

A QUIMIOMETRIA NOS CURSOS DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: PROPOSTA DO USO DA ANÁLISE MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE pK_a

Paulo Cesar de Souza Pereira^a, Camila Fabiano de Freitas^a, Cristiane Santi Chaves^a, Bianca Martins Estevão^a, Diogo Silva Pellosi^a, André Luiz Tessaro^b, Wagner Roberto Batistela^c, Ieda Spacino Scarmínio^d, Wilker Caetano^a e Noboru Hioka^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bUniversidade Tecnológica Federal do Paraná, 86812-460 Apucarana – PR, Brasil

^cDepartamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, 87506-370 Umuarama – PR, Brasil

^dDepartamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, 86051-980 Londrina – PR, Brasil

Recebido em 18/12/2013; aceito em 09/06/2014; publicado na web em 29/07/2014

CHEMOMETRY IN UNDERGRADUATE CHEMISTRY COURSES: A PROPOSAL FOR THE USE OF MULTIVARIATE ANALYSIS IN THE DETERMINATION OF pK_a . An experiment was proposed applying the Chemometric approach of Multivariate Analysis for inclusion in undergraduate Chemistry courses to promote and expand the use of this analytical-statistical tool. The experiment entails the determination of the acid dissociation constant of dyes *via* UV-Vis electronic spectrophotometry. The dyes used show from simple equilibrium to very complex systems involving up to four protolytic species with high spectral overlap. The Chemometric methodology was more efficient than univariate methods. For use in classes, it is up to the teacher to decide which systems should be utilized given the time constraints and laboratory conditions.

Keywords: multivariate analysis; chemometry; teaching.

INTRODUÇÃO

O equilíbrio químico é um conteúdo bastante abordado nas disciplinas de química nos cursos de graduação.¹ No entanto, é comum defrontar-se com sistemas complexos cuja elucidação necessita ferramentas avançadas de análise. Na década de 70, surgiram os primeiros trabalhos sobre a Quimiometria, ciência que resulta da união entre química e estatística. Essa união, alavancada pela capacidade de processamento computacional, forjou essa ferramenta poderosa para o tratamento de dados oriundos de fenômenos em sistemas químicos. A partir da década de 90, com a disseminação dos computadores, a Quimiometria passou a ser divulgada nos laboratórios de pesquisa e na indústria, aumentando-se as publicações na área.²

Iniciada apenas como um método de classificação química, atualmente a Quimiometria se estabeleceu e está dividida em três áreas fundamentais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e, por fim, a calibração multivariada.³

A área mais conhecida é a de planejamento de experimentos, com a qual se avaliam os efeitos de variáveis sobre respostas analíticas e se determinam quais delas são mais significativas. A importância de um bom planejamento experimental evita a realização de um grande número de experimentos e o desperdício de reagentes.⁴ A utilização de técnicas de reconhecimento de padrões é ainda pouco difundida no Brasil. Nessa área, analisa-se grande volume de dados (medidas químicas, medidas espectrais, cromatogramas) de um conjunto de amostras para a detecção daquelas que apresentam maiores similaridades para posterior agrupamento, visando determinar tendências. Por fim, a calibração multivariada permite estimar a concentração de uma determinada espécie relacionando um conjunto de padrões e as variáveis físico-químicas de interesse.^{5,6}

No contexto de sistemas multivariados de dados, a Análise dos Componentes Principais (ACP) é uma ferramenta de análise que é aplicada para reduzir o conjunto de dados mantendo o máximo de informações originais possível. O princípio da técnica consiste na

busca de similaridade entre os dados, de tal forma que estes possam ser representados pelas componentes mais representativas do sistema, ditas componentes principais.⁷⁻¹⁰ Assim, a ACP permite efetuar uma análise rigorosa dos dados de forma a encontrar relações entre as variáveis medidas, posterior agrupamento das amostras e detecção de anomalias. Alguns programas de análise multivariada estão disponíveis no mercado, tais como Matlab[®] e o Minitab[®] e programas gratuitos como o Octave[®] e o React Lab[®].¹¹⁻¹⁴

A implantação da Quimiometria como disciplina em cursos de graduação é de grande importância no contexto de ensino e pesquisa.^{15,16} Os autores do presente trabalho efetuaram um levantamento através da internet no ano de 2013, a respeito dos cursos de graduação em Química das universidades públicas do país que apresentavam a disciplina de Quimiometria (obrigatória ou optativa). Este revelou que, de um total de 70 universidades públicas pesquisadas, 59 oferecem o curso de graduação em Química, sendo que dentre estas apenas 20 ofertam a disciplina, o que corresponde a somente 34% dos cursos de química. A distribuição por região é: Norte 0%, Nordeste 9%, Centro-Oeste 13%, Sudeste 43% e Sul 35%, portanto, verifica-se forte desigualdade. Adicionalmente, a análise das ementas da disciplina revelou que a abordagem é teórica.

Com a finalidade de disseminar e auxiliar na consolidação de conceitos de Quimiometria, este trabalho propõe atividades que visam incorporar o caráter experimental à disciplina de Quimiometria em cursos de graduação. A experimentação aprofunda e amplia a gama de conhecimentos sobre o assunto, permite uma análise mais completa sobre os sistemas abordados, desperta maior interesse dos alunos facilitando a compreensão do conteúdo. Outra possibilidade plausível é a incorporação de uma prática envolvendo o assunto, em disciplinas experimentais já ofertadas nos cursos de graduação em Química. Além disso, a avaliação dos sistemas químicos realizada com microcomputadores e softwares propicia a aproximação dos acadêmicos com as tecnologias avançadas de tratamentos de dados. Para essa finalidade, utilizou-se o conjunto de aplicativos MASDA (*Multivariate Analysis of Spectroscopic Data*) desenvolvido pela Prof. Dr^a. Ieda Spacino Scarmínio, do Departamento de Química da Universidade Estadual de

*e-mail: nhioka@uem.br

Londrina (UEL/PR). Estes aplicativos, escritos em linguagem Fortran, já foram testados em diversos sistemas.¹⁷⁻²¹ Seu uso apresenta vários aspectos positivos, além de ser disponibilizado gratuitamente (vide material suplementar, iniciando pelo arquivo “tutorial”).

Diante do objetivo proposto e, adicionalmente, dado a sua importância, propõe-se investigar dentre os equilíbrios químicos o ácido-base, utilizando a metodologia quimiométrica e efetuando comparações com a metodologia tradicional.²²⁻²⁵ Como conhecido, o pH do meio determina as espécies protolíticas presentes, que por sua vez regulam a funcionalidade das biomoléculas,²⁶ interferem na acidez de corpos hídricos e do solo,²⁷⁻²⁹ são aditivos e agentes neutralizantes no controle de microorganismos em alimentos,³⁰ afetam a absorção, a farmacocinética e outras propriedades de medicamentos.³¹ Vale enfatizar que um composto, tendo as suas formas ácida e básica, equivale a duas moléculas distintas, exibindo diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas.

Para um dado equilíbrio de desprotonação, a constante de equilíbrio de acidez K_a reflete a tendência do processo. Frequentemente expressam-se esses valores pelo pK_a ($= -\log K_a$). Dentre as técnicas usadas para a determinação do pK_a destacam-se a potenciometria e a espectrofotometria UV-Vis.³²⁻³⁴ Neste trabalho foi realizada a determinação do pK_a de corantes em meio aquoso, alguns deles utilizados como indicadores ácido-base, usando a titulação espectrofotométrica devido a sua alta sensibilidade mesmo em soluções a baixas concentrações (10^{-6} mol L⁻¹). Visando uma abordagem ampla da quimiométrica para uso em disciplinas experimentais, utilizou-se desde corantes que apresentam um único equilíbrio protolítico a sistemas mais complexos com mais de um equilíbrio e com valores de pK_a próximos entre si, exibindo ainda alta sobreposição espectral entre as bandas de absorção das formas ácidas e básicas. Nestes casos complexos, metodologias convencionais são inapropriadas por levar-se em consideração apenas as variações de absorbância em comprimento de onda determinado (λ_{anal}), o que não reflete o sistema como um todo. Assim, propõe-se o emprego de métodos multivariados que considerem o conjunto de comprimentos de onda, ou seja, seus espectros em cada pH.^{20,21,35-37}

Em resumo, é proposto uma prática experimental empregando-se a Quimiometria, passível de inclusão em disciplinas do curso de graduação em Química. Para esta finalidade, usou-se a determinação do pK_a de corantes em meio aquoso. Os resultados da análise quimiométrica foram comparados aos da metodologia convencional e com dados da literatura a fim de demonstrar a confiabilidade do método proposto.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico e foram empregados sem purificação prévia. Utilizaram-se os corantes vermelho de metila (**VM**: N,N-dimetil-4-aminoazobenzeno, Vetec), etil-eosina (**EOSET**: 2,4,5,7-tetrabromo-9-[2-(etoxicarbonil)fenil]-3-oxo-3H-xanten-6-olato de potássio, Aldrich), eosina Y (**EOS**: 2-(2,4,5,7-tetrabromo-6-óxido-3-oxo-3H-xanteno-9-il) benzoato de dissódio, Reagen) e fluoresceína (**FSC**: 2-(3-hidroxi-6-ceto-xanten-9-il) benzóico, Carlo Erba) cuja pureza foi atestada por cromatografia de camada fina. Os demais compostos utilizados no preparo das soluções foram o cloreto de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Merck), ácido clorídrico (Merck), fosfato dissódico (Merck) e ácido cítrico (Aldrich). A água foi destilada.

Soluções: pH e força iônica

Para controle do pH foi utilizado tampão McIlvaine ([Na₂HPO₄]

= [Ácido cítrico] = $7,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) para a faixa de pH entre 2,0 e 8,0 e [NaCl] = 0,10 mol L⁻¹ para controle da força iônica. Para as soluções com pH final inferior a 2,0, o ajuste foi realizado pela adição controlada de microvolumes de solução de ácido clorídrico previamente padronizada.

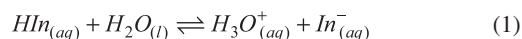
Equipamentos

Os valores de pH das soluções foram ajustados em um pHmetro digital MeterLab PHM 240 com eletrodo combinado de vidro. Os espectros eletrônicos de absorção UV-Vis das soluções aquosas dos corantes foram obtidos em um espectrofotômetro Beckman Coulter, modelo DU 800, monitorando dentro da região de 350 a 800 nm. O controle de temperatura para as amostras foi efetuado com sistema Peltier acoplado ao equipamento, mantendo-se a temperatura em 30,0 °C. Nas medidas, empregaram-se cubetas de poliestireno com caminho óptico de 1,00 cm.

Metodologias de obtenção do valor de pK_a

Diversas soluções aquosas de pH conhecido e na força iônica desejada foram preparadas, das quais transferiu-se 2,0 mL para as cubetas e, em seguida, foi adicionado volume fixo de solução estoque dos corantes, utilizando uma microseringa. A concentração utilizada para as amostras na cubeta para o **VM** foi $1,25 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e para os demais corantes foi $5,00 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, concentrações cujas absorbâncias respeitam a Lei de Lambert-Beer. As soluções aquosas de corante foram previamente padronizadas por UV-Vis utilizando-se as seguintes absorvidades molares (ϵ): **VM**, MM = 269,30 g mol⁻¹, $\epsilon_{520\text{nm}} = 23.360$ L mol⁻¹ cm⁻¹;³⁸ **EOS**, MM = 691,99 g mol⁻¹, $\epsilon_{517\text{nm}} = 96.600$ L mol⁻¹ cm⁻¹;³⁹ **EOSET**, MM = 714,03 g mol⁻¹, $\epsilon_{529\text{nm}} = 90.000$ L mol⁻¹ cm⁻¹;⁴⁰ **FSC**, MM = 332,31 g mol⁻¹, $\epsilon_{490\text{nm}} = 88.000$ L mol⁻¹ cm⁻¹.²⁰

Para um equilíbrio ácido-base (Eq. 1), a relação entre as concentrações das espécies protolíticas para cada valor de pH varia de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch (Eq. 2):



$$pK_a = pH + \log \left(\frac{a_{HIn}}{a_{In^-}} \right) \quad (2)$$

sendo a : atividade. Contudo, por tratar-se de soluções diluídas e em força iônica controlada, considera-se o termo de coeficiente de atividade unitário, portanto, a atividade é igual à concentração. A Lei de Lambert-Beer mostra que a concentração é diretamente proporcional à absorbância.^{24,41} Assim, monitorando-se os espectros de absorção de amostras com concentração fixa do corante em pH variados, obtém-se o pK_a a partir dos métodos descritos a seguir:

i) Metodologia convencional usual

A metodologia usualmente empregada nessas determinações é a medida de **absorbância** junto a um comprimento de onda analítico (λ_{anal}) em função do **pH**, sendo este λ_{anal} geralmente tomado junto à banda onde se tem o máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$); ou seja, técnica univariada por utilizar um único comprimento de onda. Na realidade, na escolha do λ_{anal} deve ser levado em consideração o comprimento de onda no qual se observa elevada diferença de intensidade de absorção entre as formas ácida e básica. A partir desses pontos experimentais existem diversos tratamentos matemáticos,^{42,43} mas não serão discutidos neste trabalho. Um dos mais usuais consiste no gráfico de absorbância *versus* pH, que resulta em uma curva com

perfil sigmoidal ('S' ou 'S' invertido) explicitado pela Eq. 2. O ponto médio da curva sigmoidal, onde ocorre inversão de concavidade, fornece o valor de pK_a .^{42,44}

(ii) Metodologia quimiométrica

A principal diferença entre a metodologia tradicional e a quimiométrica é que na última avaliam-se as absorvâncias em vários comprimentos de onda simultaneamente, ou seja, é realizada uma análise multivariada do conjunto de absorvâncias (espectros) obtido em cada solução, no seu respectivo pH, através da ACP e do método Q de Imbrie.¹⁹ Neste trabalho, o aplicativo inicial constrói uma matriz de dados, no exemplo do **VM** de 36x301, sendo 36 o número de espectros obtidos (número de soluções em diferentes pH) e 301 o número de comprimentos de onda em cada espectro (avaliação feita entre 350 a 650 nm com $\Delta\lambda = 1$ nm, totalizando 301 pontos).

A partir dos aplicativos utilizados, foram obtidos o número de componentes principais (ACP) e as curvas de concentrações normalizadas (concentrações relativas) de cada espécie em cada pH onde o ponto de cruzamento forneceu o valor de pK_a . A partir das soluções com pH definidos, dos pK_a obtidos e aplicando-se as equações abaixo é possível obter-se as frações reais (α) de cada espécie em cada pH.

$$\alpha_1 = \frac{[H^+]^3}{POL} \quad \alpha_2 = \frac{K_{a3}[H^+]^2}{POL} \quad \alpha_3 = \frac{K_{a3}K_{a2}[H^+]}{POL} \quad \alpha_4 = \frac{K_{a3}K_{a2}K_{a1}}{POL}$$

sendo: $POL = [H^+]^3 + K_{a3}[H^+]^2 + K_{a3}K_{a2}[H^+] + K_{a3}K_{a2}K_{a1}$

Além disso, uma vantagem adicional do MASDA é a simulação dos espectros de absorção de cada espécie protolítica pura envolvida no equilíbrio, através do Método da Matriz-K.³⁷

Programas

O cálculo tradicional, através do método gráfico, foi realizado utilizando os programas Microsoft Office Excel[®] 2010 e Origin[®] 8.5. Os cálculos quimiométricos foram realizados utilizando o MASDA, desenvolvido no Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais da Universidade Estadual de Londrina, pela Prof. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio. O editor de texto Bloco de Notas (Windows[®] 7) e o Microsoft Office Excel[®] 2010 foram utilizados como suporte na formatação dos dados para inserção nas linhas de comando.

O MASDA é um conjunto computacional constituído por quatro aplicativos autoexecutáveis que processam os dados individualmente, com pausas automáticas entre as entradas de comando, as quais devem ser efetuadas pelo usuário. Dentre os aplicativos que compõem o MASDA, o primeiro a ser executado é o **UV**, que organiza todos os espectros na forma matricial. Em seguida, o aplicativo **FATOR** calcula a matriz de associação, aplicando o método Q de Imbrie. Esses dados são submetidos à rotação varimax e rotação oblíqua usando o terceiro aplicativo, o **ROTAÇÃO**, a partir do qual obtêm-se as concentrações relativas das espécies protolíticas. Finalmente, o uso do **MATK1** fornece os espectros das espécies puras. Um tutorial sobre a utilização do MASDA encontra-se disponível como material suplementar, bem como indicações para seu acesso. As atividades desenvolvidas com o MASDA devem ser creditadas à Prof. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio.

Análise das componentes principais (ACP)

O método quimiométrico multivariado mais comum para o tratamento de dados é a ACP,^{17,45} que descreve as interrelações dentro de um conjunto de variáveis e reduz o número de variáveis sem perda significativa de informação, preservando a variância (quantidade de informação original). Isso é realizado através de uma nova representação dos dados considerando as componentes mais representativas do sistema.^{7,9} O modelo de uma componente

principal corresponde a uma reta no espaço tridimensional que contém a máxima variância contida nos dados. O modelo com duas componentes principais (PC1 e PC2) é definido por duas retas ortogonais onde a segunda reta está na direção da maior variância restante, após retirada a PC1. Finalmente, uma terceira reta, a PC3, explica o restante das informações contidas nos dados, de forma a descrever todo o conjunto de dados. Embora tenha-se proposto apenas três componentes principais, podem ser propostas tantas quantas forem necessárias para descrever adequadamente o sistema. Para um conjunto espectral onde se analisa a variação de pH, cada componente principal é relacionada a uma espécie protolítica.

Análises do tipo-Q

A análise de Componentes Principais do tipo-Q calcula a partir da matriz original uma matriz quadrada chamada de cosseno θ , ou seja, uma matriz de similaridade que mostra a relação entre os objetos (amostras analíticas ou espécies químicas). Tal método pode ser usado na resolução de sistemas nos quais não se conhece nenhuma informação *a priori* das espécies puras. A especificidade do modo tipo-Q é o passo de normalização, o qual está baseado na definição de uma relação de proporcionalidade entre os objetos, através do parâmetro $\cos \theta_{nm}$ que reflete o grau de similaridade entre os objetos.³⁷ Para dois objetos, n e m, que são os vetores linha de uma matriz de dados, determina-se o coeficiente $\cos \theta_{nm}$ definido pela Eq. 3

$$\cos \theta_{nm} = \frac{\sum_{j=1}^p a_{nj}a_{mj}}{\sqrt{\sum_{j=1}^p a_{nj}^2 \sum_{j=1}^p a_{mj}^2}} \quad (3)$$

onde a_{nj} representa a j-ésima variável do n-ésimo objeto e p o número de variáveis. Dessa forma, todos os demais objetos podem ser considerados combinações lineares dos constituintes principais e assim obtêm-se o número de espécies constituintes de um sistema químico e suas concentrações relativas. Entretanto, o resultado obtido pelo método Q de Imbrie diretamente não fornece um conjunto de composições distintas e, por isso, nem sempre pode ser facilmente interpretado. Por isso, aplicam-se as rotações varimax e a projeção oblíqua de Imbrie.^{46,47}

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características estruturais dos corantes

Os corantes avaliados foram selecionados por apresentarem características favoráveis para o uso em atividades de ensino, como fácil obtenção, baixo custo, solubilidade em água e elevada absorvância molar na região do espectro visível, o que permite trabalhar com cubetas de poliestireno em espectrofotômetros UV-Vis. Além disso, optou-se por compostos de diferentes níveis de complexidade estrutural a fim de demonstrar o grau de confiança dos métodos. Assim foram efetuadas comparações entre a metodologia convencional, a quimiométrica e dados da literatura. Muito utilizado nas disciplinas experimentais, o vermelho de metila - **VM** (Figura 1A) apresenta coloração vermelha em meio ácido (pH abaixo de 4,4) e coloração amarela em meio neutro e básico (pH acima de 6,2).⁴⁸ Na forma ácida ele mantém-se como zwitterion, sendo que o hidrogênio ácido pode estar ligado a qualquer um dos nitrogênios em destaque na Figura 1A. Os demais corantes pertencem à classe dos xantenos (Figura 1B – **EOSET**: etil-eosina; **EOS**: eosina e **FSC**: fluoresceína), e apresentam o sistema protolítico com grau de complexidade crescente na ordem **EOSET** < **EOS** < **FSC** dado ao número de grupamentos ácido-base.^{20,49}

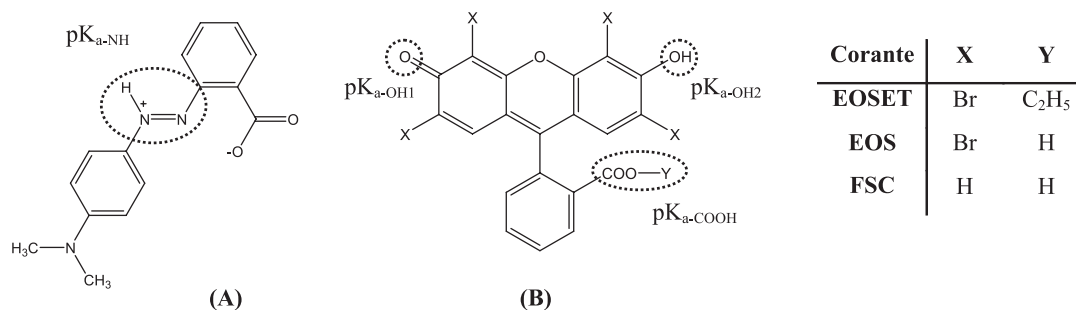


Figura 1. Estruturas dos corantes: (A) vermelho de metila (VM) e (B) Xantenos: etil-eosina (EOSET), eosina (EOS) e fluoresceína (FSC). Destacam-se os grupos que sofrem protonação/desprotonação, sendo que os termos a frente da abreviatura pK_a são indicativos dos correspondentes grupos envolvidos

Conforme observado na Figura 1B, os corantes xantênicos possuem dois grupos fenólicos em sua estrutura além de um grupo carboxílico, exceto para EOSET onde o pK_{a-COOH} não existe em função da existência da ligação éster. Porém, no caso da EOS e EOSET o pK_a do equilíbrio entre as formas catiônica e neutra é de aproximadamente -2,0 em água (escala de Hammet) devido aos átomos de bromo na estrutura xantênica que aumenta a acidez do composto.⁵⁰ Essa região muito ácida não é abordada no presente trabalho.

As espécies protolíticas propostas na literatura em meio aquoso para VM, EOSET, EOS e FSC estão mostradas na Figura 2. Ressalta-se que estão sendo considerados apenas os equilíbrios protolíticos existentes dentro da faixa de pH investigada. Ou seja, para o VM e EOSET há apenas duas espécies em equilíbrio, portanto apenas um pK_a ; já para a EOS o sistema é mais complexo, com três espécies em equilíbrio, e portanto dois valores de pK_a . E, por fim, para a FSC há quatro espécies em equilíbrio e três valores de pK_a . Por questões didáticas, os resultados serão exibidos por metodologia aplicada, iniciando pelo método convencional e finalizando com a análise multivariada proporcionada pela Quimiometria.

Metodologias convencionais de determinação de pK_a

Os espectros de absorção eletrônica de cada corante foram obtidos em mais de 30 soluções com diferentes pH. Entretanto, para facilitar a visualização das variações ocorridas, somente alguns deles são apresentados na Figura 3. O indicador ácido-base VM que apresenta apenas um equilíbrio ácido-base (Figura 2A) exibe bandas de absorção bastante distintas. Observa-se que em meios mais ácidos apresenta a coloração vermelha ($\lambda_{m\acute{a}x} = 530$ nm) em sua forma zwitteriônica e com o aumento do pH a solução torna-se amarela ($\lambda_{m\acute{a}x} = 400$ nm), devido à forma aniônica do corante (Figura 3A); verifica-se ainda a existência de ponto isobestico, em 465 nm, evidenciando um único equilíbrio protolítico, ou seja, somente duas espécies presentes.⁵¹

A partir dos dados espectrofotométricos do VM construiu-se o gráfico de intensidade de absorção junto a 530 nm em função do pH (Figura 3B). A curva resultante teve a forma sigmoidal característica e o ponto de inflexão forneceu o valor de pK_a .

A EOSET, igualmente com um equilíbrio, tem em baixos valores de pH - espécie neutra, as bandas de absorção pouco intensas, sem definição (Figura 3C) e a solução é quase incolor.⁵⁰ Com o aumento do pH há a formação da espécie monoaniônica e o aparecimento da banda em 520 nm, exibindo uma coloração rosa. Embora se perceba a existência de um ponto isobestico, trata-se de um sistema ligeiramente mais complexo do que o VM, pois como pode ser observado as bandas das espécies protonada e desprotonada estão sobrepostas. Novamente o ponto de inflexão, obtido a partir da curva de absorvância (520 nm) versus o pH, indica o valor de pK_a para a EOSET (Figura 3D).

Para a EOS observam-se duas bandas (Figura 3E), sendo a mais

intensa com máximo em 517 nm em meio básico (coloração rosa) e a outra com $\lambda_{m\acute{a}x}$ na região de 480 nm em meio ácido, mais alargada e com menor intensidade (quase incolor). Apesar de possuir uma espécie protolítica a mais (estrutura na Figura 2C), o perfil espectral apresentado pela EOS (Figura 3E) foi o mesmo obtido para a EOSET (Figura 3C), uma vez que o grupo cromofórico de ambas é idêntico, isto é, o anel xantênico. O formato monosigmoidal da curva de absorvância contra pH da EOS, na Figura 3F, sugere erroneamente a existência de somente um grupo protolítico, o que resultaria em um único pK_a . A existência de mais de um grupo ácido-base com proximidade entre os pK_a aliado à intensa sobreposição de bandas prejudica a determinação e diferenciação dos mesmos. Assim, é evidente que o método univariado em sistemas complexos resulta em interpretação equivocada, consequentemente levando a erros.

Por fim, a FSC foi o corante utilizado de maior complexidade, uma vez que possui quatro espécies protolíticas (três pK_a , Figura 2D) e elevada sobreposição espectral como mostrado na Figura 3G. Nestes espectros notam-se duas bandas distintas, uma em 435 nm predominante em meios ácidos (pH < 3) e outra em 490 nm em meios básicos (pH > 8). Para valores de pH intermediários não há uma nítida definição das bandas, devido à intensa sobreposição. Porém, seguindo-se a recomendação de monitorar a variação de intensidade junto à banda de máxima absorção,⁴¹ $\lambda_{m\acute{a}x} = 490$ nm, o perfil obtido foi próximo ao de monoexponencial (Figura 3H), resultando em um único valor de pK_a quando na verdade são esperados três como já citado.⁵² Dada essa incoerência, analisou-se a variação de absorvância em diversos outros comprimentos de onda. Tomando-se 440 nm como λ_{anal} visualiza-se três pK_a (Figura 3H), sendo $pK_{a1} = 2,30$; $pK_{a2} = 4,40$; e $pK_{a3} = 6,38$. Nesse caso, é evidente que a escolha do comprimento de onda analítico foi fundamental. Assim, em sistemas protolíticos complexos pode-se obter resultados coerentes com a utilização de metodologias univariadas, desde que se faça uma varredura de diversos comprimentos de onda à procura de um λ_{anal} que reflita todos os equilíbrios protolíticos, o que não é usual e é de difícil execução, podendo ainda levar a equívocos.

Como verificado, de forma geral, a aplicação de análise univariada para corantes que apresentem dois ou mais pK_a aliada a uma intensa sobreposição espectral não é confiável, como é o caso da EOS e FSC. Propositamente, a comparação dos valores obtidos com os existentes na literatura é discutida mais adiante em conjunto com aqueles resultantes do método quimiométrico.

Método quimiométrico de determinação de pK_a

Para o VM, dentro da faixa de pH investigada tem-se duas formas protolíticas, como previamente apresentado (Figura 2A). Na Análise das Componentes Principais (ACP) verificou-se que duas variáveis (que corresponde ao envolvimento de duas espécies) explicam 99,835% da variância contida nos dados, conforme

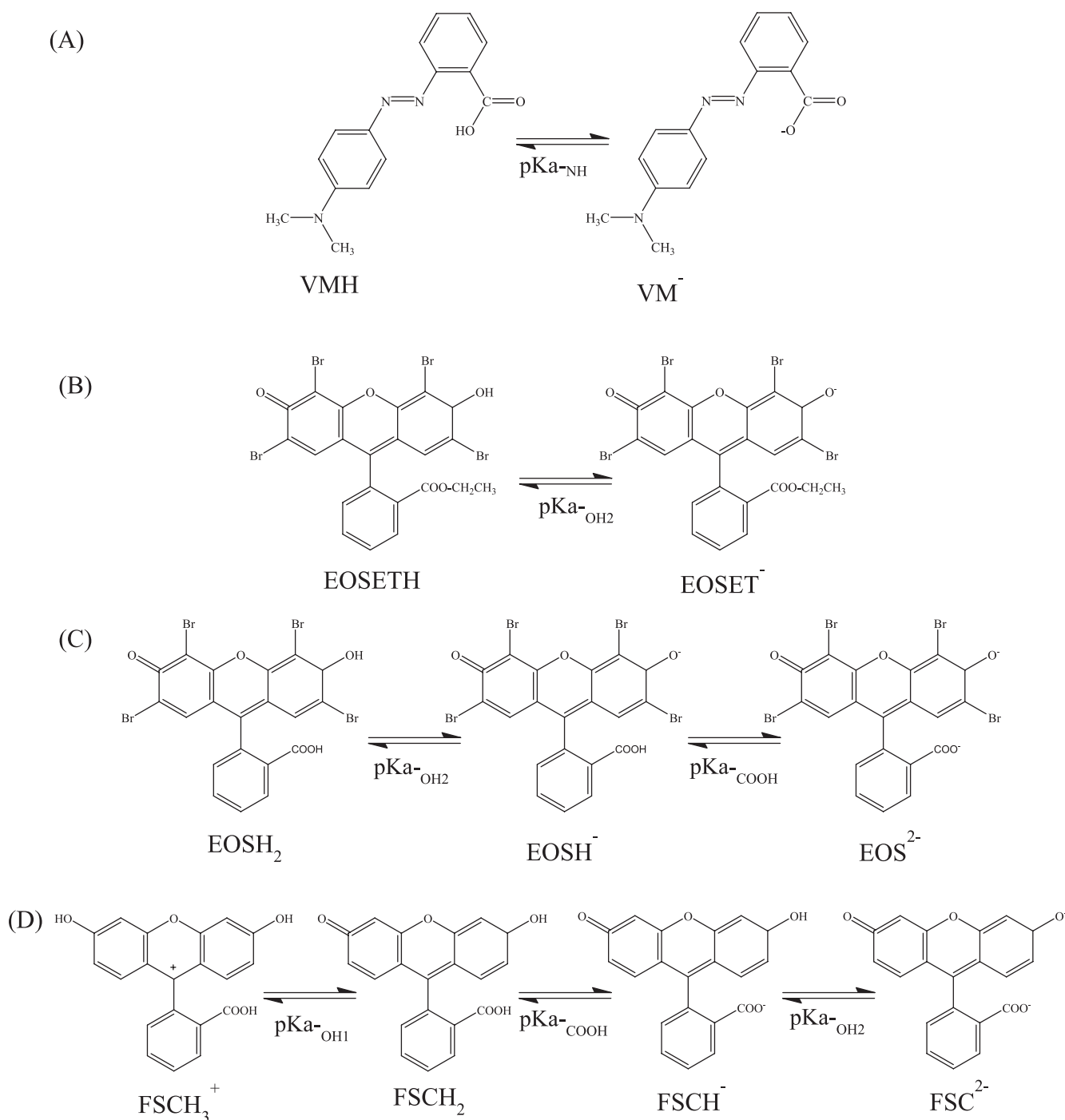


Figura 2. Equilíbrios ácido-base dos corantes estudados: (A) Vermelho de metila,⁴⁵ (B) Etil-eosina,⁴⁶ (C) Eosina⁴⁶ e (D) Fluoresceína⁴⁶

listado na Tabela 1. Desta forma, o sistema na totalidade reúne informações de acordo com a existência de apenas duas espécies protolíticas, sendo que a quantidade de informações descritas pela terceira é somente 0,121%. Assim, a partir das evidências químicas do conhecimento estrutural do corante e de ter-se a contribuição da terceira variável muito pequena, a existência desta terceira espécie protolítica é desconsiderada.

A mesma metodologia foi aplicada para os demais corantes utilizando-se do conhecimento químico e dados da literatura, principalmente quanto ao número de espécies. Na Figura 4 estão apresentadas as frações de cada espécie protolítica dos corantes, em cada pH dentro do intervalo avaliado, calculadas a partir do valor de pK_a gerado pela Quimiometria e pelas equações polinomiais. O valor

de pK_a foi determinado interpolando-se no gráfico o pH no qual há a existência de 50% de cada espécie protolítica.

Comparação de valores de pK_a determinados pelas metodologias convencional e quimiométrica com os valores da literatura

Os valores de pK_a determinados a partir da metodologia quimiométrica para os corantes estudados encontram-se na Tabela 2, juntamente com aqueles determinados pelo método univariado - convencional, bem como os valores descritos na literatura.

No caso do VM, corante que apresenta equilíbrio simples com uma discreta sobreposição espectral, não se observou diferença

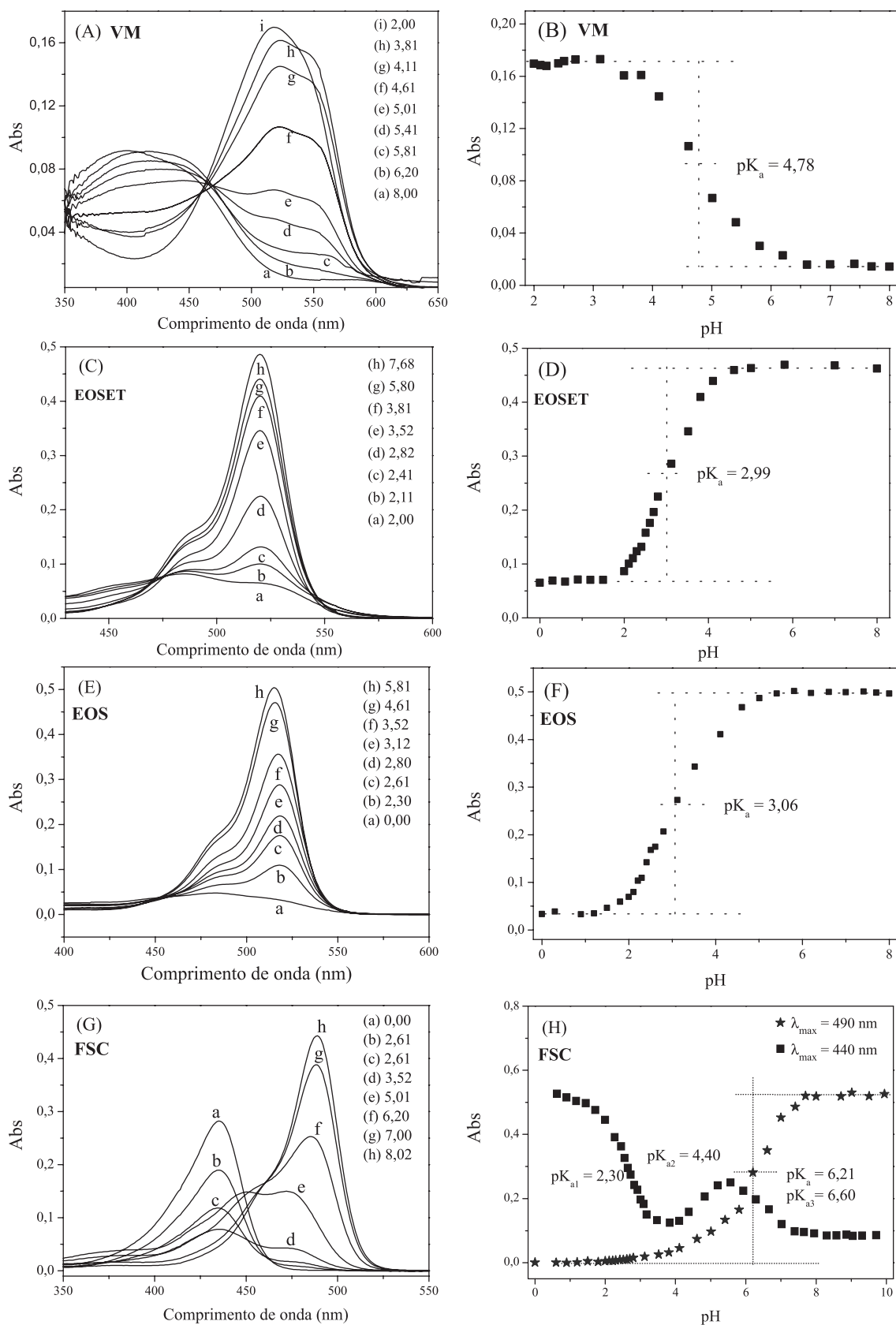


Figura 3. Espectros de absorção em diferentes pH em meio aquoso e variação de absorvância no λ_{anal} : (A) e (B) VM; (C) e (D) EOSET; (E) e (F) EOS; (G) e (H) FSC

significativa entre os valores de pK_a determinados pelas metodologias univariada e quimiométrica, sendo estes muito próximos ao descrito na literatura (Tabela 2). Aqui se enfatiza que no caso do VM, um

composto com baixa sobreposição espectral e com apenas duas espécies protolíticas, é possível obter resultados confiáveis independentemente do tratamento aplicado.

Tabela 1. Porcentagem de variância das componentes principais para o VM

N ^o de componentes	Variância explicada (%)	Variância acumulada (%)
1	80,912	80,912
2	18,923	99,835
3	0,121	99,956

Tabela 2. Comparação dos valores de pK_a obtidos experimentalmente com os reportados na literatura. Corantes em meio aquoso a 30,0 °C com [NaCl] = 0,10 mol L⁻¹

Corante	grupo	Met. Univariada	Quimiometria	Literatura
VM	pK _{a-NH}	4,8	5,0	5,0 ^a
EOSET	pK _{a-OH2}	2,8	2,2	1,9 ^b
EOS	pK _{a-OH2}	2,4	3,8	2,8 ^b
	pK _{a-COOH}			
FSC	pK _{a-OH1}	2,4	2,6	2,1 ^b
	pK _{a-COOH}	4,5	3,8	4,5 ^b
	pK _{a-OH2}	6,3	6,2	6,8 ^b

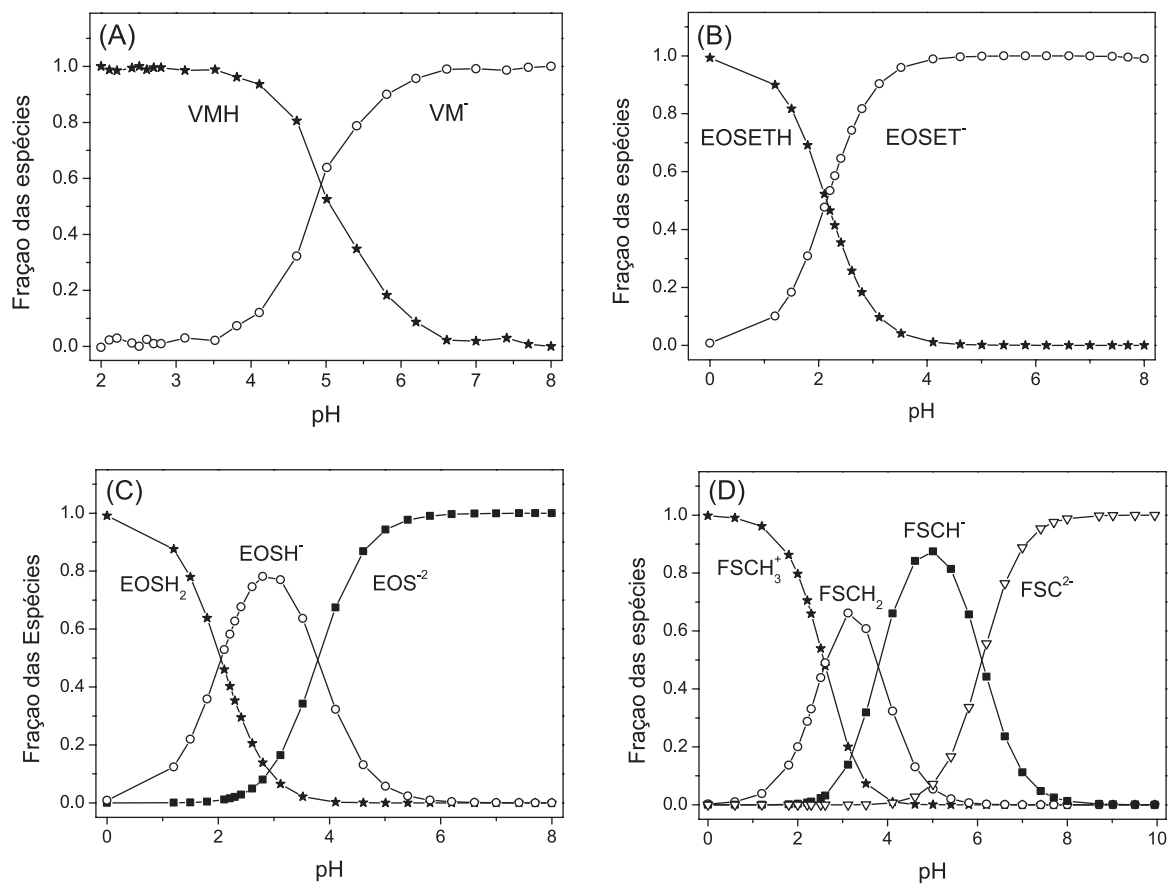
^aref 45; ^bem [KCl] = 4,0 mol L⁻¹ e [corante] = 8,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ (ref 47).

Para a **EOSET** a Quimiometria resultou em pK_a de 2,2, valor significativamente diferente daquele pela metodologia univariada ($\Delta = 0,6$ unidades, Tabela 2), mas próximo do reportado, também obtido por tratamento tradicional ($\Delta = 0,3$ unidades). Embora possua apenas um equilíbrio protolítico, a **EOSET** apresenta sobreposição espectral mais intensa entre suas formas protolíticas (Figura 3C), do que o **VM**

(Figura 3A). Dessa forma a metodologia quimiométrica, que avaliou a contribuição de cada espécie a partir da análise simultânea de dados em vários comprimentos de onda, mostra-se mais confiável. A pequena diferença com a literatura de 0,3 unidades está relacionada às condições empregadas em cada caso e a erros experimentais. No caso da **EOSET**, para o pK_a de 1,9 da literatura usou-se KCl e altas concentrações do corante em meio aquoso, sendo que nesta situação a **EOSET** pode se auto-agregar prejudicando a determinação.⁵⁰ No presente trabalho, não ocorre a interferência de efeitos oriundos da auto-agregação, pois nas condições experimentais a **EOSET** seguiu a Lei de Lambert-Beer.

A vantagem da ferramenta quimiométrica na determinação de pK_a, frente aos métodos convencionais de análise, torna-se mais evidente quando avaliados os resultados obtidos para sistemas ainda mais complexos. Exemplo disso são os casos representados pela **EOS** e **FSC**, onde os corantes além de possuírem múltiplos equilíbrios de protonação apresentam intensa sobreposição espectral. Esta parte do trabalho, já parcialmente publicada pelo nosso grupo de pesquisas, é reapresentada a fim de ilustrar sistemas mais complexos.^{20,49}

Com os métodos quimiométricos conseguiu-se solucionar o problema encontrado para a **EOS** ao determinar seu pK_a através da análise univariada, isto é, a inconsistência entre o número de grupos protonáveis identificados. Enquanto a metodologia univariada forneceu apenas um valor de pK_a, a Quimiometria e os conhecimentos prévios do corante permitiram obter os dois valores. Adicionalmente, a atribuição do pK_a mais ácido da **EOS** (2,1) foi feito por comparação com a **EOSET** (2,2 para o pK_{a-OH2}). Assim, na Tabela 2, atribui-se o pK_a mais ácido (2,1) ao grupo fenol (pK_{a-OH2}) e, conseqüentemente, o menos ácido (3,8) ao carboxílico (pK_{a-COOH}) para a **EOS**. Esta maior acidez do grupo fenol é justificada pelo intenso efeito retirador de densidade eletrônica dos átomos de bromo, muito eletronegativos, na região do anel xantênico.⁴⁹ A importância da análise multivariada

**Figura 4.** Frações das espécies protolíticas dos corantes em diversos pH: (A) VM, (B) EOSET, (C) EOS e (D) FSC

fica ainda mais evidente quando se avalia os resultados da ACP para este corante. Esta mostrou que duas espécies representariam apenas 97,699% do conjunto de dados, no entanto três espécies correspondem a 99,971% da variância contida nos dados, ou seja, muito mais significativa. A elevada sobreposição espectral e principalmente a pequena diferença entre os pK_a (de 1,7 unidades, Tabela 2) dificultam a determinação do pK_a pela metodologia convencional para a EOS. Dessa forma, a aplicação da metodologia proposta reflete o sistema químico real por levar em consideração todos os comprimentos de onda do espectro, gerando valores mais confiáveis de pK_a , uma vez que essa ferramenta maximiza a quantidade e qualidade das informações espectrais originais em cada pH.^{2,53}

No caso da FSC a determinação dos valores de pK_a por metodologia tradicional só foi possível após análise da absorbância em vários comprimentos de onda, até a detecção de um λ_{anal} (440 nm) que representasse coerentemente o sistema químico, ou seja, que permitisse a visualização dos três pK_a . Por outro lado, a aplicação da metodologia quimiométrica solucionou esse trabalhoso procedimento de forma mais direta. Através da ACP observa-se que quatro espécies (três valores de pK_a) correspondem a 99,990% do conjunto de dados, o que é condizente com a estrutura do composto. Embora não se tenha observado diferenças significativas entre os pK_a determinados para os grupos -OH1 e -OH2 utilizando metodologias uni e multivariada (Tabela 2), uma diferença considerável foi detectada quando avaliou-se o pK_a do grupo COOH (região intermediária de pH e com maior sobreposição espectral). Devido à sobreposição espectral das espécies em equilíbrio, o valor determinado pela técnica univariada fica sob suspeita e acrescenta-se que alguns autores mostraram claramente a dificuldade de determinação do equilíbrio ácido-base da FSC a partir das metodologias univariadas, levando inclusive a valores discordantes.^{50,52} Dessa forma, considera-se o tratamento multivariado mais confiável. Adicionalmente, as diferenças obtidas entre os valores determinados por Quimiometria e aqueles encontrados na literatura devem-se principalmente às metodologias empregadas, uma vez que os últimos foram tratados através do procedimento univariado.⁵² Some-se a este as diferenças nas condições experimentais.

Para os corantes que apresentam equilíbrios complexos, as simulações dos espectros das espécies protolíticas puras foram obtidas e estão disponibilizadas como Material Suplementar.

CONCLUSÕES

Embora a Quimiometria seja uma importante ferramenta de análise já empregada na área industrial e de pesquisa, a mesma ainda não foi amplamente difundida nos cursos de graduação, principalmente no âmbito experimental. Assim, a determinação de constantes de acidez de corantes indicadores possibilita a aplicação prática dos conceitos de análise multivariada, inclusive em sistemas onde tem-se: (1) intensa sobreposição de bandas nos espectros; (2) baixa qualidade do sinal analítico (razão sinal/ruído menor que um, ou influência da linha base nos espectros); (3) interferência entre equilíbrios químicos (por exemplo, proximidade de pK_a e a existência de vários equilíbrios). Assim, demonstrou-se a maior eficiência do método multivariado comparado a determinações clássicas na obtenção dos pK_a . No presente trabalho utilizou-se do conjunto de aplicativos MASDA, que exige custo computacional mínimo, podendo ser utilizado por alunos de graduações em Química. A escolha dos sistemas protolíticos a serem analisados depende de tempo, custo e das condições laboratoriais existentes, cabendo ao professor sua definição.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Um tutorial, passo a passo, para a utilização dos aplicativos

MASDA, o link para download dos mesmos e os espectros simulados das espécies protolíticas puras estão disponíveis em <http://quimica-nova.s bq.org.br>, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Araucária (SETI - Paraná) e ao CNPq/nBioNet pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Leitão, A.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 178.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1401.
- Poppi, R. J.; Pasquini, C.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1993**, *19*, 243.
- Scarminio, I. S.; Barros, B.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 1st ed., Editora Unicamp: Campinas, 2001.
- Ferreira, M. M. C.; Antunes, A. M.; Melgo, M. S.; Volpe, P. L. O.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 724.
- Rencher, A. C.; *Methods of Multivariate Analysis*, 2nd ed., Wiley: New York, 2002.
- Everitt, B. S.; Dunn, G.; *Applied multivariate analysis*, Edward Arnold: London, 1991.
- Jolliffe, I. T.; *Principal component analysis*, 2nd ed., Springer: New York, 2002.
- Correia, P. R. M.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 481.
- Lyra, W. S.; Silva, E. C.; Araújo, M. C. U.; Frago, W. D.; Veras G.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1594.
- <http://www.mathworks.com/products/matlab>, acessada em Outubro 2013.
- http://www.minitab.com/ptBR/products/minitab/default.aspx?WT.srch=1&WT.mc_id=SEBR00520&langType=1046, acessada em Outubro 2013.
- <http://www.gnu.org/software/octave>, acessada em Outubro 2013.
- <http://www.hi-techsci.com/products/reactlab>, acessada em Outubro 2013.
- Howery, D. G.; Hirsch, R. F.; *J. Chem. Educ.* **1983**, *60*, 656.
- Ortiz, M. C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 1557.
- Sena, M. M.; Scarminio, I. S.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; *Talanta* **2000**, *53*, 453.
- Andrade, S. R. C.; Scarminio, I. S.; Nery, M. M. F.; Oliveira, A. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33*, 655.
- Março, P. H.; Scarminio, I. S.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 138.
- Batistela, V. R.; Cedran, J. C.; Oliveira, H. P. M.; Scarminio, I. S.; Ueno, L. T.; Machado, A. E. H.; Hioka, N.; *Dyes Pigment.* **2010**, *86*, 15.
- Tessaro, A. L.; Batistela, V. R.; Gracetto, A. C.; Oliveira, H. P. M.; Sernaglia, R. L.; Souza, V. R.; Caetano, W.; Hioka, N.; *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, *24*, 155.
- Tanabe, K.; Hölderich, W. F.; *Appl. Catal.*, **A** **1999**, *181*, 434.
- Sabadini, E.; Bianchi, J. C. A.; *Química Nova na Escola* **2007**, *25*, 10.
- Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 8th ed., LTC: Rio de Janeiro, 2012.
- Gonsalves, A. A.; Araújo, C. R. M.; Leite Filho, C. A.; Medeiros, F. S.; *Quim. Nova* **2013**, *36*, 1236.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de Bioquímica*, 4th ed., Sarvier: São Paulo, 2007.
- Andrade, J. B.; Sarno, P.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 213.
- Maia, D. J.; Gazotti, W. A.; Canela, M. C.; Siqueira, A. E.; *Química Nova na Escola* **2005**, *21*, 44.
- Parikh, S. J.; James, B. R.; *Nature Education Knowledge* **2012**, *3*, 2.
- Gava, A. J.; Silva, C. A. B.; Frias, J. R. G.; *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*, Nobel: São Paulo, 2008.

31. Avdeef, A.; Testa, B.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1681.
32. Kraft, A.; *J. Chem. Educ.* **2003**, *80*, 554.
33. Vidotti, E. C.; Rollemberg, M. C. E.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 230.
34. Völgyi, G.; Ruiz, R.; Box, K.; Comer, J.; Bosch, E.; Takács-Novák, K.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 418.
35. Heyes, M. P.; Ashworth, R.; *Transp. Res.* **1972**, *6*, 287.
36. Antonov, L.; Stoyanov, S.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *314*, 23.
37. Sena, M. M.; Fernandes, J. C. B.; Rover Jr., L.; Poppi, R. J.; Kubota, L. T.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *409*, 159.
38. Copley, C. M.; Campbel, D. J.; *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 748.
39. Usui, Y.; *Chem. Lett.* **1973**, *7*, 743.
40. http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/19/199540/199540-BULK____SIAL____.pdf, acessada em Dezembro 2013.
41. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 8th ed., Thomson Learning: São Paulo, 2006.
42. Previdello, B. A. F.; Carvalho, F. R.; Tessaro, A. L.; Souza, V. R.; Hioka, N.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 600.
43. Freisinger, E.; *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 369.
44. Daniels, F.; Alberty, R. A.; Willians, J. W.; Cornwell, C. D.; Bender, P.; Hariman, J. E.; *Experimental Physical Chemistry*, 7th ed., Mc Graw Hill Book: Tóquio, 1970.
45. Scarminio, I. S.; Ishikawa, D. N.; Barreto, W. J.; Paczkowski, E. L.; Arruda, I. C.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 590.
46. Forina, M.; Leardi, R.; Armanino, C.; Lanteri, S.; *Parvus: an extendable package of Programs for data exploration*, Elsevier: Amsterdam, 1988.
47. Sharaf, M. A.; Illman, D. L.; Kowalski, B. R.; *Chemometrics*, Wiley: New York, 1986.
48. Srour, R. K.; McDonald, L. M.; *J. Chem. Eng. Data* **2008**, *53*, 116.
49. Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; Souza, F. D.; da Costa, W. F.; Santin, S. M. O.; Souza, V. R.; Caetano, W.; Oliveira, H. P. M.; Scarminio I. S.; Hioka N.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, *79*, 889.
50. Mchedlov-Petrosyan, N. O.; Kleshchevnikova V. N.; *J. Chem. Soc.* **1994**, *90*, 629.
51. Espenson, J.; *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, McGraw Hill Book: New York, 1981.
52. Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M.; *Spectrochim. Acta, Part A* **1995**, *51*, 7.
53. Brereton, R. G.; *Analyst* **2000**, *125*, 2125.

A QUIMIOMETRIA NOS CURSOS DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: PROPOSTA DO USO DA ANÁLISE MULTIVARIADA NA DETERMINAÇÃO DE pK_a

Paulo Cesar de Souza Pereira^a, Camila Fabiano de Freitas^a, Cristiane Santi Chaves^a, Bianca Martins Estevão^a, Diogo Silva Pellosi^a, André Luiz Tessaro^b, Wagner Roberto Batistela^c, Ieda Spacino Scarminio^d, Wilker Caetano^a e Noboru Hioka^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bUniversidade Tecnológica Federal do Paraná, 86812-460 Apucarana – PR, Brasil

^cDepartamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, 87506-370 Umuarama – PR, Brasil

^dDepartamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, 86051-980 Londrina – PR, Brasil

Tutorial para uso do CONJUNTO computacional MASDA

O conjunto de aplicativos MASDA é disponibilizado na internet, podendo ser baixado livremente do seguinte endereço: <http://www.dqi.uem.br/arquivos.html>. Recomenda-se que as atividades desenvolvidas com o MASDA sejam creditadas à Prof. Dr^a. Ieda Spacino Scarminio (Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná).

Para o uso dos aplicativos MASDA, deve-se salvar todos os espectros individualmente a diferentes pH na mesma pasta do executável do programa, ou seja, junto com os 4 aplicativos: **UV**, **FATOR**, **ROTAÇÃO** e **MATK1**.

Os espectros devem estar no formato “.txt”, com os decimais separados por ponto e os pares de coordenadas separados por um espaço (ex.: 500.003 0.1512 o que corresponde ao par λ e *absorbância* separados por um espaço entre si). Para isso pode-se utilizar o editor de texto “Bloco de Notas” do Windows. Esses arquivos devem ser numerados em sequência para facilitar a entrada dos dados no aplicativo de entrada, o programa **UV**, que organiza todos os espectros na forma matricial. (ex.: Ex.: 01.txt; 02.txt; 03.txt e assim por diante, até o último espectro obtido). Em seguida, o aplicativo **FATOR** calcula a matriz de associação, aplicando o método Q de Imbrie. Esses dados são submetidos à projeção oblíqua e rotação varimax usando o terceiro aplicativo, o **ROTAÇÃO**, a partir do qual se obtém as concentrações relativas das espécies protolíticas. Finalmente, com o uso do **MATK1**, obtêm-se os espectros das espécies puras.

APLICATIVO 1. UV

Função: Gerar a matriz de associação (representar os dados na forma matricial)

1. Abra o aplicativo **UV**.
2. Digite o nome do arquivo de entrada. **Ex.: 01.txt + enter** (nome dado ao primeiro espectro).
3. Digite um nome para o arquivo de saída. **Ex.: dye.txt + enter** (será utilizado no programa 2).
4. Digite o número de espectros a serem analisados. **Ex.: 30 + enter**.
5. Digite o número de pontos experimentais em cada espectro. Nessa opção, deve-se digitar a quantidade de pares (λ , Abs) dos espectros.
Ex.: 351 (nº de $\lambda = 351$ nm, numa varredura de 350 a 700 nm, de 1 em 1 nm) **+ enter**.
6. Digite o número de variáveis de corte. **Como regra, digite: 0 + enter**.
7. Digite, um a um, os nomes dos demais arquivos, por exemplo **02.txt + enter**, **03.txt + enter** e assim por diante. O programa é interativo, ou seja, necessita que o usuário determine os nomes dos arquivos até o último espectro.

*e-mail: nhioka@uem.br

APLICATIVO 2. FATOR

Função: Calcular a matriz de associação (Método Q de Imbrie)

1. Abra o aplicativo **FATOR**.
2. Digite o nome do arquivo de entrada: **dye.txt + enter** (nome do arquivo de saída gerado no Programa 1)
3. Digite o número de amostras (espectros) a serem analisados. **Ex.: 30 + enter**.
4. Digite o número de variáveis (o número de comprimentos de onda). **Ex.: 351 + enter**.
5. Digite o número de fatores desejados. Obs.: Geralmente o número de fatores é igual ao número de espécies absorventes no meio ($n \geq 2$). Verifique a consistência dos resultados a cada mudança de número de fatores.
6. Ao final do programa serão gerados 7 (sete) arquivos FAT. Alguns deles serão analisados no aplicativo **ROTAÇÃO**. O FAT06 contém a matriz de associação obtida no UV. O FAT03 contém a análise dos componentes principais (o comprimento do vetor de cada espectro, a matriz de similaridade, a tabela de variância acumulada e tabela de correlação matriz-coluna). O FAT08 contém a matriz dos escores (sem as rotações). O FAT09 contém a matriz dos loadings (sem as rotações). O FAT02, o FAT04 e o FAT07 são arquivos de trabalho, utilizados para o programa funcionar corretamente.

APLICATIVO 3. ROTAÇÃO

Função: Obter as concentrações relativas calculadas (Projeção Oblíqua e Varimax)

1. Abra o aplicativo **ROTAÇÃO**.
2. Digite um nome para o arquivo de saída. **Ex.: dye3f.txt + enter**
3. Ao final, o programa gerará outros três arquivos além do arquivo de saída dye3f.txt: o WORK 1, WORK2 e VARX 05. Para visualizar os resultados, importe o arquivo de saída (**dye3f.txt**) em um software com planilha de dados, como o Origin[®] ou Microsoft Excel[®] e correlacione os valores de concentração relativa com os valores de pH. WORK1, WORK2 e VARX05 são arquivos de trabalho.

APLICATIVO 4. MATK1

Função: Gerar os espectros calculados das espécies puras

1. Abra o aplicativo **MATK1**.
2. Para matriz de calibração, **digite 0 + enter**.
3. Nome do arquivo contendo os espectros (gerado na Etapa 1) **Ex.: dye.txt + enter**
4. Digite o nome do arquivo com as concentrações (gerado na Etapa 3). **Ex.: dye3f.txt + enter**
5. Digite um nome para o arquivo de saída. **Ex.: dyeespc.txt + enter**

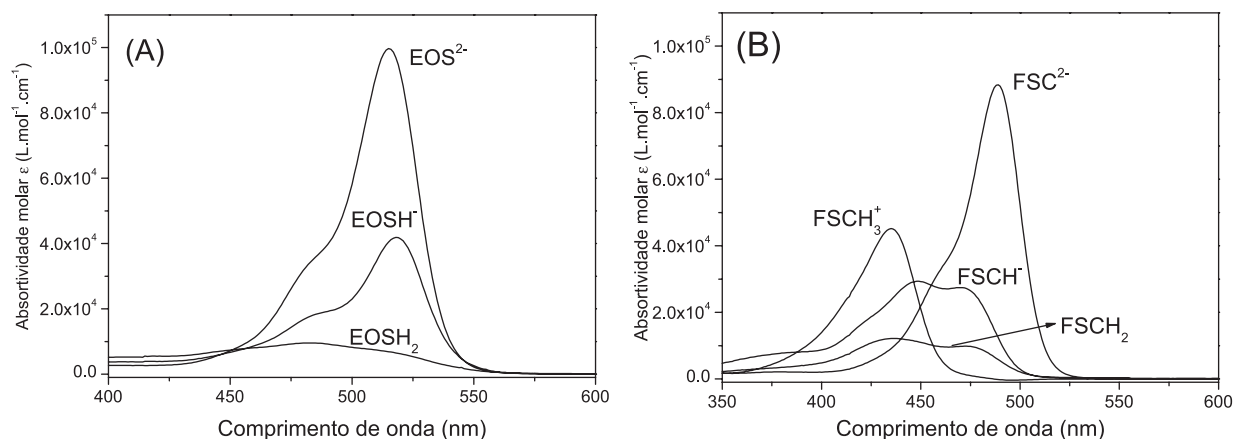


Figura 1S. Espectros simulados das espécies protolíticas puras, calculados com o método da matriz-*K* para os corantes (A) EOS e (B) FSC

6. Digite o número de pontos no espectro. **Ex.: 351 + enter**
7. Digite o número de componentes na amostra (número de fatores).
Ex.: 3 + enter
8. Digite o número de amostras no conjunto de treinamento (número de espectros). **Ex.: 30 + enter**
9. Digite o número de amostras no conjunto teste (número de espectros). **Ex.: 30 + enter**
10. O aplicativo gerará um número *x* de arquivos (a quantidade é dependente do número de amostras de trabalho). Para visualizar os espectros das espécies puras, importe o arquivo WORK5 no Programa Origin® e correlacione os valores de absorbância relativa com os números de comprimento de onda.
11. Ao final serão gerados outros três arquivos de trabalho: WORK7, WORK8 e dyeespc.

ESPECTROS SIMULADOS

Na Figura 1S são apresentados os espectros simulados das espécies protolíticas puras para os corantes que apresentam equilíbrios complexos. Tais espectros foram gerados pelo aplicativo **MATK1** do MASDA, uma vez conhecidos os valores de pK_a . Para os sistemas em equilíbrios simples envolvendo apenas duas espécies protolíticas (**VM** e **EOSET**) esses espectros são obtidos experimentalmente diretamente em meios ácidos e básicos.¹

REFERÊNCIAS

1. Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; Souza, F. D.; da Costa, W. F.; Santin, S. M. O.; Souza, V. R.; Caetano, W.; de Oliveira, H. P. M.; Scarmínio I. S.; Hioka N.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, 79, 889.