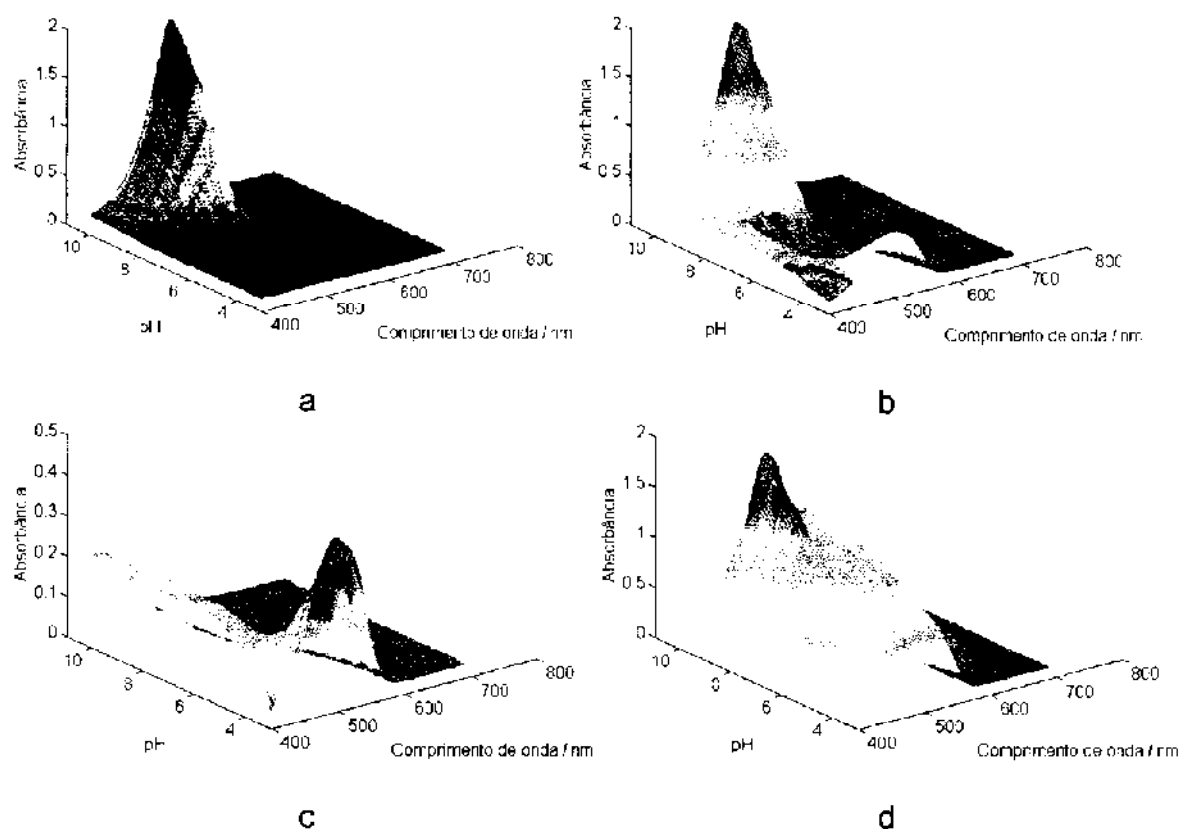


Figura 3.13 - Superfícies de resposta para as amostras Am01 (a), Am02 (b), Am03 (c) e Am04 (d).

Tabela 3.3 - Resultados da modelagem com o RA.

Amostra desconhecida (M)	Amostra padrão (N)	Número de componentes principais (CP)	Valor real da razão entre as concentrações (C_r/C_m)	Valor estimado para a razão entre as concentrações	Erro relativo na estimativa
Am02	Am01	4	1,20	1,18	2,00%
Am04	Am03	5	0,70	0,98	40,72%

No primeiro caso foi feita a estimativa da concentração de fenolftaleína na amostra “desconhecida” Am02 (contendo fenolftaleína, timolftaleína e vermelho de metila) a partir de um padrão de fenolftaleína (amostra Am01), utilizando o RA. Nesse caso a estimativa não apresenta maiores dificuldades, pois a superfície de resposta da amostra padrão pode ser descrita por uma única componente

principal. Desse modo o modelo RA consegue prever bem a estimativa da concentração.

No segundo caso, fez-se a estimativa da concentração do indicador vermelho de metila presente na amostra "desconhecida" Am04 (contendo fenolftaleína, timolftaleína, azul de bromotimol e vermelho de metila), a partir da amostra Am03 (padrão de vermelho de metila), utilizando o RA. A estimativa da previsão apresentou um erro muito alto. Isso se deve ao fato de que a superfície de resposta do vermelho de metila não pode ser descrita com apenas uma componente principal. Ao longo do gradiente de pH o indicador passa de uma cor para outra, ou seja, existem duas espécies com espectros diferentes e perfis de concentração diferentes, o que necessita de no mínimo duas componentes principais para a modelagem. Como o modelo de RA utilizado (apêndice 5) exige que o padrão seja descrito por apenas uma componente principal, não se conseguiu estimar a concentração do indicador satisfatoriamente.

A escolha do número de componentes principais a ser considerado em cada caso é feita através da decomposição em valores singulares realizada na matriz de dados relativos à amostra desconhecida (que serve de base para o espaço vetorial no qual as amostras são projetadas). O número de componentes principais é igual ao número de valores singulares representativos.

3.6.2 - Modelagem de dados experimentais com o GRAM (Generalized Rank Annihilation Method) com transformação de similaridade

Para a modelagem com o GRAM foram utilizadas todas as oito amostras em cinco pares. A tabela 3.4 mostra as condições usadas na modelagem bem como os resultados obtidos.

Tabela 3.4 - Condições e resultados da modelagem com o GRAM

Amostra (M)	Padrão (N)	Número de CP	CP considerado na estimativa (indicador estimado)	Valor real da razão entre as concentrações (C_m/C_n)	Valor estimado para a razão entre as concentrações	Erro relativo na estimativa
Am02	Am01	4	3 (fenolftaleína)	0,833	0,838	0,55%
Am03	Am04	5	2 (vermelho de metila)	1,44	1,36	4,82%
Am05	Am06	5	3 (fenolftaleína)	1,46	1,49	2,00 %
Am07	Am02	5	4 (fenolftaleína)	1,25	1,24	0,55%
Am04	Am08	4	3 (fenolftaleína)	0,733	0,770	5,08%
			2 (vermelho de metila)	0,958	1,079	12,57%

Com o modelo GRAM, além da razão entre as concentrações, também é possível estimar os espectros puros e os perfis de concentração em função do pH para os analitos presentes em comum na amostra desconhecida e na amostra padrão. Dessa forma foram estimados os espectros e perfis de concentração puros e registrados na forma de gráficos. Através da estimativa dos espectros e perfis de concentração gerados para as amostras é possível identificar o componente principal relativo ao analito que se deseja quantificar, e desse modo proceder a quantificação.

No primeiro caso fez-se a estimativa da concentração de fenolftaleína na amostra “desconhecida” Am02 (contendo fenolftaleína, timolftaleína e vermelho de metila) a partir de um padrão de fenolftaleína (amostra Am01) utilizando o GRAM.

Nesse caso o GRAM consegue prever bem a concentração do indicador. A previsão realizada é melhor que com o RA, pois como o GRAM considera que a amostra padrão pode ter mais de uma componente principal, há uma separação parcial entre o sinal e o ruído experimental. A figura 3.14 mostra as superfícies de resposta das amostras Am01 e Am02, bem como a estimativa do espectro e do perfil de concentração para a fenolftaleína.

Realizou-se também a modelagem com as superfícies de resposta com as mesmas amostras, invertendo as posições: a amostra Am01 passou a ser a amostra "desconhecida" e a amostra Am02 passou a ser a amostra padrão. Nesse caso, obteve-se o mesmo erro na previsão (0,55%) e os mesmos espectro e perfil de concentração recuperados. O valor previsto para a razão entre as concentrações passou a ser 0,838, quando deveria ser 0,833.

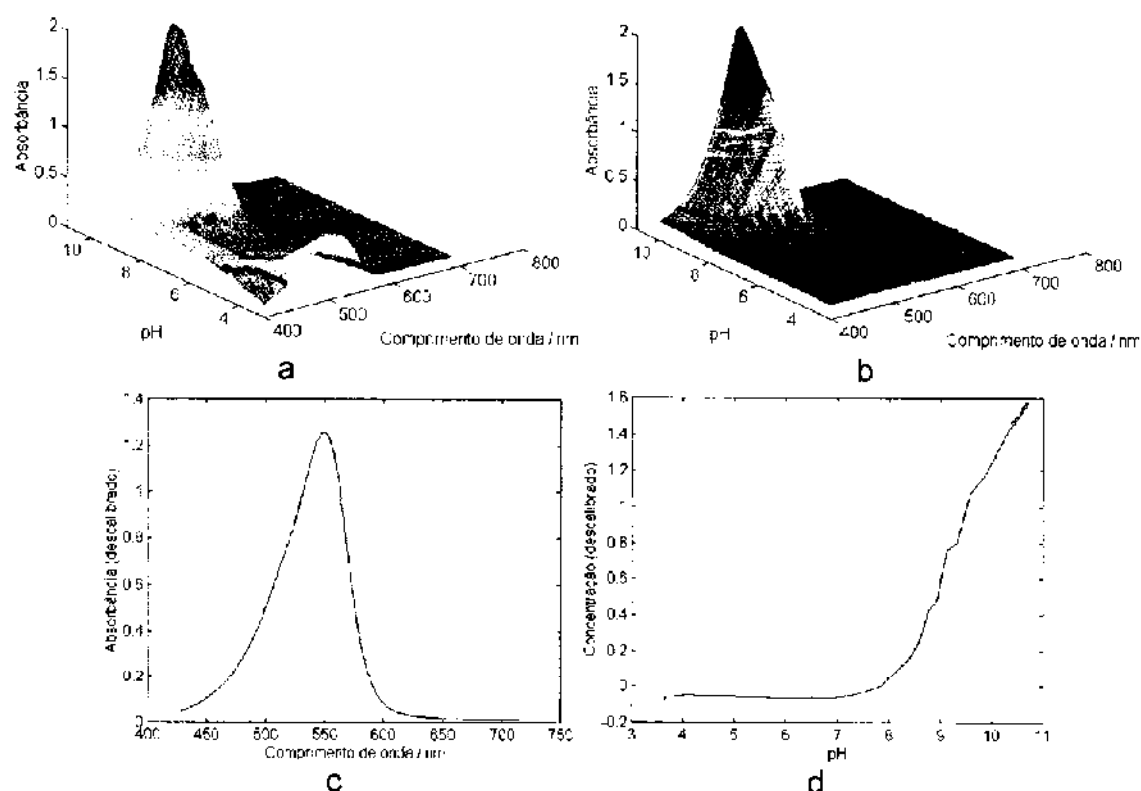


Figura 3.14 - Superfícies de resposta relativas a amostra "desconhecida" Am02 (a) e amostra padrão Am01 (b); e espectros do indicador (c) (fenolftaleína) e seu perfil de concentração (d) ambos recuperados pelo modelo GRAM.

No segundo caso, foi realizada a estimativa da concentração do indicador vermelho de metila presente na amostra "desconhecida" Am04 (contendo fenolftaleína, timolftaleína, azul de bromotimol e vermelho de metila) a partir da amostra Am03, padrão de vermelho de metila, utilizando o GRAM.

Como o modelo GRAM separa as componentes principais tanto da amostra desconhecida quanto na amostra padrão, não há problemas se a amostra padrão é composta por duas componentes principais.

A superfície de resposta do vermelho de metila apresenta basicamente duas componentes principais, sendo a primeira responsável pelo espectro após a virada do indicador e a segunda pelo espectro antes da virada. Isso pode ser comprovado analisando-se as matrizes formadas pela decomposição em valores singulares da matriz relativa à amostra Am03. A figura 3.15 mostra as superfícies formadas pelas duas primeiras componentes principais da amostra Am03 respectivamente.

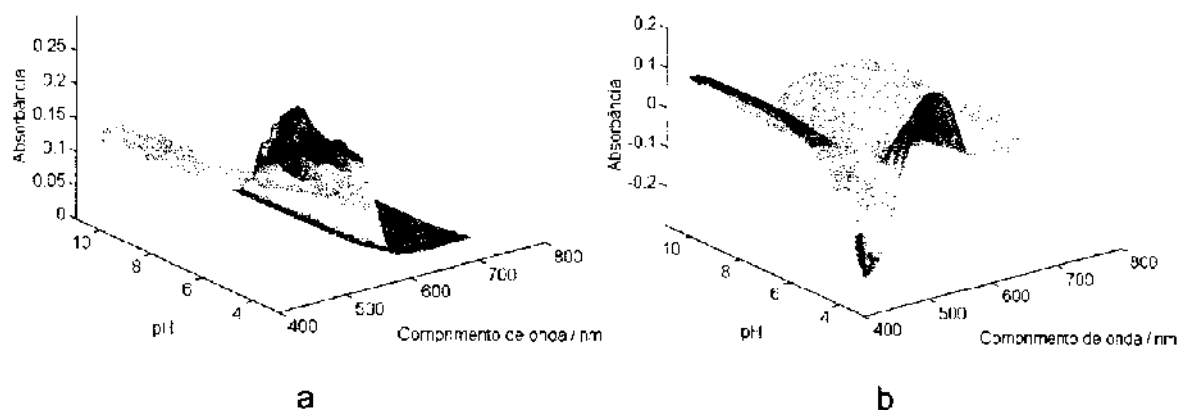


Figura 3.15 - Superfície de resposta da primeira componente principal da amostra Am03 (a) (vermelho de metila após a virada) e superfície de resposta da segunda componente principal da amostra Am03 (b) (vermelho de metila antes da virada).

A espécie responsável pelo espectro do vermelho de metila após a virada é muito correlacionada com outras espécies, devido à faixa de pH onde ocorre, de modo que apenas uma componente principal explica a resposta (espectro) das espécies correlacionadas. Desse modo, para a quantificação do vermelho de metila utilizando o GRAM, optou-se pela componente principal relativa à espécie existente antes da virada do indicador, a qual não é correlacionada com as demais espécies existentes no sistema. A figura 3.16 mostra as superfícies de respostas modeladas no segundo caso, bem como o espectro puro e o perfil de concentração puro para a espécie quantificada com o GRAM no segundo caso.

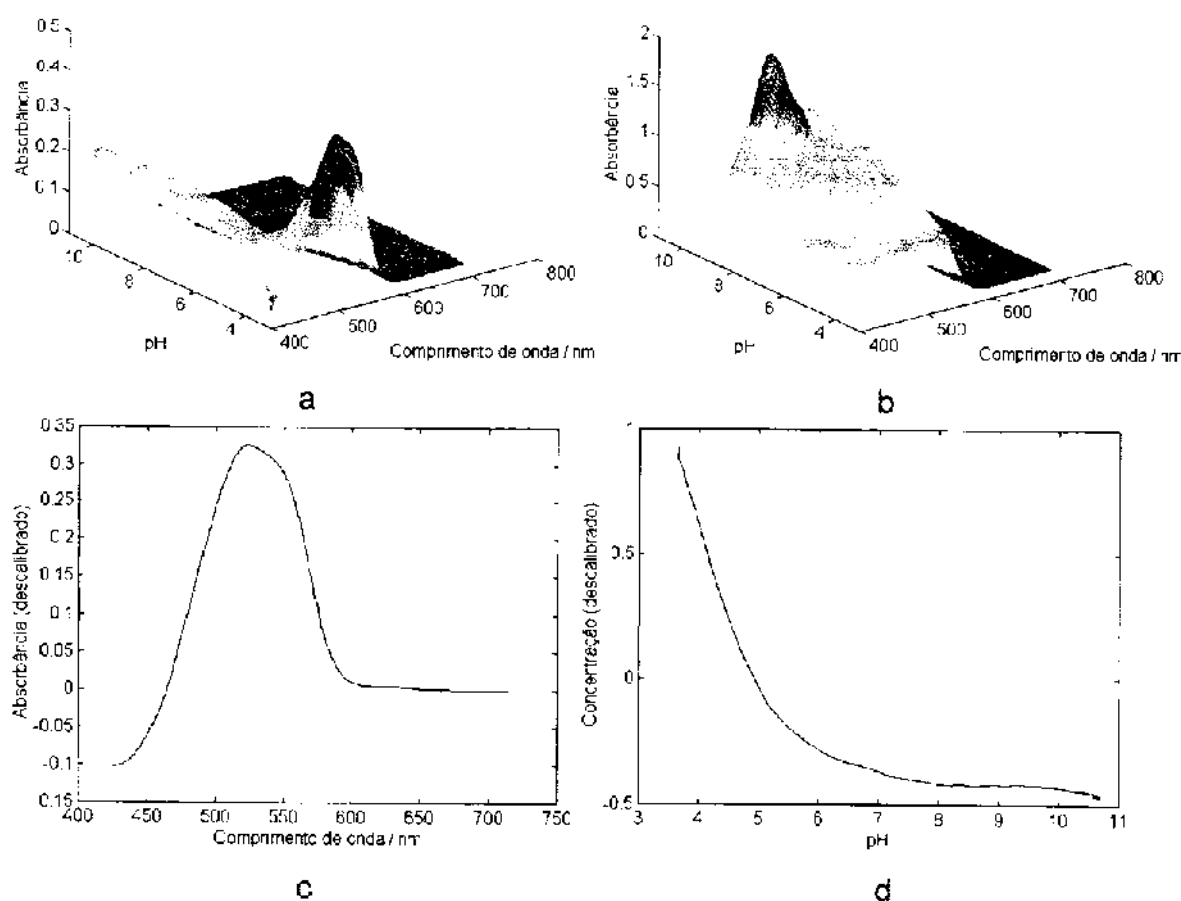


Figura 3.16 - Superfícies de resposta relativas a amostra Am03 padrão (a) e amostra Am04 desconhecida (b); e espectros do indicador (vermelho de metila) (c) estimado pelo modelo GRAM, bem como seu perfil de concentração (d) também estimado pelo modelo GRAM.

No terceiro caso, foi feita a estimativa da concentração do indicador fenolftaleína em uma amostra "desconhecida" (Am05) contendo fenolftaleína, azul de bromotimol e vermelho de metila a partir de uma amostra padrão (Am06) contendo fenolftaleína e timolftaleína. Nesse caso, a amostra "desconhecida" possui espécies que a amostra padrão não possui, e vice versa, ou seja, não se pode utilizar o RA para quantificar espécies com essas amostras.

Utilizando o GRAM há a separação nas componentes principais das duas amostras, e facilmente pode-se quantificar a fenolftaleína (única espécie comum tanto no padrão quanto na amostra "desconhecida").

A figura 3.17 mostra as superfícies de resposta da amostra "desconhecida" Am05 e da amostra padrão Am06, bem como o espectro e o perfil de concentração puros estimados pelo GRAM no terceiro caso.

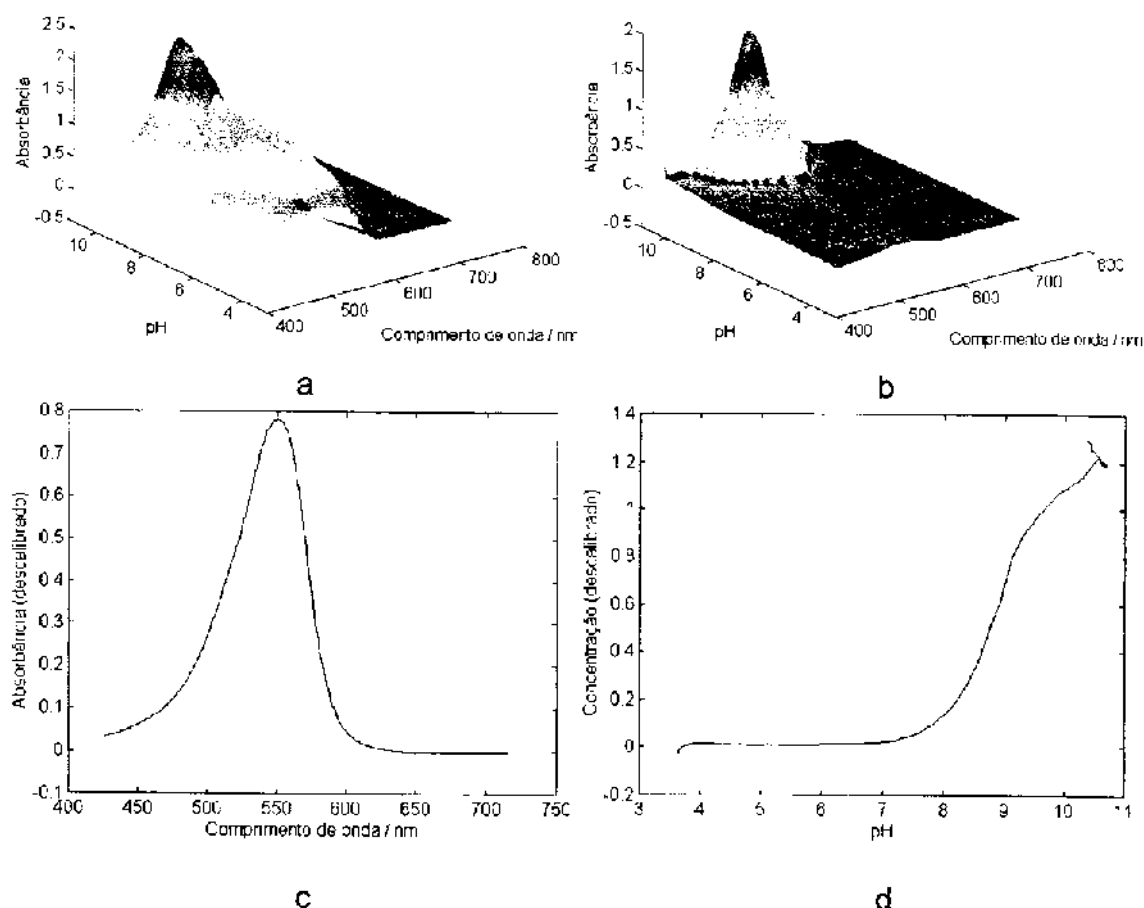


Figura 3.17 - Superfícies de resposta relativas a amostra Am05 desconhecida (a) e amostra Am06 padrão (b); e espectros do indicador (fenolftaleína) (c) estimado pelo modelo GRAM, bem como seu perfil de concentração (d) também estimado pelo modelo GRAM.

No quarto caso fez-se a estimativa da concentração de fenolftaleína em uma mostra “desconhecida” (Am07) contendo timolftaleína, fenolftaleína e azul de bromotimol a partir de uma amostra padrão (Am02) contendo timolftaleína, fenolftaleína e vermelho de metila.

Nesse caso, embora existam duas espécies comuns às amostras, somente foi possível quantificar satisfatoriamente a fenolftaleína. Isto é explicado pelo alto grau de sobreposição entre o espectro da timolftaleína e os espectros das demais espécies. A timolftaleína possui uma ampla faixa de absorbância, ou seja, não há uma região de absorbância bem localizada, de modo que o GRAM não consegue estimar seu espectro puro satisfatoriamente.

A figura 3.18 mostra as superfícies de resposta da amostra “desconhecida” Am07 e da amostra padrão Am02, bem como o espectro e o perfil de concentração puros do indicador (fenolftaleína) estimados pelo GRAM no quarto caso.

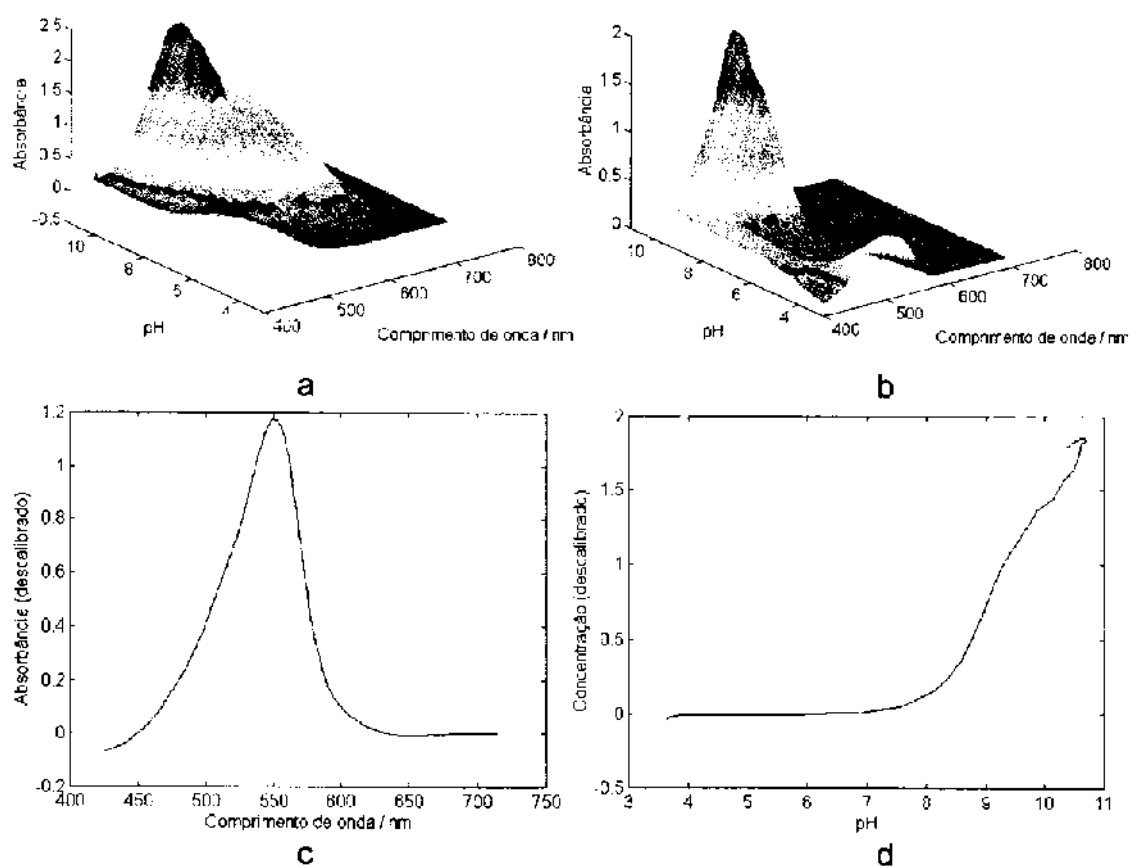


Figura 3.18 - Superfícies de resposta relativas a amostra Am07 desconhecida (a) e amostra Am02 padrão (b); e espectros do indicador (fenolftaleína) (c) estimado pelo modelo GRAM, bem como seu perfil de concentração (d) também estimado pelo modelo GRAM.

No quinto caso foi feita a estimativa simultânea da concentração dos indicadores fenolftaleína e vermelho de metila em uma amostra "desconhecida" (Am04) contendo timolftaleína, fenolftaleína, azul de bromotimol e vermelho de metila, a partir de uma amostra padrão (Am08) contendo timolftaleína, fenolftaleína e vermelho de metila. Novamente não foi possível quantificar a timolftaleína devido à alta sobreposição entre o espectro da timolftaleína e dos demais componentes.

A figura 3.19 mostra as superfícies de resposta da amostra "desconhecida" Am04 e da amostra padrão Am08, bem como o espectro e o perfil de concentração puros dos dois indicadores (fenolftaleína e vermelho de metila) estimados pelo GRAM.

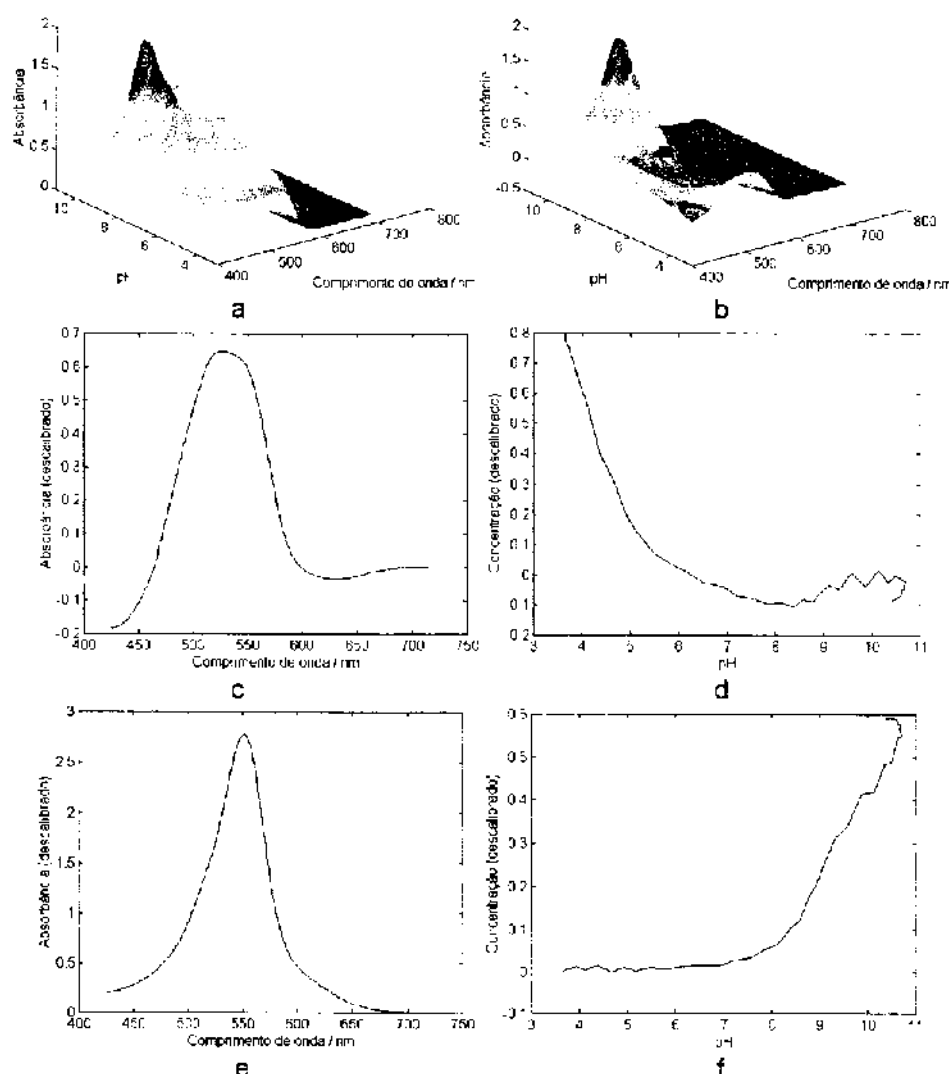


Figura 3.19 - Superfícies de resposta relativas a amostra Am04 desconhecida (a) e amostra Am08 padrão (b); espectro do indicador vermelho de metila e (c) seu perfil de concentração (d); e espectro do indicador fenolftaleína (e) e seu perfil de concentração estimados pelo GRAM.

Baseado nas estimativas dos cinco casos citados, fez-se uma comparação entre os espectros puros das amostras Am03 (vermelho de metila) e Am01 (fenolftaleína) e suas respectivas estimativas. O grau de exatidão dos valores estimados pelo GRAM é proporcional à precisão que se tem nas estimativas dos espectros puros. As figuras 3.20 e 3.21 mostram esse estudo.

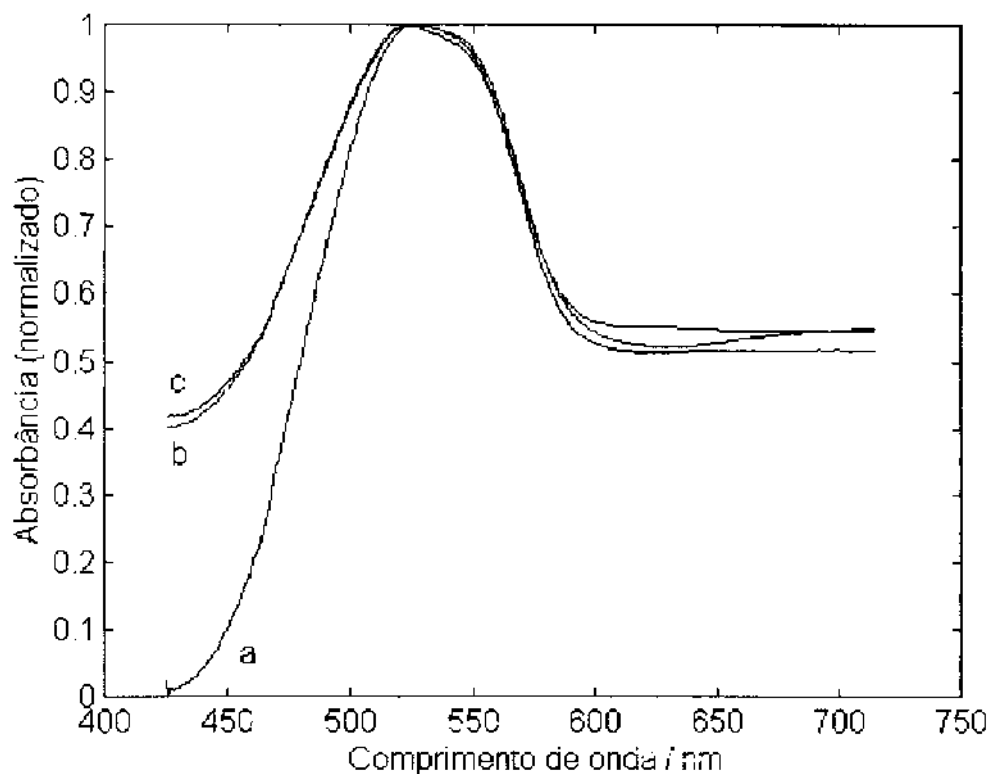


Figura 3.20 - Comparação entre o espectro puro da espécie responsável pelo espectro do vermelho de metila em meio ácido (a) e suas estimativas no segundo caso (b) e no quinto caso (c).

Como o vermelho de metila possui duas componentes principais e foi utilizada somente a segunda componente principal, aparecem no espectro valores de absorvância negativos na faixa de 425 a 480 nm. Isso ocorre porque a absorvância relativa a essa faixa de comprimentos de onda é explicada em sua maioria pela primeira componente principal, a qual não foi utilizada na quantificação do vermelho de metila por ser muito correlacionada com outras espécies presentes nas misturas. A primeira componente principal apresenta valores relativamente altos nessa faixa de comprimentos de onda para a

faixa mais ácida de pH (figura 3.15), logo para a composição das componentes principais explicar bem a resposta do indicador como um todo, a segunda componente principal assume valores negativos de modo a cancelar (parcialmente) o sinal nessa faixa de pH e de comprimento de onda. Na estimativa do vermelho de metila a partir de misturas, a componente principal relativa à espécie correspondente ao vermelho de metila em meio ácido está correlacionada com outras espécies, logo a mesma não apresenta esse tipo de comportamento, e consequentemente não há valores muito negativos para as estimativas da segunda componente principal do vermelho de metila a partir de misturas.

Apesar da grande diferença entre os espectros na faixa de 425 a 525 nm, a forma do espectro como um todo se assemelha bastante e as duas estimativas, em casos diferentes, são praticamente idênticas.

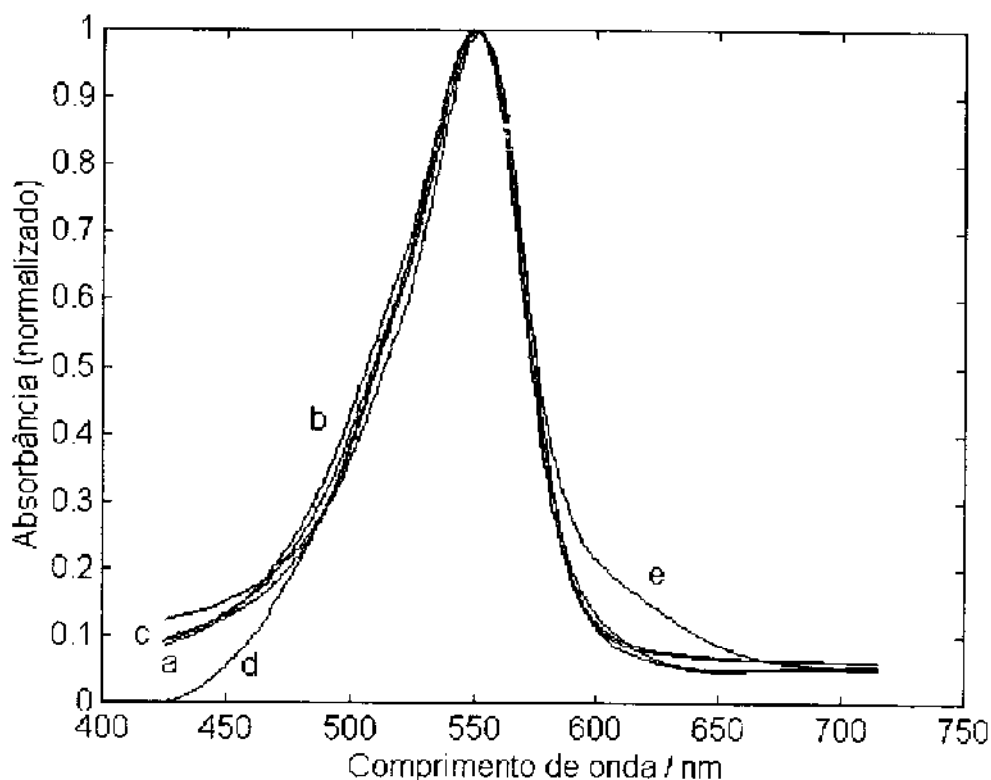


Figura 3.21 - Comparação entre o espectro puro da espécie responsável pelo espectro da fenolftaleína em meio básico (a) e suas estimativas no primeiro caso (b), no terceiro caso (c), no quarto caso (d) e no quinto caso (e).

Com exceção do quinto caso, onde se fez a determinação de duas espécies simultaneamente, os espectros puros estimados para a fenolftaleína foram praticamente idênticos ao espectro medido experimentalmente. Mesmo no quinto caso a forma do espectro assemelha-se bastante com o espectro medido experimentalmente.

Conclusão

Baseado nos procedimentos de avaliação do espectrofotômetro construído, observa-se que o mesmo é capaz de realizar medidas espectrofotométricas reprodutivas e confiáveis em tempos relativamente curtos. Isso abre um leque de possíveis aplicações, dentre as quais como unidade de detecção em sistemas de fluxo. Além do custo reduzido, o mesmo apresenta grande versatilidade no que se refere à adaptação à metodologias existentes, bem como à criação de novas metodologias.

A utilização de um gradiente de concentração (gradiente de pH) gerado por dispersão em um sistema de fluxo possibilita a quantificação de misturas de espécies dependentes do pH do meio. Essa quantificação é tão mais confiável quanto maior for a separação dos sinais referentes às espécies, daí a necessidade de se otimizar o gradiente formado. Isso permite o surgimento de novas técnicas de análises em sistemas de fluxo.

Através do método generalizado de aniquilação de posto é possível quantificar espécies em misturas utilizando técnicas que geram dados bilineares. A decomposição em valores singulares extrai os constituintes puros (espectros e perfis de concentração, no caso) dos dados bilineares filtrando ruídos experimentais e aumentando a capacidade de diferenciação de sinais provenientes de espécies distintas. Desse modo consegue-se quantificar mesmo espécies com relativa sobreposição nos dados e com a presença de interferentes.

Perspectivas de trabalhos futuros

Utilizando um gradiente de pH como elemento de separação de espécies, pode-se aplicar o sistema desenvolvido à quantificação de metais na forma de complexos metálicos cujas constantes de formação variem com o pH. Para tanto, os complexos metálicos devem absorver na região visível do espectro e devem possuir espectros suficientemente distintos. Nessas condições é possível modelar essas superfícies de resposta com o GRAM e quantificar seus constituintes.

Além da aplicação em sistemas que dependem do pH, pode-se desenvolver outros processos de separação que não o gradiente de pH. Um desses exemplos é a combinação de técnicas eletroquímicas com as espectroscópicas. Com o controle de um potenciostato pelo computador, e utilizando celas espectroeletroquímicas, pode-se gerar superfícies de resposta da absorbância em função do potencial elétrico aplicado e do comprimento de onda. Desde que os sistema em análise tenham alguma dependência com o potencial aplicado, pode-se utilizar o GRAM para modelar e quantificar espécies nesses sistemas.

Referências bibliográficas

1. M. Valcárcel e M. D. Luque de Castro, "Automatic Methods of Analysis", Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1988.
2. M. Blanco, J. Gene, H. Ituriaga, S. Maspach e J. Riba, "Diode-Array Detectors in Flow Injection Analysis - Mixture Resolution by Multi-Wavelength Analysis", *Talanta* **34** 987-993 (1987).
3. E. H. Hansen, "Exploitation of Gradient Techniques in Flow Injection Analysis", *Fresenius Z. Anal. Chem.* **329** 656-659 (1988).
4. D. Betteridge e B. Fields, "The Application of pH Gradients in Flow Injection Analysis. A Method for Simultaneous Determination of Binary of Metals in Solution", *Anal. Chim. Acta* **132** 139-155 (1981).
5. J. Ruzicka, E. H. Hansen e H. Mosback, "Flow Injection Analysis. Part IX. A New Approach to Continuous Flow Titration", *Anal. Chim. Acta* **92** 235-249 (1977).
6. I. Lukkari e W. Lindberg, "Multicomponent Determination in Flow Systems by Partial Least Squares Modelling" *Anal. Chim. Acta* **211** 1-10 (1988).
7. M. A. Sharaf, D. L. Ilman e B. R. Kowalski, "Chemometrics", Wiley, New York, 1986.
8. P. MacLaurin, P. J. Worsfold, P. Norman e M. Crane, "Partial Least Squares of Multianalyte Flow Injection Data", *Analyst* **118** 617-622 (1993).
9. B. C. Erickson, J. Ruzicka e B. R. Kowalski, "Resolution of Chemical Species in Flow Injection Analysis by using Self-Modelling Curve Resolution", *Anal. Chim. Acta* **218** 303-311 (1989).

10. C. Ridder e L. Norgaard, "Simultaneous determination of Cobalt and Nickel by Flow Injection Analysis and Partial Least Squares Regression with Outlier Detection", *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 14 297-303, (1992).
11. P. Geladi e B. R. Kowalski, "Partial Least Squares Regression: A Tutorial", *Anal. Chim. Acta* 185 1-17 (1986).
12. K. R. Beebe e B. R. Kowalski, "An Introduction to Multivariate Calibration and Analysis", *Anal. Chem.* 59 1007A-1017A (1987).
13. N. Draper e H. Smith, "Applied Regression Analysis", 2^a ed., Wiley, New York, 1981.
14. P. Geladi, "Analysis of Multi-Way (Multi-Mode) Data", *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 7 11-30 (1989)
15. A. K. Smilde, P. H. Van der Graaf, D. A. Doornbos, T. Steerneman e A. Sleurink, "Multivariate Calibration of Reversed-Phase Chromatographic Systems. Some Designs Based on Three-Way Data Analysis", *Anal. Chim. Acta* 235 41-51 (1990).
16. Y. Zeng e P. K Hopke, "Methodological Study applying Three-Mode Factor Analysis to Three-Way Chemical Data Sets", *Intell La. Syst.* 7 237-250 (1990).
17. P. Geladi, H. Isaksson, L. Lindqvist, S. Wold e K Esbensen, "Principal Component Analysis on Multivariate Images", *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 5 209-220 (1989).
18. S. Wold, P. Geladi, K. Esbenson e J. Öhman, "Multi-Way Principal Component and PLS Analysis", *J. Chemom.* 1 41-56 (1987).
19. B. E. Wilson, E. Sanchez e B. R. Kowalski, "An Improved Algorithm for the Generalized Rank Annihilation Method", *J. Chemom.* 3 493-498 (1989).

20. J. Öhman, P. Geladi e S. Wold, "Residual Bilinearization. Part1: Theory and Algorithms", J. Chemom. 4 79-90 (1990).
21. Douglas A. Skoog e James J. Leary, "Principles of Instrumental Analysis", Saunders College Publishing, New York, (1992).
22. K. W. Buch e M. A. Buch, "Multielement Detection Systems for Spechthrochemical Analysis, John Wiley, New York, (1990).
23. Catálogo EG&G Reticon - "Solid State line Scanners - S series -128, 256, 512 and 1024 elements".
24. F. Lázaro; A. Rios; M. D. Luque de Castro e M. Valcárcel, "Diode Array Detectors in Dinamic Analytical Systems", Analisis, 14 378-388 (1986).
25. Microsoft Visual Basic V. 3.0, Microsoft Co.,(1993).
26. PC-Labcard, PCL 711B, Advantech Co., (1993).
27. Microsoft Visual C++ V. 2.0, Microsoft Co.,(1995).
28. T. C. O'Haver, "An Introduction to Signal Processing in Chemical Measurements", J. Chem. Educ., 68 A147-A150, (1991).
29. J. Ruzika e E. H. Hansen, "Flow Injection Analysis", Wiley, New York, (1968).
30. David J. e Malcolm Lawes, "Microcomputers and Laboratory Instrumentation", Plenum Press, New York and London, 2nd Edition.
31. E. O. de Cerqueira e R. J. Poppi, "Using Dinamic Data Exange to Exange Information Between Visual Basic and Matlab", Trends in Analytical Chemistry", 15 500-503, (1996).
32. Matlab for Windows V. 4.2.1.c, The Math Works Inc.,(1994).
33. Standard Methods for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet, Visible and Near Infrared Spectrophotometers", Annual Book of ASTM

- Standards, Vol 14.01, 1987, E 275-83, American Society for Testing and Materials (ASTM), Philadelphia, 408-423, (1987).
34. N. Baccan; J. C. Andrade; O. E. S. Godinho e J. S. Barone, "Química Analítica Quantitativa Elementar", Editora Edgard LTDA, São Paulo, (1979).
35. Y. Talmi, "Spectrophotometry and Spectrofluorometry with the Self-scanned Photodiode Array", Princeton Instruments Inc., New Jersey
36. Y. Talmi e R. W. Simpson, "Self-scanned Photodiode Array: A Multichannel Spectrometric Detector", *Applied Optics*, 19 1401-1414, (1980).
37. Y. Wang; O. S. Borgen; B. R. Kowalski; M. Gu e F. Turcek, "Advances in Second Order Calibration", *J. Chemom.*, 7 117-130, (1993).
38. D. D. Perrin e B. Dempsey, "Buffers for pH and Metal Ion Control", Editora Science Paperbacks, London, (1974).
39. T. Morita e R. M. V. Assumpção, "Manual de Soluções Reagentes & Solventes", Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo, (1972).
40. E. R. Malinowski, "Factor Analysis in Chemistry", Wiley, New York, (1991).
41. S. Wold, "Nonlinear Partial Least Squares Modelling II. Spline Inner Relation", *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 14, 71-84, (1992).
42. J. Zupan e J. Gasteiger, "Neural Networks for Chemists", VCH, Weinheim, (1993).
43. E. Sanches e B. R. Kowalski, "Generalized Rank Anihilation Factor Analysis", *Anal. Chem.*, 58 496-499, (1986).
44. E. Sanchez; L. Scott Ramos e B. R. Kowalski, "Generalized Rank Annihilation Method I. Application to Liquid Chromatography-Diode Array Ultraviolet Detection Data", *J. Chromatogr.*, 385 151-164, (1987).

-
45. E. Sanchez; L. Scott Ramos e B. R. Kowalski, "Generalized Rank Annihilation Method II. Analysis of Bimodal chromatographic Data", *J. Chromatogr.*, **385** 165-180, (1987).
46. Yu-Long Xie; J. J. Baeza e G.R. Ramos, "Second-order Tensorial Calibration for Kinetic Spectrophotometric determination", *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, **32** 215-232, (1996).
47. C. B. Molar e C. W. Stewart, *SIAM J. Numer. Anal.*, **10**, 241, (1973).
48. Shousong Li; C. Hamilton e P. J. Gemperline, "Generalized Rank Annihilation Method Using Similarity Transformations", *Anal Chem.*, **64** 599-607, (1992).
49. Basset; Denney; Jeffery e Mendham, "Análise Inorgânica Quantitativa", Editora Guanabara Dois, Rio de Janeiro, (1981).

Apêndices

1- Sub-rotina que executa a calibração temporal das estruturas de *loop*.

```
Sub DeleyCalib (Fact#)
```

```
    ti# = Timer
```

```
test:
```

```
    te# = Timer
```

```
    If te# = ti# Then
```

```
        GoTo test
```

```
    End If
```

```
    For I = 1 To 200000#
```

```
    Next I
```

```
    te# = Timer - te#
```

```
    n# = (2 / te#) * 200000#
```

```
    a# = Timer
```

```
cal:
```

```
    t# = Timer
```

```
    If t# = a# Then
```

```
        GoTo cal
```

```
    End If
```

```
For l = 1 To n#  
Next l  
t# = Timer - t#  
Fact# = n# / (t# * 1000)  
  
End Sub
```

Essa sub-rotina inicialmente calcula o tempo de espera (t#) necessário para a execução de 200000 loops. Baseado nesse tempo, calcula-se o número de estruturas (n#) necessárias para um atraso temporal de dois segundos. Em seguida calcula-se o atraso temporal (t#) desse número de estruturas e executa-se a divisão desse número de estruturas pelo tempo de atraso que é gerado pela execução dos loops e por um fator de conversão para gerar o coeficiente (Fact#) que permite calcular quantas estruturas de loop são necessárias para um atraso temporal de um ms.

Todos os valores numéricos são do tipo com dupla precisão de ponto flutuante (símbolo "#"), ou seja, são armazenados com 64-bits (8 bytes) podendo assumir valores de -1.79769313486232E308 a -4.94065645841247E-324 para valores negativos, e de 4.94065645841247E-324 to 1.79769313486232E308 para valores positivos. No presente caso eles só assumem valores positivos. Essa maior precisão nos valores numéricos aumenta a precisão temporal do fator de conversão (Fact#).

2 - Subrotina que gerencia a aquisição de espectros.

Sub Leitura ()

Perif = Desliga(Perif)	'Desabilita os Periféricos.
For z% = 1 To 3	'Inicia a rotina para zerar os fotodiodos.
For x% = 1 To 3	
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock e start.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Envia o pulso de start com o clock baixo.
Out DigOut%, SHCH	'Mantém o pulso de start alto e envia o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Mantém o pulso de start alto e baixa o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de start e mantém o pulso de clock também baixo.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
For c% = 1 To 1024	'Inicia o loop para varrer os 1024 fotodiodos.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Next x%	
Call Deley2(10)	'Primeiro Tempo de Integração.
'Inicia a rotina para ler os fotodiodos.	

Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock e start.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Envia o pulso de start com o clock baixo.
Out DigOut%, SHCH	'Mantém o pulso de start alto e envia o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Mantém o pulso de start alto e baixa o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de start e mantém o pulso de clock também baixo.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
For c% = 1 To 522	'Inicia a estrutura de loops para ler os primeiros 522 fotodiodos.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out STTrigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
HByte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).
Wend	
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado).
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.

Next c%	
Call Deley2(25)	'Segundo Tempo de Integração.
For c% = 523 To 720	'Inicia a estrutura de loops para ler a faixa de fotodiodos entre 523 e 720.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out STTrigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
HByte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).
Wend	
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado).
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Call Deley2(50)	'Terceiro Tempo de Integração.
For c% = 721 To 900	'Inicia a estrutura de loops para ler a faixa de fotodiodos entre e 721 e 900.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out STTrigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
Hbyte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal

Wend	analógico digitalizado).
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado.
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Call Deley2(200)	'Quarto Tempo de Integração.
For c% = 901 To 1024	'Inicia a estrutura de loops para ler a faixa de fotodiodos entre 901 e 1024.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out Strigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
HByte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).
Wend	
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado.
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Next z%	
'Calcula a media de três medidas em três comprimentos de onda distintos e adjacentes (média de 9 medidas ao todo) e coloca nos elementos do vetor medidas.	

```

n% = 0                                'Inicializa o contador "n%"
somatorio = 0                         'Inicializa a variável "somatório"
For c% = 1 To 1023
    n% = n% + 1                       Incrementa "n%"
    contador = 0                     'Inicializa o contador "contador"
    For z% = 1 To 3
        contador = contador + valor(z%, c%) 'Calcula o somatório das três
                                            medidas.
    Next z%
    somatorio = somatorio + contador / 3
    If n% = 3 Then                   'subtrai a leitura de fundo do sinal
                                    lido
        medidas(c% / 3) = Format(somatorio / 3 - fundo(c% / 3), "0.000")
        n% = 0
        somatorio = 0
    End If
Next c%

'Remove gliches nos pontos de discontinuidade de leitura
medidas(175) = Val((medidas(174)) + Val(medidas(176))) / 2
medidas(241) = Val((medidas(240)) + Val(medidas(243))) / 2
medidas(301) = Val((medidas(300)) + Val(medidas(303))) / 2

Perif = liga(Perif)                  'Habilita os Periféricos
End Sub

```

As constantes globais SLCH (start low / clock high); SHCH (start high / clock high); SLCL (start low / clock low) e (start high / clock low) são definidas na

abertura do programa de modo a endereçar os bits (0 e 1) que dão acesso aos controles de clock e start. Como também existe o bit (2) que controla a válvula peristáltica, essas constantes são redefinidas quando necessário.

Essa sub-rotina armazena a leitura do arranjo linear de fotodiodos no vetor (variável global) "medidas". Esse vetor pode ser manipulado em qualquer parte do programa. Ela também utiliza o vetor "fundo" que é gerado pela rotina que lê a luz de fundo.

3 - Subrotina que gerencia a correção de luz de fundo.

Sub Leitura ()

Perif = Desliga(Perif)	'Desabilita os Periféricos.
For y = 1 to 10	
For z% = 1 To 3	'Inicia a rotina para zerar os fotodiodos.
For x% = 1 To 3	
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock e start.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Envia o pulso de start com o clock baixo.
Out DigOut%, SHCH	'Mantém o pulso de start alto e envia o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Mantém o pulso de start alto e baixa o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de start e mantém o pulso de clock também baixo.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.

Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
For c% = 1 To 1024	'Inicia o loop para varrer os 1024 fotodiodos.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Next x%	
Call Deley2(10)	'Primeiro Tempo de Integração.
'Inicia a rotina para ler os fotodiodos.	
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock e start.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Envia o pulso de start com o clock baixo.
Out DigOut%, SHCH	'Mantém o pulso de start alto e envia o pulso de clock.
Out DigOut%, SHCL	'Mantém o pulso de start alto e baixa o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de start e mantém o pulso de clock também baixo.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
Out DigOut%, SLCH	'Envia o pulso de clock e mantém o start baixo.
Out DigOut%, SLCL	'Zera o pulso de clock.
For c% = 1 To 522	'Inicia a estrutura de loops para ler os primeiros 522 fotodiodos.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out STigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço

HByte% = Inp(ADH%)	"ADH"). 'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).
Wend	
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado).
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Call Deley2(25)	'Segundo Tempo de Integração.
For c% = 523 To 720	'Inicia a estrutura de loops para ler a faixa de fotodiodos entre 523 e 720.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out STigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
HByte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).
Wend	
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado).
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	

Call Deley2(50)	'Terceiro Tempo de Integração.
For c% = 721 To 900	'Inicia a estrutura de loops para ler a faixa de fotodiodos entre e 721 e 900.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out STigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
Hbyte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).
Wend	
HByte% = (Inp(ADH%) And 15)	'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.
LByte% = Inp(ADL%)	'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado).
valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte%	'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.
Out DigOut%, SLCL	'Baixa o pulso de clock.
Next c%	
Call Deley2(200)	'Quarto Tempo de Integração.
For c% = 901 To 1024	'Inicia a estrutura de loops para ler a faixa de fotodiodos entre 901 e 1024.
Out DigOut%, SLCH	'Levanta o pulso de clock.
HByte% = 16	
Out Strigger, 0	'Inicia a Conversão A/D.
While (HByte% And 16) > 0	'Checa o final da Conversão (quinto bit do sinal no endereço "ADH").
HByte% = Inp(ADH%)	'Lê o endereço "ADH" (amostra os bits mais significativos do sinal analógico digitalizado).

Wend

HByte% = (Inp(ADH%) And 15) 'Elimina o bit de fim de conversão no sinal analógico convertido.

LByte% = Inp(ADL%) 'Lê o endereço "ADL" (amostra os bits menos significativos do sinal digitalizado.

valor(z%, c%) = HByte% * 256 + LByte% 'Compõe o valor de tensão do sinal amostrado.

Out DigOut%, SLCL 'Baixa o pulso de clock.

Next c%

Next z%

'Calcula a media de três medidas em três comprimentos de onda distintos e adjacentes (média de 9 medidas ao todo) e coloca nos elementos do vetor medidas.

n% = 0 'Inicializa o contador "n%"

somatorio = 0 'Inicializa a variável "somatório"

For c% = 1 To 1023

n% = n% + 1 Incrementa "n%"

contador = 0 'Inicializa o contador "contador"

For z% = 1 To 3

contador = contador + valor(z%, c%) 'Calcula o somatório das três medidas.

Next z%

somatorio = somatorio + contador / 3

If n% = 3 Then 'subtrai a leitura de fundo do sinal lido

medidas(c% / 3) = Format(somatorio / 3, "0.000")

n% = 0

somatorio = 0

End If

```

Next c%

For l% = 1 To 341
    cont(l%) = cont(l%) + medidas(l%)    'Calcula o Somatório dos dez
                                          espectros
Next l%

Next y%

For M% = 1 To 341
    fundo(M%) = cont(M%) / 10            'Calcula a media dos dez espectros,
                                          e armazena na variável "fundo"
Next M%

Perif = liga(Perif)                      'Habilita os Periféricos

End Sub

```

Essa sub-rotina é idêntica à que executa a leitura dos espectros, exceto que essa toma a média de dez leituras e a coloca no vetor "fundo" para ser subtraída do espectro no momento da tomada do mesmo.

4 - Sub-rotina que executa a DDE (Dinâmico Data Exchange) entre o Matlab e o Visual Basic.

```

Sub Form_Activate ( )
    'Executa a DDE Propriamente dita
    TxtInput.LinkMode = NONE
    TxtInput.LinkTopic = "matlab|engine"
    TxtInput.LinkItem = "EngEvalString"
    TxtInput.LinkTimeout = 10000

```

```

TxtInput.LinkMode = LINK_MANUAL

TxtInput.LinkExecute "ShowSpec"      'Executa o programa "ShowSpec" do
                                       MatLab o qual cria o gráfico.

TxtInput.LinkExecute TxtInput.Text

TxtInput.LinkMode = NONE

PicOutput.LinkMode = NONE

PicOutput.LinkTopic = "matlab|engine"

PicOutput.LinkItem = "EngFigureResult"

PicOutput.LinkTimeout = 10000

PicOutput.LinkMode = LINK_MANUAL

PicOutput.LinkRequest      'Recebe o gráfico do Matlab

PicOutput.LinkMode = NONE

End Sub

```

A comunicação com o Matlab é feita em duas etapas. Na primeira, essa sub-rotina especifica os parâmetros para mandar um comando ao Matlab via DDE, abre a comunicação, executa o comando e fecha a comunicação. Na segunda parte ela especifica os parâmetros para receber o gráfico do Matlab via DDE, abre a comunicação, recebe o gráfico e fecha a comunicação.

5 - Programa (em linguagem Matlab) do modelo RA.

```

%O algoritmo é baseado no método sugerido por Kowalski na referência 44
%

```

```

%notação:

%i: número de componenes principais da matriz de maior posto

% R: razão entre as concentrações ( $C_n / C_m$ )

function [R]=ra(M,N,i)

disp('Fazendo a decomposição em valores singulares da matriz M')

% faz a decomposição em valores singulares

[u,s,v] = svd(M,0);

%trunca a decomposição em valores singulares

U = u(:,1:i);

V = v(:,1:i);

S = s(1:i,1:i);

R = trace(U'*N*V*(inv(S)))

```

6 - Programa (em linguagem Matlab) do modelo GRAM

% O algoritmo é baseado no método sugerido por Kowalski segundo a referência 48

```

%

% i: número de componentes principais

% x: Comprimentos de onda

% t: tempo

% cp: Perfis de concentração estimados

% ep2: Espectros estimados

% R: razão entre as concentrações  $C_m / C_n$ 

% [cp,ep2,p,q,R]=gram(spl,sd,i,x,t)

```

```
function [cp,ep2,p,q,ratio]=gram(spl,sd,i,x,t)

clc; clg; hold off

format short e

disp('Fazendo a decomposição em valores singulares em ambas matrizes
adjuntas')

xx=[spl' sd'];

[nr,nc] = size(xx);

if nr > nc

    [p,s,v] = svd(xx,0);

else

    [v,s,p] = svd(xx',0);

end

yy=[spl';sd'];

[nr,nc] = size(yy);

if nr > nc

    [u,s,q] = svd(yy,0);

else

    [q,s,u] = svd(yy',0);

end

disp('Terminada a decomposição em valores singulares')
```

```
% Calculando os espectros e perfis de concentração
```

```
hold off
```

```
pp=p(:,1:i);
```

```
qq=q(:,1:i);
```

```
mpq=pp'*spl'*qq;
```

```
npq=pp'*sd'*qq;
```

```
[v,d]=eig(mpq,npq);
```

```
if i > 1
```

```
    [v,d]=smtran1(v,d);
```

```
    [v,d]=smtran2(v,d)
```

```
end
```

```
cp=qq*(v'*inv(v*v'))';
```

```
ep1=pp*(mpq+npq)*v;
```

```
ep2=pp*npq*v;
```

```
plot(x,ep1);
```

```
for v=1:i
```

```
    %Rotula as linhas traçadas
```

```
    text(x(v*size(x,2)/i),ep1(v*size(ep1,1)/i,v), num2str(v));
```

```
end

title('Espectros para os componentes em spl')
ylabel('Espectro descalibrado')
pause

plot(x,ep2);
for v=1:i
    %Rotula as linhas traçadas
    text(x(v*size(x,2)/i),ep2(v*size(ep2,1)/i,v), num2str(v));
end
title('Espectro para os componentes em std')
ylabel('Espectro descalibrado')
pause

plot(t,cp);
for v=1:i
    %Rotula as linhas traçadas
    text(t(v*size(t,2)/i),cp(v*size(cp,1)/i,v), num2str(v));
end
title('Perfis de concentração para os componentes em spl')
ylabel('Perfis descalibrados')
pause
```

```
cm1=inv(pp'*ep1)*mpq*(inv(qq'*cp));
cm2=inv(pp'*ep2)*mpq*(inv(qq'*cp));
cn=inv(pp'*ep2)*npq*(inv(qq'*cp));

nfac=input('Número do componente desejado?');

[y,k]=max(abs(ep2(:,nfac)));
    if sign(ep2(k,nfac)) > 0
        plot(x,ep2(:,nfac));
    else
        plot(x,-ep2(:,nfac));
    end

title('Espectro estimado')
ylabel('Espectro descalibrado')
xlabel('Comprimento de onda (nm)')
pause
[y,k]=max(abs(cp(:,nfac)));
    if sign(cp(k,nfac)) > 0
        plot(t,cp(:,nfac));
    else
        plot(t,-cp(:,nfac));
    end

title('Perfil de concentração estimado')
```

```
ylabel('perfil descalibrado')
```

```
xlabel('Tempo')
```

```
pause
```

```
R=cm2(nfac,nfac)/cn(nfac,nfac)
```

```
disp('Pausa -- use esta oportunidade para inspecionar variáveis internas');
```

```
disp('Type "return" to resume');
```

```
keyboard
```

7 - Sub-rotina (em linguagem Matlab) para a primeira transformação de similaridade no modelo GRAM

```
%sintaxe: [vv,dd]=smtran1(v,d)
```

```
function [vv,dd]=smtran1(v,d)
```

```
[r,c]=size(d);
```

```
t=zeros(r,c);
```

```
% Apaga a parte imaginária em v e d que são extremamente pequenas.
```

```
v=im_re(v);
```

```
d=im_re(diag(d));
```

```
d=diag(d);
```

```
[v,d]=vd_sort(v,d);
```

```
[v,d]=excg(v,d);
[v,d]=regp(v,d);
intemp=find(imag(diag(d))');
index=intemp(1:2:length(intemp));
for i=index
    [t(i,i),t(i+1,i+1)]=imtt(v,i);
end
for i=length(intemp)+1:length(diag(t))
    t(i,i)=rett(v,i);
end
vv=v/t; dd=t*d/t;
vv=im_re(vv);
dd=im_re(diag(dd));
dd=diag(dd);
```

8 • Sub-rotina (em linguagem Matlab) para a segunda transformação de similaridade no modelo GRAM

```
function [vv,dd]=smtran2(v,d)

%SMTRAN2 Converte uma matriz na forma de diagonal complexa para a
%forma de diagonal real.

% [V,D] = CDF2RDF(V,D) transforma as saídas complexas dos
%autovalores na forma diagonal para saídas reais de autovalores na forma
%diagonal. Na forma diagonal complexa, D tem valores complexos abaixo
```

%da diagonal principal. Na forma diagonal real, os valores complexos são
 %blocos 2 por 2 na diagonal. Assume-se que os pares de autovalores
 %complexos são formados pelos complexos próximos.

%J.N. Little 4-27-87

%Baseado no arquivo -m de M. Steinbuch, N.V.KEMA & Delft Univ. of
 %Tech.

%Copyright (c) 1987 by the MathWorks, Inc.

%

%Sintaxe: [vv,dd]=smtran2(v,d)

j = sqrt(-1);

t = eye(length(d));

twobytwo = [1 1;j -j];

intemp = find(imag(diag(d)))';

index=intemp(1:2:length(intemp));

for i=index

 t(i:i+1,i:i+1) = twobytwo;

end

vv=v/t; dd=t*d/t;

vv=real(vv);

dd=real(dd);