UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"ESPECTROPOLARÍMETRO COMPUTADO
RIZADO: NOVA MANEIRA DE OBTEN
ÇÃO DA ATIVIDADE ÓTICA"

Washington Luiz de Barros Melo

Dissertação apresentada ao Ins
tituto de Física e Química de
São Carlos, para obtenção do
título de Mestre em Física
Aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Rosemary Sanches

OK

USP / IFQCS / 851

0-2-00007

Departamento de Física e Ciência dos Materiais
São Carlos - 1985

BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS - USP
FÍSICA

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE _____

Washington Luiz de Barros Melo

APRESENTADA AO INSTITUTO DE FÍSICA E QUÍMICA DE SÃO CARLOS, DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 23 DE maio DE 1985.

COMISSÃO JULGADORA:

Rosemary Sanches

Dr. Rosemary Sanches

- Orientador

Valentín Obac Roda

Dr. Valentín Obac Roda

Pe. Alberto Jordão

Dr. José Alberto Rodrigues Jordão

Aos meus pais Heleno e
Alice e a minha esposa
e filha Eleonice e
Natália

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Rosemary Sanches, que me orientou neste trabalho, por seus ensinamentos e amizade.
- Ao Prof. Otaciro R. Nascimento, pelo estímulo e amizade.
- Aos Profs. S. Mascarenhas, Yvonne P. Mascarenhas, Marcel Tabak, E.E. Castellano, por sua amizade e estímulo.
- Ao Prof. Renê Ayres de Carvalho, pelas discussões, seu estímulo e amizade.
- Ao Prof. Valentin O. Roda, pelos seus ensinamentos e amizade.
- Ao Prof. Adilson Gonzaga (Dep. Engenharia Elétrica da EESC), pela sua grandiosa colaboração na realização deste trabalho e acima de tudo sua sincera amizade.
- Aos Profs. José Guilherme Sabe e José A. Sartori, (Dep. Engenharia Elétrica da EESC) pelo seu estímulo e amizade.
- Ao Prof. Glaucius Oliva e família, pelo apoio e amizade.
- À Profa. Nilce (UNICAMP) pelo seu estímulo e sua amizade.
- À Família Rayel: Sr. Albano, Dona Wanda, Jacy, Iara e Junior pelo apoio, pela acolhida, pelo estímulo e pela grande amizade.
- Aos colegas do Laboratório de Biofísica, A.Alonso, S.Crestana, O. Baffa, J. Ruggiero, M. Colombo, Janice, Ana Célia, Ignes, Laura, pelo companheirismo e amizade.

- Ao colega Ladislau Martin Neto, pela sua amizade, colaboração e estímulo.
- Ao colega Aparecido Augusto (Cidão), pela sua amizade, estímulo e apoio fraterno.
- Aos colegas Paulo Estêvão (Juca) e Valin, pela sua colaboração , estímulo e amizade.
- Aos colegas do DFCM, Gerson Santarini, Adão , Mauro de Paula, Marcelo, Edmilton Cavalcanti, A. Carlos Vieira, A. Tannus, Dário , Wilson Toral, Tito, Nicolau, Ines (Laser), etc., pelo seu apoio e amizade.
- Aos colegas do Departamento de Química, Luciano, Albérico, Eduardo Baiano, etc., pela sua amizade e estímulo.
- Aos colegas Ciro e Pinheiro, pelo apoio e sua amizade.
- Ao colega e amigo Carlito Lariucci, pelo acolhimento, estímulo e sincera amizade.
- Aos técnicos da Oficina Mecânica do IFQSC: João Carlos dos Santos, Celso Emílio Ferri, Carlos Mozart Gonçalves, Marcelo Carlos Neri, Wagner R. Bianchini, Edson Luiz Pingueiro, Manoel R. Rancon, José Roberto Polissari pelo seu apoio, pelas construções das peças que usamos, neste trabalho, pelos ensinamentos e boa vontade, e principalmente pela sua amizade.
- Aos técnicos da Biofísica Sanches e Izabel, pela sua assessoria técnica.

- Aos técnicos dos demais laboratórios do DFCM: Rene de Oste (LASER) Marco Semensato e Dante Chinaglia (Eletretos), Joel Marcondes (Luminescência), Sr. Domingos Aiello (Ótica), Odir Camevarolo (Ressonância), Lírio de Almeida (LIE), Sr. Trombella (Cristalografia), Djalma e Maurici (Vidraria), etc., pelo apoio, boa vontade com que sempre me ajudaram e sua amizade.
- Ao técnico José Luiz (E. Elétrica - EESC) pela colaboração, boa vontade e amizade.
- À Sra. Sueli, pela colaboração, dedicação e sua amizade.
- À Sra. Nêuri, pela sua colaboração e amizade.
- Ao Guto, pela confecção dos desenhos.
- Às zeladoras, zeladores e vigilantes do IFQSC que tanto colaboram dia a dia na limpeza e segurança dos laboratórios.
- Ao DFCM pelo acolhimento que tenho recebido.
- Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.
- Agradeço muito especialmente a Deus, pela vida que nos dá, pela força e bondade.
- Também agradeço aos meus pais Heleno José de Melo e Alice F. S. de Melo, pelo seu amor e dedicação.
- Desejo agradecer à minha esposa Eleonice Maximo e Melo e a minha filha Natália Maximo e Melo, pelo incentivo, por sua resignação e pelo amor e alegria que tanto me proporciona.

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I - ATIVIDADE ÓTICA E SUA OBTENÇÃO	4
1.1 - Definição de Rotação Ótica	4
1.2 - Efeito Cotton (EC)	6
1.3 - Definição do Dicroísmo Circular (DC)	9
1.4 - Comparação do Efeito Cotton e Dicroísmo Circular	10
1.5 - Fenômeno de Absorção	10
1.6 - Absorção das luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda	13
1.7 - Elipticidade	14
1.8 - Relação entre Elipticidade e Dicroísmo Circular	17
1.9 - Relação entre Dicroísmo Circular e Dispersão Rotatória Ótica	18
1.10 - Origem Molecular	20
1º Caso	21
2º Caso	23
1.11 - Métodos Teóricos para Atividade Ótica	26
1.12 - Equação de Moffitt	28
1.13 - Determinação da Estrutura Secundária de Proteínas	29
1.14 - Métodos de Determinação de Conteúdos Estruturais por Dispersão Rotatória Ótica	29
1.15 - Métodos de Determinação de Conteúdos Estruturais por Dicroísmo Circular	31
1.16 - Equipamentos Existentes	37
Espectropolarímetro	37
1.17 - Métodos para Obtenção de Rotação Ótica	40
Método Keston (17)	40
Método de Rouy (17)	41
Método de ponto nulo (17)	41

1.18 - Espectrômetro de Dicroísmo Circular ou Di-	
crógrafo	42
CAPÍTULO II - O ESPECTRÔMETRO	47
2.1 - O Espectropolarímetro computadorizado (EPC)	47
2.1.1 - Fonte de luz	49
2.1.2 - Monocromador	51
2.1.3 - Sistema Ótico	52
2.1.3.0 - Colimador	52
2.1.3.1 - Os espelhos	53
2.1.3.2 - Polarizador	53
2.1.3.3 - Diafragma	55
2.1.3.4 - Suporte de Amostra	55
2.1.3.5 - Analisador	57
2.1.3.6 - Difusor	59
CAPÍTULO III - RESULTADOS	73
3.1 - O EPC funcionando como espectrofotômetro .	73
3.2 - O EPC funcionando como espectropolaríme-	
tro ou elipsômetro	82
CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES	99
APÊNDICE	107
A.1 - Sistema de Detecção para fotomultiplicadora	107
A.2 - Motores de passos ou de pulso e "driver-control"	109
A.3 - Interface	113
A.4 - Microcomputador	119
A.5 - Gravador Cassete	124
A.6 - Registrador	124
A.7 - Impressora	125
A.8 - Sequência de acionamento	125
A.9 - Introdução do Programa	127
BIBLIOGRAFIA	139

LISTA DE TABELAS

Tabela I	35
Tabela II	35
Tabela III	36
Tabela IV - Características da fonte de luz	49
Tabela V - Características da grade de difração	51
Tabela VI - DRO de sacarose obtido no EPC	86
Tabela VII - Rotação específica obtido da literatura (30) ...	88
Tabela VIII - DC e DRO da lâmina retardadora $\lambda/4$ obtida no EPC	93
Tabela IX - DRO de canfora obtido no EPC	97
Tabela X - Características do 7070 Detection System ORIEL (18)	108
Tabela XI - Controle de movimento dos motores de passo	112

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u>	a) luz linearmente polarizada composta por luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda	5
	b) rotação do plano de polarização da luz linearmente polarizada devido atravessar um meio opticamente ativo	5
<u>Figura 2.</u>	Plano da curva de DRO normal	5
<u>Figura 3.</u>	Plano da curva de DRO onde houve um Efeito Cotton negativo	8
<u>Figura 4.</u>	Plano da curva de DRO onde houve um Efeito Cotton positivo	8
<u>Figura 5a.</u>	Banda de Dicroísmo Circular positiva corresponde a Efeito Cotton positivo	11
<u>Figura 5b.</u>	Banda de Dicroísmo Circular negativa corresponde a Efeito Cotton negativo	11
<u>Figura 6.</u>	Luz elipticamente polarizada composta por luzes circularmente polarizada à direita e à esquerda , com diferentes amplitudes e fases iguais	16
<u>Figura 7.</u>	A luz emergindo do meio no qual $n_r \neq n_l$ e $\kappa_r \neq \kappa_l$ é elíptica e com seu eixo maior girado de um ângulo ϕ com relação a direção de OA.....	16
<u>Figura 8.</u>	Superposição de Efeito Cotton e superposição de bandas de dicroísmo circular	19
<u>Figura 9.</u>	Modelo de moléculas helicoidais interagindo com a luz polarizada. O eixo da hélice está perpendicular ao vetor propagação da luz.....	22
<u>Figura 10.</u>	A interação da luz com a molécula helicoidal deu origem a um momento de dipolo elétrico	22
<u>Figura 11.</u>	O movimento dos elétrons deu origem a um momento de dipolo magnético na molécula helicoidal	22

<u>Figura 12.</u>	Vetor campo elétrico resultante, $\vec{E}_R$, da soma vetorial do campo elétrico da luz incidente e o campo elétrico, $\vec{E}_p$ produzido pelo momento de dipolo elétrico, $\vec{p}$	24
<u>Figura 13.</u>	Interação da luz incidente com a molécula helicoidal está com seu eixo paralelo ao vetor campo elétrico desta luz	24
<u>Figura 14.</u>	Vetor campo elétrico resultante, $\vec{E}_R$, da soma vetorial do campo elétrico da luz incidente e o campo elétrico, $\vec{E}_m$, produzido pelo momento de dipolo magnético, $\vec{m}$	24
<u>Figura 15.</u>	Os diferentes tipos de hélices	25
<u>Figura 16.</u>	Espectro de DRO de poli- α -L-lisina em conformação α -hélice (curva 1), estrutura β (curva 2) e cadeia aleatória (curva 3)	32
<u>Figura 17.</u>	Espectro de DC de poli-L-lisina em conformação α -hélice (curva 1), β (curva 2) e cadeia aleatória (curva 3)	34
<u>Figura 18.</u>	Diagrama de bloco de um espectropolarímetro	37
<u>Figura 19.</u>	Modulação da luz linearmente polarizada através dos ângulos $\pm \beta$ com relação à posição do eixo de transmissão do analisador, A_n , quando não há amostra opticamente ativa.....	39
<u>Figura 20.</u>	Modulação da luz linearmente polarizada passando através de um meio opticamente ativo	39
<u>Figura 21.</u>	Diagrama de bloco de um dicrógrafo	43
<u>Figura 22.</u>	Intensidade de luz quando esta atravessa um meio absorvedor dicróico. A linha cheia corresponde a $\epsilon_r > \epsilon_\ell$. A linha tracejada corresponde a $\epsilon_r < \epsilon_\ell$..	44
<u>Figura 23.</u>	Esquema do Bloco do EPC	48
<u>Figura 24.</u>	Espectro da lâmpada de Xenônio 150W	50
<u>Figura 25.</u>	Esquema ótico do monocromador	50

<u>Figura 26.</u> Suporte do polarizador	54
<u>Figura 27.</u> Suporte de amostra	56
<u>Figura 28.</u> Mancal e eixo-suporte do analisador	58
<u>Figura 29.</u> Cabeça detetora - fotomultiplicadora e difusor	60
<u>Figura 30.</u> Elipse centrada com seus eixos sobre os eixos do po- larizador e analisador	64
<u>Figura 31.</u> Elipse girada de um ângulo α	65
<u>Figura 32.</u> As 4 posições de parada do analisador	69
<u>Figura 33.</u> Espectro de Transmitância obtido no EPC	75
<u>Figura 34.</u> Espectro de Transmitância obtido no EPC e no Espec- trofotômetro Cary-17	77
<u>Figura 35.</u> Espectro de absorbância de CO-Hemoglobina obtido no EPC	78
<u>Figura 36.</u> Espectro de Absorbância de CO-Hemoglobina obtido no EPC, demonstra o limite inferior de sensibilidade ..	79
<u>Figura 37.</u> Espectro de Cinética de Reação	81
<u>Figura 38.</u> Esboço da curva $\cos^2 \beta$	83
<u>Figura 39.</u> Gráfico da intensidade de luz chegando no detetor .	84
<u>Figura 40.</u> Espectro de DRO de sacarose	85
<u>Figura 41.</u> Esboço da lâmina $\lambda/4$	89
<u>Figura 42.</u> DRO da lâmina retardadora	91
<u>Figura 43.</u> Espectro de Elipticidade da lâmina retardadora.....	92
<u>Figura 44.</u> Intensidade de luz devido ao giro do analisador de <u>a</u> cordo com a lei de Malus	95
<u>Figura 45.</u> Intensidade de luz quando o analisador girante é po- sicionado em $\beta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ e -45°	95
<u>Figura 46.</u> Espectro de DRO de Canfora	96
<u>Figura 47.</u> Gráfico do Torque dos motores de passo	111

<u>Figura 48.</u> Esquema eletrônico da interface	114
<u>Figura 49.</u> Configuração dos pinos da Z80-PIO	116
<u>Figura 50.</u> Configuração dos pinos d da Z80-CPU	120

RESUMO

Montamos um espectrômetro o qual nos permite obter dados de atividade ótica - Dispersão Rotatória Ótica (DRO) e Dicroísmo Circular (DC) - simultaneamente. O sistema ótico consiste de uma fonte de luz, um monocromador, um polarizador, um suporte para amostra, um analisador girante e um detetor de luz. O analisador girante é sustentado por um mancal pneumático e gira usando um motor de passo, o qual é controlado por um microcomputador. Um outro motor de passo também controlado por microcomputador é usado para girar a grade de difração do monocromador. Para obter os espectros de DRO e DC, o monocromador pára em um certo comprimento de onda, enquanto o eixo de transmissão do analisador é posicionado em $\beta = 0^\circ$, 45° , 90° e -45° relativo ao eixo de transmissão do polarizador. O microcomputador através do detetor de luz lê as quatro intensidades de luz e usando o formalismo desenvolvido por nós, relaciona-as à elipticidade e a rotação ótica naquele comprimento de onda. O monocromador é então girado a um novo comprimento de onda e o procedimento é repetido. No final, os espectros de DC e DRO podem ser mostrados em uma Tabela ou como um Gráfico. Além de funcionar como um espectropolarímetro, o equipamento pode ser usado também como um espectrofotômetro, para acompanhar cinética de reação, para medir dicroísmo linear, etc... Devido à relação sinal/ruído, temos nos ângulos medidos, uma resolução de 1° .

ABSTRACT

We have assembled a spectrometer which provides the optical activity data - Optical Rotatory Dispersion (ORD) and Circular Dichroism (CD) - simultaneously. The Optical System consists of a source of light, a monochromator, a polarizer, a sample holder, a rotating analyzer and a light detector. The rotating analyzer is supported by a pneumatic bearing and rotates using a step motor which is controlled by a microcomputer. Another step motor also controlled by the microcomputer is used to rotate the diffraction grating of the monochromator. To obtain the ORD and CD spectra, the monochromator stops at a certain wave length, while the transmission axis of the analyzer is positioned at $\beta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ and -45° relative to the transmission axis of the polarizer. The microcomputer through the light detector reads the four light intensities and using the formalism developed by us relates them to the ellipticity and optical rotation at that wavelength. The monochromator is then rotated to a new wavelength and the procedure is repeated. At the end the CD and ORD spectra can be shown in a Table or as a graph. Besides functioning as a spectropolarimeter, the equipment can be use also as a regular spectrophotometer, to follow kinetic of reactions, to measure linear dichroism, etc... Due to the signal/noise ratio we have in the measured angles a resolution of 1° .

INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como objetivo a construção de um espectrômetro ótico para obtenção do fenômeno de atividade ótica, isto é, Dispersão Rotatória Ótica (DRO) e Dicroísmo Circular (DC). A este espectrômetro chamamos de Espectropolarímetro Computadorizado (EPC). O EPC funciona partindo do princípio que uma luz linearmente polarizada incidindo numa substância opticamente ativa emergirá elipticamente polarizada. Através de um analisador girante, determinamos quatro pontos distintos da elipse e calculamos a sua elipticidade e a rotação do seu eixo maior com relação à direção de polarização da luz incidente.

Temos então um equipamento para medir atividade ótica que não utiliza um modulador, que é um elemento ótico essencial nos equipamentos convencionais. Esta é uma grande vantagem pois resulta em um sistema ótico mais simples.

O EPC é comandado por um microcomputador através do controle de dois motores de passos que utilizamos para mover a grade de difração do monocromador e para mover o analisador. Para cada posição do monocromador o analisador pára em quatro posições específicas, onde as intensidades de luz são lidas e guardadas no microcomputador. Essas quatro intensidades são usadas para calcular o DC e DRO para aquele comprimento de onda da luz incidente. Quando todo espectro já tiver sido varrido, o microcomputador calcula os valores de DRO e DC para cada comprimento de onda. Os espectros assim obtidos podem ser registrados em um registrador X-Y e/ou impressos em uma Tabela através de uma impressora.

Para o cálculo de DC e DRO desenvolvemos dois métodos matemáticos. O primeiro método é para a obtenção do espectro de DRO desconsiderando a presença do dicroísmo circular e satisfazendo

aos seguintes requisitos:

- a) eliminar o termo de absorção;
- b) obter uma boa linearidade entre os sinais detetados e o ângulo de rotação ótica.

Usamos neste método o princípio dos ângulos simétricos (23). Os ângulos de modulação da luz linearmente polarizada é $\pm 45^\circ$. Com esta modulação podemos medir rotação ótica de amostra fortemente absorvente, o que não é possível em espectropolarímetros convencionais.

O segundo método considera a presença do DC e obtemos os dois fenômenos - DRO e DC - simultaneamente. Este método é semelhante ao método usado nos elipsômetros de analisador girante.

Com o EPC assim funcionando é possível se obter espectros de DRO e DC, mas além disso, ele pode ser usado também como espectrofotômetro na obtenção de absorção ótica. Neste caso, ele ainda tem a vantagem de poder medir dicroísmo linear, cinética de reações e variação de turbidez em função do tempo. A sua versatilidade faz do EPC um equipamento bastante útil nas pesquisas que envolvem a interação da luz com a matéria.

Este trabalho de dissertação está composto de quatro capítulos como descreveremos a seguir.

No Capítulo I, apresentamos uma noção do fenômeno de Atividade Ótica e sua aplicação às moléculas biológicas. Descrevemos também os equipamentos para medidas de DC e DRO convencionais, e seus métodos de funcionamento.

No Capítulo II, temos a descrição do EPC, seu método de funcionamento e os programas utilizados. Neste capítulo, descrevemos também os dois métodos matemáticos para obtenção da atividade ó

tica.

No Capítulo III, mostramos e discutimos os resultados espectroscópicos de atividade ótica e absorção ótica obtidos.

No Capítulo IV, temos as conclusões a respeito do presente trabalho. Explicamos as vantagens e dificuldades do EPC e propomos soluções para alguns dos problemas encontrados.

No apêndice, temos as características do sistema detetor, características dos motores de passos, descrição da interface, sequência de acionamento e os programas.

CAPÍTULO I

ATIVIDADE ÓTICA E SUA OBTENÇÃO

1.1 - DEFINIÇÃO DE ROTAÇÃO ÓTICA

Em 1825, Fresnel propôs um simples modelo para explicar o fenômeno de atividade ótica. A luz linearmente polarizada pode ser decomposta em componentes circularmente polarizadas à direita e à esquerda (Fig. 1a). Então um material opticamente ativo mostra birefringência circular, isto é, possui dois índices de refração, um para a luz circularmente polarizada à direita e outro para luz circularmente polarizada à esquerda. Assim o fenômeno pode ser explicado com base nas diferentes velocidades com que a luz se propaga através do meio.

Os campos elétricos de uma luz circularmente polarizada à direita e de uma luz circularmente polarizada à esquerda são dados por

$$\vec{E}_r = \vec{E}_0 (\hat{x} + i\hat{y}) e^{i(\omega t - K_r z)} \quad (1.1)$$

$$\vec{E}_\ell = \vec{E}_0 (\hat{x} - i\hat{y}) e^{i(\omega t - K_\ell z)} \quad (1.2)$$

supondo que a propagação é na direção z e sendo K_ℓ e K_r os números de propagação das respectivas luzes.

A luz linearmente polarizada pode ser obtida somando - se os dois vetores acima, isto é:

$$\vec{E} = \vec{E}_r + \vec{E}_\ell \quad (1.3)$$

Figura 1. a) luz linearmente polarizada composta por luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda.

b) rotação do plano de polarização da luz linearmente polarizada devido atravessar um meio opticamente ativo.

Figura 2. Plano da curva de DRO normal

substituindo as equações (1.1) e (1.2) em (1.3), obtemos

$$\vec{E} = 2E_0 e^{i[\omega t + (K_r + K_\ell) z/2]} \left[\cos(K_\ell - K_r) z/2 \hat{x} - \sin(K_\ell - K_r) z/2 \hat{y} \right] \quad (1.4)$$

Esta equação expressa a luz linearmente polarizada emergindo do meio opticamente ativo, cujo plano de vibração está girado por um ângulo ϕ dado por (Fig. 1b).

$$\phi = (K_\ell - K_r) d/2 \quad (1.5)$$

onde d é o caminho percorrido pela luz através da amostra e se $K = n\omega/c$ ou $K = nK_0$ onde K_0 é o número de propagação no vácuo, então

$$\phi = K_0 (n_\ell - n_r) d/2 = \frac{\pi}{\lambda_0} (n_\ell - n_r) d \quad (1.6)$$

O poder rotatório ótico específico é dado por:

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda_0} (n_\ell - n_r) \quad (1.7)$$

quando $n_\ell > n_r$ o meio é chamado dextrôgiro e quando $n_\ell < n_r$ o meio é chamado levôgiro.

1.2 - EFEITO COTTON (EC)

Na obtenção da rotação ótica foram considerados apenas comprimentos de onda fora das bandas de absorção.

Da equação (1.7), observamos que o gráfico de α versus λ , mostrado na Fig. 2, são famílias de hipérboles cujos planos das curvas podem ser positivos ou negativos/.

Este comportamento é chamado de curva de Dispersão Rotatória Ótica (DRO) normal.

Quando o espectro de DRO é gravado através de uma banda de absorção, o plano da curva se deforma exatamente na região desta absorção. A este efeito, chama-se DRO anômalo ou especificamente Efeito Cotton (EC) (1895) em homenagem a Cotton, que foi quem o descobriu (1,2).

Na Fig. 3, temos uma curva de DRO onde houve um efeito Cotton. Observa-se que quando vamos do comprimento de onda longo para comprimento de onda curto, temos um máximo negativo, depois α vai a zero e cresce positivamente. Esta forma de curva chamamos de Efeito Cotton negativo.

Se, como na Fig. 4, na curva de DRO ao diminuir λ , tem-se um máximo positivo, α vai a zero, e depois um máximo negativo, então diz-se que o Efeito Cotton é positivo.

Tem sido sugerido que as curvas de DRO normais são consequências da DRO anômalas, que são observadas em bandas de absorção opticamente ativas(3).

O Efeito Cotton é caracterizado por quatro aspectos(2):

1. O comprimento de onda do máximo da banda de dicroísmo circular corresponde ao ponto de inflexão da curva de DRO anômala. Em diversos casos, pequenas bandas de absorção podem ser sobrepostas por bandas mais intensas de absorção omitindo informações sobre a substância em exame. Contudo, pode ser frequentemente detectada em curvas de Efeito Cotton ou de dicroísmo circular, devido ao sinal inverso e/ou pequena largura da banda.
2. O sinal do Efeito Cotton é principalmente usado para determinação da estereoquímica.

Figura 3. Plano da curva de DRO onde houve um Efeito Cotton negativo

Figura 4. Plano da curva de DRO onde houve um Efeito Cotton positivo.

3. A intensidade do Efeito Cotton - pode ser usada para diferenciar entre os dois casos de cromóforos:

- a) cromóforos intrinsecamente assimétricos;
- b) cromóforos simétricos porém assimetricamente perturbados.

4. Estrutura fina do Efeito Cotton - em alguns casos, a posição de bandas em um Efeito Cotton com estrutura fina pode ser usada, para determinação estereoquímica.

1.3 - DEFINIÇÃO DO DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

O dicroísmo circular é a diferença entre a absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e a absorção da luz circularmente polarizada à direita, isto é,

$$\Delta A = A_{\ell} - A_r \quad (1.8)$$

A diferença ΔA varia com o comprimento de onda e pode ser positiva ou negativa. A forma da curva é semelhante à forma da curva de absorção de luz natural, pois não poderia ser o contrário, já que o dicroísmo circular também é um fenômeno de absorção. Se a forma da curva de absorção de luz natural é, por exemplo, gaussiana, então a forma da curva do dicroísmo circular também será gaussiana. As formas das curvas de dicroísmo circular são mais fáceis para se interpretar do que a forma da dispersão rotatória. O dicroísmo circular e o Efeito Cotton são no fundo, o mesmo fenômeno e ocorrem na região de uma banda de absorção. Enquanto que o dicroísmo circular é um efeito de absorção da luz polarizada circularmente, o Efeito Cotton surge da mudança no índice de refração do meio absorvedor. Portanto, a dispersão rotatória e o dicroísmo circular, são manifestações do mesmo fenômeno, isto é, a interação da luz polarizada com

a assimetria molecular.

1.4 - COMPARAÇÃO DO EFEITO COTTON E DICROÍSMO CIRCULAR

Vimos anteriormente que a curva de dispersão rotatória muda drasticamente na proximidade da banda de absorção, ocorrendo o Efeito Cotton. Como só na proximidade da banda de absorção é que ocorre o dicroísmo circular, podemos relacionar o dicroísmo circular com o Efeito Cotton.

O ponto de cruzamento da abscissa (comprimento de onda) é o ponto onde a absorção é máxima, ou seja, onde uma banda de dicroísmo circular está centrada (Ver Figs. 5).

Quando o dicroísmo circular é positivo, o Efeito Cotton também é positivo (Figura 5a). Quando o dicroísmo circular é negativo, o Efeito Cotton também é negativo (Figura 5b).

1.5 - FENÔMENO DE ABSORÇÃO

A interação da luz natural, isto é, não polarizada, com uma substância é caracterizada pelo índice de refração (n) e coeficiente de absorção (κ).

Supondo que a luz se propaga na direção z , temos então a expressão do campo elétrico da luz, dado por:

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{-i(\omega t - Kz)} \quad (1.9)$$

onde

$$K = \frac{\omega}{c}(n + i\kappa) \quad (1.10)$$

Figura 5a. Banda de Dicroísmo Circular positiva
corresponde a Efeito Cotton positivo

Figura 5b. Banda de Dicroísmo Circular negativa
corresponde a Efeito Cotton negativo

obtemos

$$\vec{E} = \vec{E}_0 e^{-\frac{\omega}{c} \kappa z} e^{-i(\omega t - \frac{n}{c} z)} \quad (1.11)$$

A intensidade da luz é então dada por:

$$I = I_0 e^{-2 \frac{\omega}{c} \kappa z} \quad (1.12)$$

A absorvância é expressa em termos do logarítmo na base 10:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = 2 \frac{\omega}{c} \kappa z \log_{10} e \quad (1.13a)$$

$$A = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa z \log_{10} e \quad (1.13b)$$

Definindo o coeficiente de extinção por

$$\epsilon' = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa \log_{10} e \quad (1.14)$$

podemos expressar a lei que rege os processos de absorção das seguintes formas:

$$\log_{10} \frac{I}{I_0} = -\epsilon' z \quad (1.15a)$$

se o caminho ótico através da amostra for " ℓ " então, $z = \ell$

$$\log_{10} \frac{I}{I_0} = -\epsilon' \ell \quad (1.15b)$$

então

$$I = I_0 10^{-\epsilon' \ell} \quad (1.16)$$

Em geral, na nomenclatura mais recente, usa-se

$$\epsilon' = \epsilon \log_{10} e \quad (1.17)$$

sendo

$$\epsilon = \frac{4\pi}{\lambda} \kappa \quad (1.18)$$

obtendo

$$I = I_0 e^{-\epsilon \ell} \quad (1.19)$$

Quando se trabalha com solução, o coeficiente de extinção, ϵ , é substituído por ϵC , onde C é a concentração da amostra. Assim, obtemos a expressão simples de Beer-Lambert

$$I = I_0 e^{-\epsilon C \ell} = I_0 10^{-\epsilon' C \ell} \quad (1.20)$$

1.6 - ABSORÇÃO DAS LUZES CIRCULARMENTE POLARIZADAS À DIREITA E À ESQUERDA

Se agora ao invés da amostra ser atravessada por luz monocromática comum, fizermos passar por ela luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, veremos que a absorção das duas últimas não são iguais. Portanto, deve haver quatro variáveis que especificam a interação da luz com a substância em exame. Estas são, n_ℓ , n_r , κ_ℓ e κ_r , onde as diferenças

$$n_\ell - n_r \quad \text{e} \quad \kappa_\ell - \kappa_r \quad (1.21)$$

nos dão a rotação ótica e o dicroísmo circular pelas equações

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} (n_{\ell} - n_r) \quad \text{e} \quad \Delta\epsilon' = \frac{4\pi}{\lambda} (\kappa_{\ell} - \kappa_r) \log_{10} e \quad (1.22)$$

Assim, a refração e absorção são dois aspectos do mesmo fenômeno, isto é, interação da onda eletromagnética com a matéria.

1.7 - ELIPTICIDADE

A luz linearmente polarizada ao atravessar um meio opticamente ativo, muda seu estado de polarização, passa a ser elíptica, quando na região de absorção.

Vamos deduzir uma expressão para essa elipticidade considerando, por simplificação, que os índices de refração, n_r e n_{ℓ} , são iguais, isto é, a luz circularmente polarizada à esquerda viaja no meio com a mesma velocidade da luz circularmente polarizada à direita.

A combinação das luzes circularmente polarizadas à direita e à esquerda com diferentes amplitudes e fases iguais, nos dará uma luz elíptica, como mostra a Figura 6.

A elipticidade é a relação entre o eixo menor pelo eixo maior da elipse.

$$e = \frac{\overline{OB}}{\overline{OA}} \quad (1.23)$$

O ângulo de elipticidade é dado por

$$\text{tg } \chi = \frac{\overline{OB}}{\overline{OA}} \quad (1.24)$$

Os campos elétricos das luzes circularmente polarizadas, propagando na direção de z , são dados por:

$$\vec{E}_r = a_0 e^{-2\pi\kappa_r z/\lambda} (\hat{x} + i\hat{y}) e^{i\omega(t - n_r z/c)} \quad (1.25)$$

e

$$\vec{E}_\ell = a_0 e^{-2\pi\kappa_\ell z/\lambda} (\hat{x} - i\hat{y}) e^{i\omega(t - n_\ell z/c)} \quad (1.26)$$

chamaremos de

$$a_r = a_0 e^{-2\pi\kappa_r d/\lambda} \quad (1.27)$$

e

$$a_\ell = a_0 e^{-2\pi\kappa_\ell d/\lambda} \quad (1.28)$$

as amplitudes das luzes circularmente polarizadas, depois de atravessarem a amostra de espessura d .

$$\operatorname{tg} \chi = \frac{a_r - a_\ell}{a_r + a_\ell} = \frac{OB}{OA} \quad (1.29)$$

substituindo as equações (1.27) e (1.28) na equação (1.29), obtemos

$$\operatorname{tg} \chi = \operatorname{tg} h [\pi(\kappa_\ell - \kappa_r) d/\lambda] \quad (1.30)$$

A direção de rotação do vetor campo elétrico da elipse é a mesma direção de rotação do vetor campo elétrico da luz circular que é menos absorvida.

Se $n_r \neq n_\ell$ e $\kappa_r = \kappa_\ell$, o vetor campo elétrico resultan

Figura 6. luz elípticamente polarizada composta por luzes circularmente polarizada à direita e à esquerda com diferentes amplitudes e fases iguais

Figura 7. A luz emergindo do meio no qual $n_r \neq n_l$ e $\kappa_r \neq \kappa_l$ é elíptica e com seu eixo maior girado de um ângulo ϕ com relação a direção de OA.

te é idêntico ao da equação (1.4). Portanto, obteremos uma luz linearmente polarizada mas giradas de um ângulo ϕ , como vimos anteriormente.

Se $n_r \neq n_l$ e $\kappa_r \neq \kappa_l$, isto é, se o meio além de absorver a luz tiver também índices de refração diferentes para cada luz circular, a luz emergente será elíptica, mas também girada de um ângulo θ com relação à direção $\overline{OA}$ (Ver Figura 7).

1.8 - RELAÇÃO ENTRE ELIPTICIDADE E DICROÍSMO CIRCULAR

Voltando à equação (1.30), e supondo os argumentos da tangente e da tangente hiperbólica serem muito pequenos, podemos fazer as seguintes aproximações:

$$\operatorname{tg} \chi \cong \chi \quad (1.31)$$

e

$$\operatorname{tg} h\left[\frac{\pi}{\lambda} (\kappa_l - \kappa_r) d\right] \cong \frac{\pi}{\lambda} (\kappa_l - \kappa_r) d \quad (1.32)$$

Portanto

$$\chi \cong \frac{\pi}{\lambda} (\kappa_l - \kappa_r) d \quad (\text{rad}) \quad (1.33)$$

onde χ é o ângulo de elipticidade ou muitas vezes, chamado simplesmente de "elipticidade".

Em geral, a elipticidade é definida em termos de elipticidade molar por

$$[\theta] = \frac{100 \chi}{d m} \quad (1.34)$$

onde d é o caminho através da amostra em centímetro, m é a concentração em mol/litro.

A maneira mais frequente de expressar a elipticidade molar é

$$[\theta] = \frac{180}{\pi} \times \frac{100\pi(\kappa_{\ell} - \kappa_r) \cdot d}{\lambda \cdot d \cdot m} \quad (1.35)$$

como

$$\kappa = \frac{\epsilon \cdot \lambda}{4\pi \log_{10} e} \quad (1.36)$$

então substituindo a equação (1.36) em (1.35), obtemos

$$[\theta] = 3300 \Delta\epsilon \quad (\text{graus.cm}^2/\text{dmol}) \quad (1.37)$$

onde

$$\Delta\epsilon = \epsilon_{\ell} - \epsilon_r \quad (1.38)$$

é o dicroísmo circular molar.

1.9 - RELAÇÃO ENTRE DICROÍSMO CIRCULAR E DISPERSÃO ROTATÓRIA ÓTICA

A comparação entre dicroísmo circular e dispersão rotatória ótica não conduz a informações novas a respeito da estrutura. Nas regiões de absorção, o dicroísmo circular dá informação mais precisa e mais fácil de interpretar do que aqueles dados por dispersão rotatória ótica.

Em muitas substâncias opticamente ativas, há diversos E -

feitos Cotton, alguns positivos, outros negativos. A cauda de um Efeito Cotton grande pode sobrepor-se a outros Efeitos Cotton menores, obscurecendo-os. Isto pode nos conduzir a erros de posição, sinal, e amplitude do Efeito Cotton. Por outro lado, as bandas de dicroísmo circular vão mais rapidamente a zero do que o Efeito Cotton na região fora do máximo de absorção. Ainda que haja sobreposições nas bandas de dicroísmo circular, estas sobreposições serão mais fáceis de serem resolvidas do que sobreposições dos Efeitos Cotton. As sobreposições dos Efeitos Cotton embora possam ser resolvidas, causam complicações com caudas de Efeito Cotton que podem estar centrados a centenas de nanômetro da região em que se está medindo (4). A Figura 8 mostra as sobreposições de Efeitos Cotton.

Figura 8. superposição de Efeito Cotton (acima)
superposição de bandas de dicroísmo circular (abaixo).

- I. Efeito Cotton grande que ocorreu longe da região observada
- II. Efeito Cotton menor ocorrendo na região observada
- III. pequeno Efeito Cotton, onde o pico positivo aparece totalmente sobreposto
- IV. pequeno Efeito Cotton sobreposto pelo I onde a amplitude e a posição foram prejudicadas
- V- VI - VII - são bandas de dicroísmo circular mostrando melhor resolução.

Fora das regiões de absorção, a dispersão rotatória é capaz de dar informação suplementar a respeito da estrutura.

Vemos desta maneira que os dois fenômenos dicroísmo circular e dispersão rotatória ótica, são interdependentes, que estão envolvidos na interação da radiação eletromagnética com a matéria, embora não sejam idênticos. O dicroísmo circular é resultado da absorção da energia de interação, enquanto que a dispersão rotatória ótica diz respeito ao movimento dos elétrons.

1.10 - ORIGEM MOLECULAR

Para uma molécula ser opticamente ativa, é necessário que não tenha centro de inversão e não tenha plano de reflexão.

Em linguagem de Teoria de Grupo, se a molécula tiver um eixo de simetria S_n , ela é opticamente inativa. A operação S_n consiste em uma rotação C_n e uma reflexão σ (5). Caso não tenha este eixo a molécula pode ser opticamente ativa.

Para explicar a atividade ótica a nível molecular, foram propostos diversos modelos. O modelo atualmente mais usado é de

grande aplicação biológica é aquele em que o elétron descreve um caminho helicoidal e envolve os momentos magnético e elétrico induzidos na molécula pelos campos elétrico e magnético da luz (6).

Neste modelo, considera-se um conjunto de moléculas idênticas cujas conformações sejam helicoidais. Suponhamos que todas as moléculas tenham uma mesma orientação no espaço em que se encontram e que estejam no plano perpendicular ao vetor propagação da luz (Figura 9).

Vejamos como a luz interage com uma dessas moléculas helicoidais.

1º CASO

Como mostra a Figura 9, vamos supor que o campo magnético da luz incidente é paralelo ao eixo da hélice. Pela Lei da indução eletromagnética, o campo magnético variando no tempo gera uma força eletromotriz. Da equação de Maxwell:

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = - \frac{1}{c} \frac{d\vec{B}}{dt} \quad (1.39)$$

ou

$$\oint \vec{E} \cdot d\vec{\ell} = - \frac{1}{c} \frac{d}{dt} \oint \vec{B} \cdot d\vec{a} \quad (1.40)$$

onde a integral de linha $\oint \vec{E} \cdot d\vec{\ell}$ nos dá a força eletromotriz gerada. Esta força eletromotriz forçará os elétrons a percorrerem a hélice para cima e para baixo, induzindo um momento de dipolo elétrico na hélice. Este momento de dipolo tem uma componente paralela ao eixo da hélice que na média é diferente de zero, enquanto que a componente perpendicular ao eixo da hélice na média é zero. Por-

Figura 9. Modelo de moléculas helicoidais interagindo com a luz polarizada. O eixo da hélice está perpendicular ao vetor propagação da luz.

Figura 10. A interação da luz com a molécula helicoidal deu origem a um momento de dipolo elétrico.

Figura 11. O movimento dos elétrons deu origem a um momento de dipolo magnético na molécula helicoidal (As setas indicam o movimento dos elétrons).

tanto, temos um momento de dipolo elétrico resultante, $\vec{p}$, ao longo do eixo da hélice (Figura 10).

Como num circuito fechado uma corrente elétrica circulando dá origem a um momento de dipolo magnético, temos ao longo da hélice um momento de dipolo magnético, devido ao movimento dos elétrons (Figura 11).

O momento de dipolo elétrico oscilante produz ondas cujo campo elétrico, $\vec{E}_p$, é paralelo ao campo magnético, $\vec{B}$, da luz incidente. As ondas emergindo do meio onde se encontram as moléculas, têm suas frentes paralelas às ondas da luz incidente que também estão emergindo do meio. Combinando-se vetorialmente os vetores dos campos elétricos de cada onda, $\vec{E}$ e $\vec{E}_p$, obtemos uma luz linearmente polarizada embora com o plano de polarização girado com um certo ângulo (Figura 12).

2º CASO

Vamos supor agora que ao invés do campo magnético, o campo elétrico seja paralelo ao eixo da hélice (Figura 13). Neste caso, o campo elétrico variando com o tempo forçará os elétrons a se moverem por um caminho helicoidal dando origem aos momentos de dipolos elétrico e magnético.

O momento de dipolo magnético é paralelo ao campo elétrico da luz incidente. Este momento de dipolo irradia um campo elétrico, $\vec{E}_m$, paralelo ao campo magnético da luz incidente. As duas ondas têm suas frentes de onda paralelas. Na combinação vetorial, de, $\vec{E}$ e $\vec{E}_m$, obtemos uma onda linearmente polarizada mas girada com um certo ângulo com relação ao campo elétrico da luz incidente (Figura 14).

Se a hélice for à esquerda, a rotação será oposta, mas

Figura 12. Vetor campo elétrico resultante, $\vec{E}_R$, da soma vetorial do campo elétrico da luz incidente e o campo elétrico, $\vec{E}_p$ produzido pelo momento de dipolo elétrico, $\vec{p}$.

Figura 13. Interação da luz incidente com a molécula helicoidal está com seu eixo paralelo ao vetor campo elétrico desta luz.

Figura 14. Vetor campo elétrico resultante, E_r , da soma vetorial do campo elétrico da luz incidente e o campo elétrico, E_m , produzido pelo momento de dipolo magnético, $\vec{m}$.

Figura 15. Os diferentes tipos de hêlices

de mesmo valor que aquele para hélice à direita. As diferentes hélices são mostradas na Figura 15.

Este modelo de hélice para descrever a atividade ótica de moléculas cujas conformações são total ou parcialmente uma hélice tem a seguinte interpretação (6). Se o raio da hélice for muito maior que o passo da hélice, o caminho percorrido pelo elétron será quase uma circunferência. Este movimento resulta em uma mudança pequena no momento de dipolo elétrico, ou seja, intensidade do oscilador é pequena e nos dá fraca absorção. Mas, por sua vez, o momento de dipolo magnético é grande porque a área da seção transversal da hélice é grande, nos dando grande contribuição para a rotação ótica.

Se o passo da hélice for muito maior que o raio de sua seção transversal, o momento de dipolo magnético é pequeno devido a pequena área da seção transversal. O caminho percorrido pelo elétron é quase uma reta, se assemelhando a um oscilador linear ligeiramente torcido. A intensidade do oscilador é grande nos dando uma forte absorção. Isto mostra o quanto a rotação ótica está associada a uma forte absorção.

Outro modelo existente mais antigo do que este acima - o modelo de Kuhn - chamado de modelo do oscilador acoplado, no fundo não passa de um caso particular do modelo de hélice (6).

1.11 - MÉTODOS TEÓRICOS PARA ATIVIDADE ÓTICA

As teorias eletrônicas da dispersão rotatória ótica tem sido desenvolvidas e revisadas por Drude (1900), Rosenfeld (1928), Lowry (1935), Kirkwood (1937), Kauzmann, Walter e Eyring (1940), Moffitt (1956), Shellman (1958), e tantos outros durante a década dos anos de 60 e 70.

De acordo com Drude, a atividade ótica depende da soma das transições eletrônicas. A equação de Drude é geralmente expressa do seguinte modo (3):

$$[\alpha]_{\lambda} = \sum_i \frac{K_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \quad (1.41)$$

onde λ_i é o comprimento de onda da i-ésima transição, K_i é uma constante e $[\alpha]$ é a rotação.

Rosenfeld foi capaz de mostrar que a constante K_i era equivalente a A_i vezes λ_i^2 onde A_i está relacionado à intensidade de rotatória R_i (3), então temos

$$[\alpha] = \sum_i \frac{A_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \quad (1.42)$$

e

$$R_i = \frac{hc}{96\pi N} A_i \quad (1.43)$$

Temos assim, uma expressão derivada da expressão de Drude

$$[\alpha] = \frac{96\pi N}{hc} \sum_i \frac{R_i \lambda_i^2}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \quad (1.44)$$

onde N é a densidade de molécula, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz no vácuo, R_i é a intensidade rotatória, λ_i é o comprimento de onda de uma transição eletrônica.

Estudos experimentais em muitas substâncias diferentes, mostraram que a equação de Drude pode ser aproximada pela seguinte expressão (7):

$$[\alpha] = \frac{A_c \lambda_c^2}{\lambda^2 - \lambda_c^2} \quad (1.45)$$

onde A_c é uma constante característica do sistema, λ_c é o comprimento de onda de uma transição dominante.

Mas estudos mais recentes (3) de substâncias onde várias transições contribuem para a rotação nos asseguram que um simples termo da equação de Drude não é suficiente para ajustar os dados de dispersão rotatória. Novas aproximações surgiram e a mais famosa e muito útil é a equação de Moffitt.

1.12 - EQUAÇÃO DE MOFFITT

A equação de Moffitt é uma modificação da equação de Drude. Ela é útil para estimar o conteúdo de estrutura secundária de proteínas helicoidais (8).

Ela é expressa do seguinte modo

$$[m']_{\lambda} = a_o \frac{\lambda_o^2}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)} + b_o \frac{\lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2} \quad (1.46)$$

onde a_o , b_o e λ_o são parâmetros a serem determinados. $[m']_{\lambda}$ é a rotação específica média residual.

Para determinar a_o , b_o e λ_o , usa-se uma substância modelo a qual sabe-se estar totalmente na conformação helicoidal-hélice- α . Obtém-se o seu espectro de dispersão rotatória fora da região de absorção, isto é, onde a equação de Moffitt é válida. Então, obtém-se $[m']_{\lambda}$. A equação (1.46) pode ser reescrita como:

$$[m']_{\lambda}(\lambda^2 - \lambda_o^2) = a_o \lambda_o^2 + b_o \frac{\lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)} \quad (1.47)$$

Atribui-se um valor para λ_o na equação (1.47), e varia-se λ para construirmos a curva $[m']_{\lambda}(\lambda^2 - \lambda_o^2)$ vs $\frac{1}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$

Se o valor de λ_o for o correto, a figura será uma linha reta (7).

O parâmetro a_o é determinado pela intersecção com a ordenada, enquanto o parâmetro b_o é obtido pela inclinação da linha reta (7).

1.13 - DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE PROTEÍNAS

O estudo de macromoléculas de interesses biológicos nos conduz ao estudo de atividade ótica de moléculas tais como proteínas e polipeptídeos, que tem seus comportamentos funcionais vinculados aos estados conformacionais. Nessas moléculas, as ligações peptídicas são grupos oticamente ativos (Ver Tabela I). Para a determinação destas estruturas, foram propostos diversos métodos tanto teóricos como práticos.

1.14 - MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CONTEÚDOS ESTRUTURAIS POR DISPERSÃO ROTATÓRIA ÓTICA

A equação de Drude foi a primeira expressão aproximada que descreveu a atividade ótica. Muitos pesquisadores utilizaram esta equação para determinação estrutural, porém, só usavam um único termo. Depois com o avanço dos espectropolarímetros automatizados, verificou-se que num único termo não ajustava as curvas de

dispersão rotatória ótica satisfatoriamente e alguns pesquisadores passaram a utilizar mais de um termo (3,9,10,11,12).

Uma equação de grande uso, é a equação de Moffitt, que estima o conteúdo de hélice- α através do coeficiente b_o .

O parâmetro a_o da equação de Moffitt, mostrou ser influenciado pelas cadeias laterais de polímeros helicoidais e pelo solvente utilizado (7), e portanto, não pode ser utilizado na estimativa das estruturas.

O parâmetro b_o , entretanto, tinha valores próximos de -630 para diferentes solventes e pH da solução em que os polímeros se encontravam dissolvidos.

Podemos, então estimar a quantidade de hélice- α em percentagem, utilizando a equação

$$\% \text{ hélice } \alpha = \frac{100 b_o}{630} \quad (1.48)$$

Estabeleceu-se então, que $b_o = -630$ e $\lambda_o = 212$ nm correspondiam a estrutura completamente helicoidal hélice- α . A região de comprimento de onda para a determinação de b_o é de 300 a 700 nm.

Uma maneira prática, é tomar como padrão, os espectros de dispersão rotatória ótica de um polipeptídeo, em duas conformações conhecidas, tais como, hélice- α e estrutura aleatória. Sabendo isto, se pode estimar o conteúdo de hélice- α de uma substância em exame, através da expressão (7,12,13):

$$\% \text{ hélice-}\alpha = 100 \frac{[\alpha]_{\lambda}^{\text{obs}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{ale}}}{[\alpha]_{\lambda}^{\text{Hel}} - [\alpha]_{\lambda}^{\text{ale}}} \quad (1.49)$$

onde λ é o comprimento de onda, $[\alpha]_{\lambda}^{\text{obs}}$ é a rotação ótica no com-

primento de onda λ da substância em exame, $[\alpha]_{\lambda}^{\text{Hel}}$ e $[\alpha]_{\lambda}^{\text{ale}}$ são as rotações no comprimento de onda λ da substância padrão quando se encontra totalmente helicoidal e totalmente aleatória, respectivamente. Note que somente duas conformações são consideradas, hélice- α e aleatória.

Outro método muito usado, é o método da soma ponderada. Supondo que uma substância modelo, possa se encontrar em diversas conformações separadamente e supondo ainda que essas conformações sejam linearmente independentes, então podemos atribuir peso às intensidades dos Efeitos Cotton de cada conformação distinta em um determinado comprimento de onda (13). Assim, para um comprimento de onda λ , a rotação ótica observada pode ser escrita como

$$[\alpha]_{\lambda}^{\text{obs}} = h[\alpha]_{\lambda}^{\text{Hel}} + b[\alpha]_{\lambda}^{\text{beta}} + a[\alpha]_{\lambda}^{\text{ale}} \quad (1.50)$$

onde h , b e a são os pesos atribuídos a cada conformação, $[\alpha]_{\lambda}^{\text{Hel}}$, $[\alpha]_{\lambda}^{\text{beta}}$ e $[\alpha]_{\lambda}^{\text{ale}}$ são as rotações da substância modelo nas conformações hélice- α , beta e aleatória, respectivamente, no comprimento de onda λ .

A Figura 16 (14) mostra os espectros típicos de dispersão rotatória ótica para proteínas e polipeptídeos.

1.15 - MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE CONTEÚDOS ESTRUTURAIS POR DICROÍSMO CIRCULAR

Os métodos para estimar conteúdos estruturais por dicroísmo circular são semelhantes aos já apresentados para dispersão rotatória ótica.

Uma maneira para estimar o conteúdo de hélice- α foi apresentado por Fasman (1969). A percentagem de hélice- α pode ser calculada

Figura 16. Espectro de DRO de poli- α -L-lisina em conformação α -hélice (curva 1), estrutura β (curva 2) e cadeia aleatória (curva 3).
Ref. 14.

lada de

$$\% \text{ hélice-}\alpha = \frac{[\theta]_{208 \text{ nm}} - 4000}{33000 - 4000} \quad (1.51)$$

A região de 208-240 nm foi escolhida como a região de referência devido parecer menos sensível a variações de cadeias laterais e do solvente. O homopolímero usado como padrão foi a poli-L-lisina (13).

A Figura 17 mostra os espectros de dicroísmo circular de poli-L-lisina nas conformações, 100% hélice- α , forma β e aleatória.

Uma boa estimativa de estrutura de proteína pode ser obtida das curvas calculadas com base nas conformações, hélice- α , forma β e aleatória de poli-L-lisina, mesmo quando outros fatores além das três conformações escolhidas contribuem para o dicroísmo circular.

Uma combinação linear das três conformações, tal como na dispersão rotatória ótica, pode simular um espectro de dicroísmo circular de uma dada proteína, tomando as conformações da substância padrão como referência.

$$[\theta]_{\lambda}^{\text{obs}} = h[\theta]_{\lambda}^{\text{Hel}} + \beta[\theta]_{\lambda}^{\text{beta}} + a[\theta]_{\lambda}^{\text{ale}} \quad (1.52)$$

onde h , β e a são os pesos de cada conformação hélice- α , forma β e aleatória, respectivamente, $[\theta]_{\lambda}^{\text{obs}}$ é a elipticidade molar da substância em exame, e $[\theta]_{\lambda}^{\text{Hel}}$, $[\theta]_{\lambda}^{\text{beta}}$ e $[\theta]_{\lambda}^{\text{ale}}$ são as elipticidades molares da substância padrão nas conformações hélice- α , forma beta e aleatória no comprimento de onda λ .

A Tabela II mostra as características do espectro de dicroísmo circular, para as principais estruturas secundárias de proteínas.

Figura 17. Espectro de DC de poli-L-lisina em conformação α -hélice (curva 1), β (curva 2) e cadeia aleatória (curva 3).

Ref. 13.

^{*}
TABELA I

Cromóforos intrinsicamente assimétricos	λ_{max}
C = C - C = C	~250 nm
C = C - C = O	~250 nm
C = C - C - C = O	~300 nm
- S - S -	~200(260) nm

Cromóforos assimetricamente perturbados	
C = O	300 nm
C = C - C = O	350 nm
- C (=O)O -	210 nm
- C (=O)NR	210 nm
C = C	200 nm

* Ref. (2)

^{**}
TABELA II

Conformações	λ_{max} (nm)	Elípticidade (graus cm ² /dmol)
Hélice- α	192	> 60.000
	208-210	~ -20.000 a ~ - 40.000
	222	~ -15.000 a ~ - 40.000
Forma β	195	~ 30.000
	216-217	~ -20.000
Aleatória	198	~40.000
	218	< 10.000

^{**}
Ref. (13,15)

Embora esses métodos sejam aproximações já que só levam em conta os cromóforos da cadeia peptídica, ainda fornecem bons resultados (Tabela III).

^{***}
TABELA III

Estimativa de estrutura secundária de proteína por dicroísmo circular				
Método	Estrutura	- Quimotripsina	Mioglobina	Lisozima
Raio-X	Hélice- α	8	~ 68	28
	Forma- β	22	0	10
	Aleatória	70	32	62
Dicroísmo circular do padrão poli-L-lisina	Hélice- α	12	68	29
	Forma- β	23	5	11
	Aleatória	65	27	60

^{***} Ref. (16).

1.16 - EQUIPAMENTOS EXISTENTES

Espectropolarímetro

A Figura 18 mostra o diagrama de bloco de um espectropolarímetro

Figura 18.

- FL - Fonte de luz
- P - Polarizador
- M - Modulador
- FFM - Fonte de alimentação da fotomultiplicadora
- AMP - Amplificador
- MT - Motor
- FMD - Fonte de alimentação do modulador
- PT - Potenciômetro
- R - Registrador X-Y
- A - Célula de amostra
- An - Analisador
- FM - Fotomultiplicadora
- MN - Monocromador

Em geral, os espectropolarímetros usam moduladores de Faraday. Um modulador de Faraday consiste de um meio dielétrico, vidro, quartzo, água, sílica, etc., o qual é sujeito a um campo magnético alternado com sua direção paralela à direção de propagação da luz. Quando a luz linearmente polarizada atravessa o dielétrico, seu plano de polarização sofre uma rotação, γ , com relação à posição anterior. A este efeito, chamamos de Efeito Faraday.

O valor do ângulo γ , depende do campo magnético aplicado, do caminho ótico percorrido pela luz através do dielétrico e de uma constante característica de cada dielétrico.

Como o campo magnético é alternado, γ vai variar entre dois limites, $+\beta$ e $-\beta$; ou seja, houve uma modulação da luz polarizada.

Como mostrado na Figura 19, o analisador é colocado de modo que sem a amostra, a luz linearmente polarizada é modulada através dos ângulos $\pm\beta$ em torno do eixo de transmissão do analisador, An. As intensidades de luz transmitida pelo analisador quando a modulação é máxima (posições P_1 e P_2) são iguais quando nenhuma substância opticamente ativa se encontra entre o polarizador e o analisador e vale *

$$I = I_0 \cos^2 \beta \quad (1.52a)$$

Quando uma substância opticamente ativa se encontra entre o polarizador e o analisador, as intensidades transmitidas através do analisador são diferentes, devido ao ângulo de rotação ótica, α , da amostra que deslocou as polarizações P_1 e P_2 para P_1' e P_2' , como vemos na Figura 20.

Usando a lei de Malus para determinar essas intensidades, vem

Figura 19. Modulação da luz linearmente polarizada através dos ângulos $\pm \beta$ com relação a posição do eixo de transmissão do analisador, A_n , quando não há amostra opticamente ativa.

Figura 20. Modulação da luz linearmente polarizada passando através de um meio opticamente ativo.

$$I_1 = A_1 \cos^2(\alpha + \beta) = I_0 e^{-\kappa l} \cos^2(\alpha + \beta) \quad (1.53)$$

$$I_2 = A_2 \cos^2(\alpha - \beta) = I_0 e^{-\kappa l} \cos^2(\alpha - \beta) \quad (1.54)$$

onde

$$A_1 = A_2 = I_0 e^{-\kappa l} \quad (1.55)$$

sendo κ o coeficiente de absorção e l o caminho ótico percorrido pela luz através da substância oticamente ativa.

As intensidades I_1 e I_2 podem ser combinadas de muitas maneiras para eliminar o fator absorção e obter uma relação na qual a rotação, α , é extraída.

1.17 - MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE ROTAÇÃO ÓTICA

Os vários métodos têm a finalidade de eliminar o fator absorção e obter uma linearidade entre o sinal combinado e a rotação ótica (17).

Método Keston (17)

Com este método se elimina o fator absorção da amostra. É expresso por

$$R_K = \frac{I_2}{I_1} = \frac{\cos^2(\alpha - \beta)}{\cos^2(\alpha + \beta)} \quad (1.56)$$

Esta relação pode ser escrita como uma série

$$R_K = 1 + 4\alpha \operatorname{tg} \beta + 8\alpha^2 \operatorname{tg}^2 \beta + \dots \quad (1.57)$$

mas não tem boa linearidade entre R_K e α .

Método de Rouy (17)

O Método de Rouy é baseado na razão

$$R_r = \frac{I_2 - I_1}{I_2 + I_1} \quad (1.58)$$

Substituindo as equações (1.53) e (1.54) na equação (1.58) e expandindo em série, obtemos

$$R_r = 2\alpha \operatorname{tg} \beta - 2\left(1 - \frac{1}{3 \operatorname{tg}^2 \beta}\right) \alpha^3 \operatorname{tg}^3 \beta + \dots \quad (1.59)$$

A linearidade é boa e a absorção é eliminada.

Método de ponto nulo (17)

O sinal detetado é a diferença das intensidades I_1 e I_2 :

$$R = I_2 - I_1 \quad (1.60)$$

Usando as equações (1.53) e (1.54), temos

$$R = I_2 - I_1 = I_0 e^{-\kappa l} [\cos^2(\alpha - \beta) - \cos^2(\alpha + \beta)] \quad (1.61)$$

ou

$$R = I_2 - I_1 = I_0 e^{-\kappa l} \sin 2\beta \sin 2\alpha \quad (1.62)$$

Como neste método o ângulo de modulação, β , é pequeno e supondo o ângulo de rotação ótica, α , também pequeno, a equação (1.62) pode ser reescrita como

$$I_2 - I_1 = K \alpha \quad (1.63)$$

onde

$$K \equiv 4 I_0 e^{-\kappa l} \beta \quad (1.64)$$

onde K representa uma constante obtida pela calibração do instrumento com uma substância conhecida (17), em geral 10-d-sulfocanfora (7). Na verdade, K não é constante, já que ele é função de κ , que varia de substância para substância. Na prática, K é considerado constante, de modo que a medida $I_2 - I_1$ dá diretamente α .

A maioria dos espectropolarímetros usam este método. Esses espectropolarímetros são chamados de ortogonais.

1.18 - ESPECTÔMETRO DE DICROÍSMO CIRCULAR OU DICROGRAFO

A Figura 21 abaixo, mostra o diagrama de bloco de um dicrógrafo

Figura 21.

- FL - Fonte de luz
- MN - Monocromador
- P - Polarizador
- MDC - Modulador para dicroísmo circular
- A - Célula de amostra
- FM - Fotomultiplicadora
- FFM - Fonte da Fotomultiplicadora
- AMP - Amplificador
- PT - Potenciômetro
- FMD - Fonte do modulador
- M - Motor
- R - Registrador

A luz saindo do monocromador (MN) é linearmente polarizada pelo polarizador (P). Incide sobre o modulador que em princípio funciona por efeito piezoelétrico. O modulador transforma a luz linearmente polarizada em circularmente polarizada à direita ou à esquerda.

Quando a amostra é introduzida entre o modulador e a fotomultiplicadora, a intensidade da luz transmitida através da amostra varia como mostra a Figura 22.

Na Figura 22 a linha sólida corresponde ao caso $\epsilon_r > \epsilon_l$

Figura 22. Intensidade de luz quando esta atravessa um meio absorvedor dicrônico. A linha cheia corresponde a $\epsilon_r > \epsilon_\ell$. A linha tracejada corresponde a $\epsilon_r < \epsilon_\ell$.

e a linha tracejada corresponde a $\epsilon_r < \epsilon_\ell$.

Quando a luz atinge a fotomultiplicadora, sai desta um sinal que consiste de uma componente contínua proporcional a I_A e outra componente alternada proporcional a S (16).

A componente contínua é dada por (1)

$$V_C = \frac{\phi_0}{2} \left[e^{-4\pi\kappa_\ell d/\lambda} + e^{-4\pi\kappa_r d/\lambda} \right] \quad (1.65)$$

e a componente alternada é

$$V_A = \frac{\phi_0}{2} \left[e^{-4\pi\kappa_\ell d/\lambda} - e^{-4\pi\kappa_r d/\lambda} \right] \sin(\delta_0 \sin \omega t) \quad (1.66)$$

onde ϕ_0 é a intensidade luminosa emergindo do polarizador, δ_0 é a amplitude de modulação, ω é a frequência de modulação, κ_ℓ e κ_r são os coeficientes de absorção, d é o caminho ótico através da amostra, λ é o comprimento de onda da luz incidente.

Com auxílio da eletrônica, é possível retificar e filtrar o sinal alternado, obtendo

$$V_D = Q \frac{\phi_0}{2} \left[e^{-4\pi\kappa_\ell d/\lambda} - e^{-4\pi\kappa_r d/\lambda} \right] \quad (1.67)$$

onde Q é um fator resultante da eletrônica.

A razão V_D/V_C nos dá o dicroísmo circular

$$\frac{V_D}{V_C} = Q \operatorname{tg} h [2\pi(\kappa_\ell - \kappa_r) d/\lambda] \quad (1.68)$$

ou para ângulos pequenos obtemos

$$\frac{V_D}{V_C} \cong 2Q \pi (\kappa_\ell - \kappa_r) d / \lambda \quad (1.69)$$

Assim, é obtido o dicroísmo circular e a gravação dos espectros é totalmente um trabalho eletrônico.

Vemos então como os espectropolarímetros e dicrografos obtêm os dados de rotação ótica e dicroísmo circular.

CAPÍTULO II

O ESPECTROMETRO

2.1 - O ESPECTROPOLARÍMETRO COMPUTADORIZADO (EPC)

O EPC constitui das seguintes partes (esquema na Figura 23)

1. uma fonte de luz
2. monocromador (controlado por motor de passo)
3. colimador
4. espelhos planos
5. polarizador
6. diafragma
7. célula ou suporte para amostra
8. analisador (controlado por motor de passo)
9. difusor
10. fotomultiplicadora
11. radiometro
12. interface
13. motores de passos
14. "driver-control" dos motores de passo
15. microcomputador
16. gravador cassete
17. registrador X-Y
18. fontes de alimentação
19. impressora

Descreveremos a seguir as partes que compõem o EPC, isto é, a fonte de luz, o monocromador, sistema ótico, detetor, e funcionamento.

ABREVIATURAS DA FIG.23

FL - Fonte de Luz

MN - Monocromador

C - Colimador

E_1, E_2 - Espelhos planos

P - Polarizador

D - Diafragma

Dv - Divisorias

A - Amostra

An - Analisador

AR - Ar comprimido

CD - Correia Dentada

M - Mancal Pneumático

MP1, MP2 - Motores de Passo

TI - Tubo de Isolamento

DF-FM - Difusor e Fotomultiplicadora

FFM - Fonte de Alimentação da FM

AMP - Amplificador

A/D - Conversor analógico/digital

FADM1, FADM2 - Fontes de Alimentação dos Motores de Passo

DR1, DR2 - Driver dos Motores de Passo

INTERFACE - Interface

MICRO - Microcomputador

IMP - Impressora

R - Registrador

GR - Gravador Cassete

Figura 23. Esquema de Bloco do EPC

2.1.1 - Fonte de luz

A fonte de luz é uma lâmpada de 150W cheia do gás Xenônio em alta pressão. O espectro da lâmpada de Xenônio é mostrado na Figura 24 (18). Ele é semelhante ao da radiação solar no ultravioleta, visível e infravermelho, exceto no intervalo 800 a 1000 nm, onde a energia da lâmpada é muito maior do que a energia solar (19).

Na Tabela IV, resumimos algumas características da fonte de luz.

TABELA IV

Características da fonte de luz	
Tipo de lâmpada	Xenônio
Voltagem de operação	20 Vcc
Corrente de operação	7,5A
candeias/cm ²	9600
tempo de vida	1000 horas
Potência da lâmpada	150 W
Voltagem da fonte de alimentação	110-130 Volts
Voltagem de "start"	20000 Volts

Figura 24. Espectro da lâmpada de Xenônio 150W

Figura 25. Esquema Ótico do monocromador

A fonte de luz é fabricado pela Bausch-Lomb Incorporated. Maiores informações são encontrados no manual do instrumento, fornecido pelo fabricante.

2.1.2 - Monocromador

A Figura 25 ilustra o esquema do monocromador. A máxima eficiência é obtida quando a área da fenda de entrada do monocromador está totalmente iluminada. Uma lente coletora na frente da fenda de entrada coleta a luz incidente.

A luz incide sobre a grade de difração e é angularmente dispersa segundo os comprimentos de onda, isto é, cada comprimento de onda presente na luz é dispersa em um ângulo diferente. A grade pode ser girada por um eixo para dirigir a luz de comprimento de onda selecionado ao centro de um aparelho côncavo. O espelho côncavo coleta a luz e juntamente com uma lente corretora na entrada da fenda de saída projeta a imagem da fenda de entrada na fenda de saída. A imagem da fenda de entrada é reduzida em tamanho por um fator de 0,56. A fenda de saída tem dimensões que é 56% da fenda de entrada (19).

A Tabela V mostra algumas das características da grade de difração.

TABELA V

Características da grade de difração	
linhas /mm	1350
Intervalo de comprimento de onda	200-800 nm
Dispersão recíproca	6,4 nm/mm
Eficiência da grade	70%
Eficiência do instrumento	47%

Para calcular a largura espectral da fenda multiplica - se a dispersão recíproca pela largura da fenda de saída. Por exem - plo, se a fenda de saída tiver a largura de 0,2 mm, sendo a disper - são recíproca de 6,4 nm/mm então teremos 1,28 nm de largura da banda passando pela fenda de saída.

Tanto a fenda de entrada como a de saída são variáveis e possuem uma graduação que varia de 0 a 6,0 mm dividida em intervalos de 0,1 mm. Estas fendas devem ser ajustadas proporcionalmente uma em relação a outra segundo o fator de 56%.

O monocromador tem um dial de 3 dígitos que informa o comprimento de onda central passando pela fenda de saída. Ainda no monocromador a grade de difração pode ser girada por um motor externo. Para esta grade de difração a relação entre comprimento de onda e revolução do motor é de 20 nm por revolução.

O monocromador também é fabricado por Bausch-Lomb Incorporated. Maiores informações são encontradas no manual do instrumento.

2.1.3 - Sistema Ótico

O espectropolarímetro tem um sistema ótico muito simples, compondo-se de um colimador, dois espelhos aluminizados, um polarizador, um diafragma, um suporte para amostra, um analisador e difusor. Todos estes componentes são separados por divisórias de alumínio. A Figura 23 mostra o esboço do sistema ótico.

2.1.3.0 - Colimador

O colimador é composto por uma lente de quartzo montada dentro de um cilindro de alumínio. Este cilindro se encontra ligado à fenda de saída do monocromador e a entrada do sistema ótico.

Para ajustar o foco, o colimador pode ser girado em torno do seu eixo e/ou translacionado ao longo deste eixo.

2.1.3.1 - Os espelhos

Os espelhos têm dimensões de 60 mm de comprimento, 50 mm de largura e 4 mm de espessura. Foi evaporado alumínio sobre vidro cristal e depois dado uma cobertura protetora com alumina.

Os espelhos servem para ajustar o feixe de luz através do polarizador, amostra e analisador até o detetor.

Não podemos esquecer dos efeitos que as superfícies metálicas causam sobre o feixe de luz. As componentes de $\vec{E}$ refletidas paralelamente ($R_{||}$) e perpendicularmente ($R_{\perp}$) ao plano de incidência se encontram defasadas entre si e a diferença de intensidade de reflectância entre estas componentes varia com o ângulo de incidência. Portanto, a luz não polarizada incidindo sobre uma superfície metálica emergirá, geralmente, elipticamente polarizada. No EPC o ângulo de incidência é cerca de 10° em ambos espelhos. Para este ângulo de incidência a diferença entre $R_{||}$ e $R_{\perp}$ é pequena, mas a fase ϕ é diferente de $\pi(20)$. Assim, a luz refletida dos espelhos é ligeiramente elíptica. Entretanto, como veremos adiante, este efeito pode ser corrigido.

2.1.3.2 - Polarizador

A Figura 26 mostra o esboço do suporte do polarizador. A base é um bloco de alumínio no qual o suporte do polarizador é introduzido. O suporte do polarizador é um disco de latão com um prolongamento que se encaixa no orifício da base. A alavanca serve para girar o suporte juntamente com o polarizador, em torno do seu eixo. A base é presa por dois parafusos sobre um suporte em forma

Figura 26. Suporte do polarizador

de "L" podendo ser ajustada através de dois parafusos de rosca fina, permitindo o alinhamento do polarizador. Dentro do prolongamento cilíndrico se coloca um polarizador tipo Nicol ou na superfície do disco se prende uma folha de polaróide de dimensões 20 mm X 20mm. Estamos utilizando um polarizador do tipo Nicol. Este tipo de polarizador requer um feixe de luz paralelo para obter polarização eficiente. Para isto, colocamos uma fenda fixa antes da entrada do polarizador obtendo menos do que um grau de divergência do feixe (21).

O polarizador recebe a luz elíptica vinda dos espelhos e transmite uma componente linearmente polarizada. De acordo com a posição do eixo de transmissão ou eixo ótico do polarizador com relação aos eixos maior ou menor da elipse, a intensidade da luz emergindo do polarizador variará. Portanto, o polarizador também age como um filtro de luz. Este efeito de filtragem é indesejável, porque se perde muito da intensidade da luz. Como o polarizador permanece fixo, podemos fazer coincidir o eixo de transmissão do polarizador com o eixo maior da elipse eliminando deste modo, o problema anteriormente citado.

2.1.3.3 - Diafragma

Um diafragma na entrada do compartimento de amostra tem a função de controlar o fluxo de luz sobre a amostra, que juntamente com o colimador fazem com que o feixe de luz seja suficientemente estreito por todo o resto do sistema.

2.1.3.4 - Suporte de Amostra

O suporte de amostra tanto serve para amostras líquidas

Figura 27. Suporte de amostra

como para sólidas. O suporte, visto na Figura 27, tem um encaixe para uma cubeta de área transversal de $1,0 \text{ cm}^2$. Quando a amostra for sólida, por exemplo, filme, cristal ou pastilha, estes podem ser fixados em uma janela que é introduzida na fenda do suporte da amostra.

2.1.3.5 - Analisador

O analisador, assim como o polarizador, pode ser montado dentro de um eixo-suporte (no caso do analisador ser um polarizador tipo Nicol) ou sobre um disco de latão preso por três parafusos (no caso do analisador ser um polaróide). No EPC o polarizador usado como analisador é do tipo Nicol. Como já citado anteriormente o feixe de luz incidente sobre o analisador tem também uma divergência menor que um grau.

A Figura 28a mostra o eixo-suporte do analisador. Este eixo-suporte é introduzido num mancal pneumático de injeção direta de ar comprimido. O ar comprimido injetado cria um colchão de ar entre a parede externa do eixo-suporte e a parede interna do mancal. Este colchão permite que o eixo-suporte gire com baixíssimo atrito e baixa torção radial. A Figura 28b mostra o mancal.

O mancal é preso a um suporte ajustável, permitindo o alinhamento do analisador.

A pressão do ar comprimido é usualmente menor que 1 Kg/cm^2 . O ar comprimido é obtido de uma das linhas de ar comprimido espalhada pelo Departamento de Física.

Um mancal feito com rolamento de precisão custaria 30 vezes mais do que o custo deste mancal à ar comprimido. Assim a construção do mancal a ar comprimido foi uma solução não tão complexa quan

Figura 28. Mancal e eixo-suporte do analisador

to parece pois tornou-se bastante prático e eficiente.

O analisador é controlado por um motor de passo que faz com que ele gire em ângulos discretos através de uma correia dentada. Com uma redução de 7,5:1 obtemos 1° por passo.

2.1.3.6 - Difusor

O difusor serve para espalhar a luz emergente do analisador sobre os dinodos da fotomultiplicadora. Também serve para diminuir os efeitos de polarização no tubo fotoelétrico.

A resposta de detetores fotoelétricos pode, em geral, ser uma função da polarização da luz incidente (22). A solução para este problema de sensibilidade do detetor dependente de polarização é despolarizar a luz antes de incidir sobre o fotodetetor. O difusor introduzido no caminho da luz entre o analisador e o detetor resolve este problema, porém, ele absorve considerável quantidade de luz (23).

O difusor que usamos é de fabricação ORIEL. Este difusor transmite acima de 360 nm e cobre todo espectro visível.

2.1.4 - Detetor - Fotomultiplicadora

A fotomultiplicadora é de fabricação ORIEL Corporation of America, o modelo é o 7062 e sua região de sensibilidade é de 200 a 800 nm.

Para eliminar interferência da umidade, a rede resistiva é soldada diretamente aos pinos do tubo. O tubo é alojado em um cilindro metálico e magneticamente blindado para evitar influên -

Figura 29. Cabeça detetora - fotomultiplicadora e difusor (18)

cias sobre os dinodos (18). O cilíndrico tem uma abertura circular que pode ser conectado a acessórios óticos. Esta abertura expõe o tubo ao ambiente. A figura 29 mostra a cabeça detetora-fotomultiplicadora.

A tensão máxima é de -900 volts. Usamos para operação -400 a -500 volts pois observamos instabilidade quando operamos com tensões abaixo de -350 volts. A -600 volts o ruído típico é de $0,3 \times 10^{-10}$ A (18). Para maiores informações, consultar o manual do fabricante.

2.2. - Funcionamento

O EPC funciona diferente dos demais espectrômetros óticos conhecidos. Além da obtenção da atividade ótica (rotação ótica e dicroísmo circular), podemos também obter absorção ótica e/ou transmissão ótica, dicroísmo linear, cinética de reação lenta, etc.

Chamamos o EPC de espectrômetro estático, porque as leituras das intensidades de luz em cada comprimento de onda são feitas com o sistema parado, isto é, a grade de difração do monocromador para um determinado comprimento de onda, durante este tempo o sinal da fotomultiplicadora é lida. Portanto, não corremos o risco de termos duas ou mais leitura em diferentes comprimentos de onda.

Para obtenção da cinética de reação, paramos a grade de difração do monocromador no comprimento de onda desejado para a medida. Fazemos o microcomputador ler os sinais da fotomultiplicadora durante um determinado tempo. Todos os dados são guardados em memória, facilitando a sua manipulação. Podemos imprimir todos os valores através da impressora e/ou registrar o gráfico. O menor intervalo de tempo possível entre as medidas é de 100 milisegundos. O número máximo de pontos é 256.

Para obter dicroísmo linear, deve-se colocar o polarizador a 45° em relação à direção de orientação da amostra e girar o analisador para as posições 0° e 90° com relação à mesma direção. Para cada leitura nas duas posições do analisador, a grade de difração do monocromador permanece parada. No final de todas as leituras a razão dicroica pode ser calculada e graficada em função do comprimento de onda.

Na obtenção da absorção e/ou transmissão ótica, fazemos a leitura da transmissão da referência. Depois colocamos a

amostra e fazemos a leitura da transmissão desta. O espectro de absorção é obtido depois que o microcomputador calcula todos os valores de absorção que são graficados no registrador em função do comprimento de onda.

Para se obter a atividade ótica, dispomos de um método para a obtenção apenas da rotação ótica e de um outro método para obtenção da rotação ótica e da elipticidade.

O primeiro método chamamos de Método da razão das raízes quadradas. Fazendo a razão das raízes quadradas das intensidades I_1 e I_2 dadas nas equações 1.53 e 1.54, vem

$$N = \sqrt{\frac{I_1}{I_2}} \quad (2.1)$$

ou

$$N = \frac{1 - \operatorname{tg} \beta \operatorname{tg} \alpha}{1 + \operatorname{tg} \beta \operatorname{tg} \alpha} \quad (2.2)$$

Chamando de

$$R = \frac{1 - N}{1 + N} = \frac{\sqrt{I_2} - \sqrt{I_1}}{\sqrt{I_2} + \sqrt{I_1}} \quad (2.3)$$

obtemos que

$$R_w = \operatorname{tg} \beta \operatorname{tg} \alpha \quad (2.4)$$

Para valores pequenos de α podemos expandir a $\operatorname{tg} \alpha$ em série, obtendo:

$$R_w = \operatorname{tg} \beta \left(\alpha + \frac{1}{3} \alpha^3 + \dots \right) \quad (2.5)$$

Este método elimina a absorção e nos dá um valor constante para o desvio da linearidade seja qual for o ângulo β .

Este método supõe que a luz emergente não seja elíptica.

O segundo método admite que a luz emergente seja elíptica.

Considere uma elipse centrada com seus eixos paralelos aos eixos de transmissão do polarizador e do analisador, como mostrado na Figura 30. Se o eixo maior da elipse está paralelo ao eixo de transmissão do analisador, a intensidade de luz emergindo do analisador será proporcional ao valor do eixo maior da elipse. Caso seja o eixo menor da elipse paralelo ao eixo de transmissão, a intensidade de luz detetada será proporcional a este eixo.

Figura 30. Elipse centrada com seus eixos sobre os eixos do polarizador e analisador.

P , A_n indicam os eixos de transmissão do polarizador e analisador, respectivamente, $2a$ e $2b$ são os eixos maior e menor da elipse, respectivamente.

Suponhamos agora que a amostra seja oticamente ativa e que estejamos na região de absorção. A polarização emergente será

elíptica e girada por um ângulo α . Queremos determinar o quanto a elipse girou com relação ao eixo de transmissão do polarizador e sua elipticidade.

Suponhamos que o ângulo entre o eixo de transmissão do polarizador (P) e o analisador (An) seja β (Figura 31)

Figura 31. A elipse girada de um ângulo α com relação ao eixo do polarizador e este fazendo um ângulo β com o eixo do analisador.

A intensidade de luz, I , emergindo do analisador é dada pela lei de Malus:

$$I = a^2 \cos^2(\beta - \alpha) + b^2 \cos^2[90 - (\beta - \alpha)] \quad (2.6)$$

ou

$$I = a^2 \cos^2(\beta - \alpha) + b^2 \sin^2(\beta - \alpha) \quad (2.7)$$

Consideremos agora os casos: $\beta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ$ e 135° .

1º CASO: $\beta = 0^\circ$ (analisador paralelo ao polarizador), obtemos

$$I_1 = a^2 \cos^2 \alpha + b^2 \sin^2 \alpha \quad (2.8)$$

2º CASO: $\beta = 45^\circ$ (analisador a 45° com o polarizador), obtemos

$$I_2 = a^2 \cos^2(45^\circ - \alpha) + b^2 \sin^2(45^\circ - \alpha) \quad (2.9)$$

ou

$$I_2 = \frac{1}{2} \left[(a^2 + b^2) + (a^2 - b^2) \sin 2\alpha \right] \quad (2.10)$$

3º CASO: $\beta = 90^\circ$ (analisador e polarizador cruzados), obtemos

$$I_3 = a^2 \sin^2 \alpha + b^2 \cos^2 \alpha \quad (2.11)$$

4º CASO: $\beta = 135^\circ$ (analisador a -45° com o polarizador), obtemos

$$I_4 = a^2 \cos^2 (45^\circ + \alpha) + b^2 \sin^2 (45^\circ + \alpha) \quad (2.12)$$

ou

$$I_4 = \frac{1}{2} \left[(a^2 + b^2) - (a^2 - b^2) \sin 2\alpha \right] \quad (2.13)$$

Com as relações

$$R_1 = \frac{I_2 - I_4}{I_2 + I_4} \quad (2.14)$$

$$R_2 = \frac{I_1 - I_3}{I_1 + I_3} \quad (2.15)$$

$$R_3 = R_1 / R_2 \quad (2.16)$$

obtemos

$$R_3 = \tan(2\alpha) \quad (2.17)$$

temos portanto a rotação ótica α dada por:

$$\alpha = \frac{1}{2} \arctg (R_3) \quad (2.18)$$

Da relação:

$$R_4^2 = R_1^2 + R_2^2 \quad (2.19)$$

obtemos:

$$R_4 = \frac{1 - \operatorname{tg}^2 \chi}{1 + \operatorname{tg}^2 \chi} \quad (2.20)$$

ou

$$R_4 = \cos 2\chi \quad (2.21)$$

Assim obtemos a elipticidade:

$$\chi = \frac{1}{2} \arccos R_4 \quad (2.22)$$

Como mostraremos a seguir, a elipticidade assim obtida é o próprio dicroísmo circular.

Das equações (2.20) e (1.30), obtemos

$$R_4 = \frac{1}{\cosh [2\pi (\kappa_{\ell} - \kappa_r) d / \lambda]} \quad (2.23)$$

ou

$$\cos 2\chi = \operatorname{sech} [2\pi (\kappa_{\ell} - \kappa_r) d / \lambda] \quad (2.24)$$

Fazendo as aproximações $\cos 2\chi \approx 1 - \frac{1}{2}(2\chi)^2$ e $\sec 2\chi \approx 1 + \frac{1}{2}(2\chi)^2$ ou seja, considerando que a luz que chega ao analisador é ligeiramente elíptica, obtemos

$$2\chi \approx 2\pi(\kappa_{\ell} - \kappa_r)d/\lambda \quad (2.25)$$

ou

$$\chi \approx \pi(\kappa_{\ell} - \kappa_r)d/\lambda \quad (2.26)$$

que é a expressão para o dicroísmo circular.

A equação (2.21) e (2.22) não nos dá nenhuma informação a respeito do sentido de rotação do vetor campo elétrico, o chamado "handedness", ficando incompleto o conceito de elipticidade. Mas o sinal do "handedness" pode ser determinado através do sinal do efeito Cotton da dispersão rotatória ótica, já que o sinal do efeito Cotton é o mesmo que o sinal do dicroísmo circular. Portanto, para que a elipticidade seja conhecida, torna-se necessário conhecer também a rotação ótica.

Quando o EPC funciona como polarímetro, usamos o primeiro método, e fazemos o analisador oscilar com o ângulo de modulação $\beta = \pm 45^\circ$ em torno da posição do eixo de transmissão do polarizador. A grade de difração do monocromador fica parada, enquanto o microcomputador faz a leitura das duas intensidades de luz, nas duas diferentes posições do analisador. Usando a equação (2.5) obtemos os valores de α , os quais podemos imprimir em forma de tabela (λ, α) e/ou graficar (α versus λ) no registrador.

O EPC funcionando como elipsômetro de transmissão com analisador girante, utiliza o segundo método. O analisador gira e pára nas posições indicadas na Figura 32.

Figura 32. As quatro posições de parada do analisador com relação à posição do polarizador.

Estando a grade de difração do monocromador parada, nos dando um certo comprimento de onda, o analisador se encontra inicialmente parado na posição I_1 ($\beta = 0^\circ$). Então, o microcomputador lê o sinal da fotomultiplicadora. Depois o analisador é girado para a posição I_2 ($\beta = 45^\circ$) e nova leitura é feita, e assim por diante até chegar à posição I_4 onde é feita a última leitura. Depois disto a grade de difração é girada nos dando um novo comprimento de onda, recomeçando a sequência de leitura. Depois de toda a varredura λ e χ são calculados para cada λ e podemos imprimir e/ou graficar os espectros de rotação ótica e elipticidade.

O microcomputador faz diversas leituras e obtém o valor médio das intensidades de luz lidas em cada posição de parada do analisador. Como a grade de difração do monocromador fica parada durante o tempo das leituras então qualquer flutuação, ruído, etc. que houver serão minimizados no processo de obtenção da média. Embora isto não minimize as flutuações durante a obtenção do espectro completo.

Mostramos a seguir o diagrama de bloco do funcionamento do EPC quando está operando como espectropolarímetro e também como espectrofotômetro.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Para testar o EPC usamos duas técnicas espectroscópicas: absorção ótica e atividade ótica.

Os resultados obtidos empregando estas duas técnicas são mostrados em espectros. Estes espectros exemplificam alguns fatores importantes, tais como, reprodutibilidade, sensibilidade e versatibilidade. Também demonstram o funcionamento do método matemático para obtenção da atividade ótica mostrado no capítulo anterior.

3.1 - O EPC FUNCIONANDO COMO ESPECTROFOTÔMETRO

As Figuras 33 a 37 ilustram o funcionamento do EPC como espectrofotômetro. A obtenção desses espectros é feita como descrita no capítulo anterior. Com o microcomputador acoplado servindo como fonte de controle e cálculo torna-se muito prático a obtenção de absorção ótica. O EPC funcionando como espectrofotômetro de único feixe simula um espectrofotômetro de duplo feixe, isto porque o microcomputador mantém guardado em memória o espectro de intensidade da luz transmitida pela referência e pela amostra.

Quando falamos em espectro de intensidade da luz transmitida, seja pela referência ou seja pela amostra, devemos lembrar, que embutido nesses espectros de intensidades, há vários outros fatores além da referência ou da amostra, que contribuem para os valores de intensidades nos espectros. Entre esses outros fatores temos por exemplo, a resposta espectral da fotomultiplicadora, isto é, a eficiência quântica e a resposta espectral da fonte luminosa.

A intensidade da luz detectada em um determinado comprimento de onda, pode ser escrita como:

:

$$I'_A = I_A R_F I_L \gamma \quad (3.1)$$

onde: I_A é a atenuação devido a absorção da amostra; R_F é a resposta espectral da fotomultiplicadora; I_L é a resposta espectral da fonte de luz; e γ é a atenuação devido aos componentes óticos no caminho da luz, ou seja, lentes, espelhos, etc.

Para se obter a absorbância é preciso fazer também uma medida para a referência:

$$I'_R = I_R R_F I_L \gamma \quad (3.2)$$

A absorbância medida é dada por:

$$A = \log \frac{I'_R}{I'_A} = \log \frac{I_R}{I_A} \quad (3.3)$$

o que mostra que os fatores extras que aparecem na intensidade da luz detetada são cancelados e só o efeito de absorção é responsável pela absorbância medida.

A figura 33 mostra os espectros de transmitância de um filtro de interferência, cuja região de transmissão se encontra em torno de 540 ± 10 nm. Os espectros são compostos de 37 pontos; 20 leituras foram feitas para cada ponto; o intervalo de comprimento de onda entre pontos consecutivos é de 0,83nm. Nesta figura mostramos a reprodutibilidade do EPC funcionando como espectrofotômetro. Portanto, a curva cheia foi obtida inicialmente e em seguida, foi obtida a curva tracejada. Podemos observar que os espectros estão bem reproduzidos.

Ainda como exemplo de reprodutibilidade, comparamos os espectros de transmitância, obtidos no EPC e no espectrofotômetro Cary-17, do filtro de interferência mencionado acima. A figura 34 mostra os espectros obtidos. Eles são compostos de 20 pontos, 20 leituras para cada ponto e o intervalo de comprimento de onda entre pontos é de 1,11 nm. O espectro obtido no espectrofotô

Figura 33. Espectro de Transmitância obtido no EPC do filtro de Interferên-
demonstra a reprodutibilidade do instrumento.

metro Cary-17 foi digitalizado e estes pontos foram introduzidos através do teclado no microcomputador usado no EPC e com o programa de obtenção de gráfico (ver apêndice) obtivemos o espectro mostrado em linha tracejada. A finalidade da digitalização foi exatamente para colocar os dois espectros na mesma escala do registrador usado no EPC e facilitar a comparação. Portanto, podemos notar que os dois espectros estão bastante reprodutivos.

Na figura 34 observamos que o espectro de transmitância é menor do que o espectro mostrado na figura 33; isto é devido ao feixe de luz ter atravessado o filtro de interferência em diferentes regiões deste filtro, já que ele não tem uma superfície homogeneamente transparente.

Visto que o EPC reproduz suas medidas, podemos verificar a sua sensibilidade, já que este também é um fator importante em um instrumento de medição. A figura 35 mostra o espectro de absorção da proteína CO-Hemoglobina dissolvida em água⁽²⁸⁾. O espectro é composto de 191 pontos; 20 leituras foram feitas para cada ponto; o intervalo de comprimento de onda entre cada ponto é de 1,11 nm. Podemos observar nesta figura baixíssimo ruído e portanto a curva bastante suave. A escala neste espectro é de zero a uma densidade ótica (D.O.), mas também é possível obter com o EPC valores de densidade ótica maiores do que 1 D.O. (até 3 D.O.). Temos, portanto, um limite superior, então procuramos também encontrar o valor de limite inferior de D.O. que se pode medir com o EPC. Então, para isto diluimos a amostra acima por um fator de 10 vezes e obtivemos o espectro mostrado na figura 36. Usamos o mesmo número de pontos, o mesmo número de leituras e o mesmo intervalo de comprimento de onda entre pontos consecutivos. Podemos observar nesta figura uma curva mais ruidosa. Entretanto, a forma da curva espectral é semelhante a forma da curva espectral da figura anterior. Portanto, é possível medir absorção de amostra bastante diluída, da ordem de 10^{-6} Molar.

Figura 34. Espectro de Transmitância obtido no EPC (linha cheia) e obtido no espectrofotômetro Cary-17 (linha tracejada).

Figura 35. Espectro de Absorbância de CO-Hemoglobina obtido no EPC.

Figura 36. Espectro de Absorbância de CO-Hemoglobina obtido no EPC demonstra o limite inferior de sensibilidade.

O intervalo de sensibilidade do EPC é compatível com o intervalo de sensibilidade dos espectrofotômetros comerciais. Mas além deste fator importante, podemos ainda verificar outro fator, a versatibilidade. Como o EPC funcionando como espectrofotômetro é possível se obter cinética de reação ou variação da intensidade de luz transmitida através da amostra em função do tempo. No EPC o espectro de cinética é obtido fazendo o microcomputador ler o sinal da fotomultiplicadora a cada intervalo de tempo Δt . Em seguida esses dados são registrados e/ou impresso em tabela.

Assim, a figura 37 mostra a curva de cinética de reação de mono-ester de sacarose em hemácia. A curva mostra a relação $I(t > t_0)/I(t=t_0)$ em função do tempo em minutos, sendo $I(t > t_0)$ a intensidade da luz transmitida através da amostra em tempos maiores e igual a t_0 inicial, enquanto $I(t = t_0)$ é a intensidade da luz transmitida através da amostra no tempo t_0 inicial. Este espectro é composto de 41 pontos, Δt é de 0,1 minutos e o comprimento de onda da luz incidente é 540 nm. Usamos o programa econtrado no apêndice para obter este espectro. Então, observamos que dentro de 2,5 minutos a transmissão de luz começa a se estabilizar indicando que a reação está se encerrando e possivelmente as proteínas no interior da hemácia estejam se desnaturando.

Para se obter no EPC todos os espectros acima citados usamos uma lâmpada incandescente halogênica de 100 watts e 12 volts em substituição a lâmpada de xenônio que inicialmente mencionamos no capítulo anterior. Com esta substituição melhoramos a relação sinal/ruído, mas ficamos limitados à região visível.

Feito isto, o EPC na fase em que se encontra demonstra funcionar muito bem como espectrofotômetro. É importante salientar que devido o EPC poder imprimir os dados de absorção ótica em tabela, torna-se muito prático para localizar o comprimento de onda para a intensidade máxima, bem como para manipular os dados.

Figura 37. Espectro de Cinética de Reação de Mono-Ester de Sacarose em Hemácia, obtido no EPC.

3.2 - O EPC FUNCIONANDO COMO ESPECTROPOLARÍMETRO OU ELIPSÔMETRO

A obtenção dos espectros de atividade ótica é muito mais difícil do que a obtenção do espectro de absorção. Esta dificuldade é devido ao fenômeno de dicroísmo circular e rotação ótica ser de segunda ordem, comparado ao fenômeno de absorção ótica. Nem todas as substâncias são óticamente ativas, mas todas as substâncias são absorventes. Mesmo que o dicroísmo circular também seja um fenômeno de absorção, ele é tipicamente 3 ordens de grandezas menor que o fenômeno de absorção (29).

A obtenção do espectro de dicroísmo circular por método dos convencionais requer cuidados especiais desde o preparo da amostra, a concentração ideal, até a detecção do sinal (1). Vimos no Capítulo I o diagrama de um espectrômetro para dicroísmo circular. Vimos também a maneira pela qual o sinal é detectado. Logo o espectro de dicroísmo circular é muito sensível a erros por parte da detecção eletrônica. Em geral, a relação sinal/ruído deve ser muito grande para obtenção do espectro de dicroísmo circular legível.

Os espectros de dispersão rotatória ótica também são sensíveis a detecção. Geralmente os ângulos de modulação da luz linearmente polarizada são muito pequenos, isto acarretando baixa transmitância do sistema ótico. A sensibilidade do espectropolarímetro deve ser alta para poder medir pequenas variações de intensidade de luz. Além disso, uma amostra absorvente dificulta notadamente a determinação dos ângulos de rotação nos dando grande imprecisão nos valores dos ângulos de rotação (23).

Procuramos eliminar os problemas acima citados fazendo o EPC funcionar diferente do funcionamento dos polarímetros convencionais embora use o mesmo princípio. Em geral, esses polarímetros usam o método dos ângulos simétricos para determinação do ângulo de rotação ótica. No EPC usamos o segundo método descrito no capítulo anterior. Este método é semelhante ao método de ob

tenção de dados usados em elipsômetro de analisador girante. Ele é mais fácil de ser entendido baseando-se na Lei de Malus.

A Figura 38 mostra a curva $\cos^2 \beta$ devido ao movimento do analisador.

Quando não há amostra as posições do analisador em $\beta = 45^\circ$, $\beta = 135^\circ$ ou -45° são idênticas e as posições em $\beta = 0^\circ$ e $\beta = 90^\circ$ correspondem ao máximo e o mínimo de intensidade de luz.

Figura 38. Esboço da curva $\cos^2 \beta$

Quando há amostra no caminho da luz as posições do analisador em $\beta = \pm 45^\circ$ são desiguais e nas posições $\beta = 0^\circ$ e 90° as intensidades são deslocadas das posições de máximo e de mínimo. São estas intensidades as utilizadas nas equações (2.14) e (2.15) e de onde se obtêm a elipticidade e rotação ótica simultaneamente.

Como está explicado acima, o nosso método se baseia na medida da intensidade de luz em quatro posições específicas do analisador. Testamos então a reprodutibilidade do sinal nestas posições. A Figura 39 mostra o gráfico de intensidade de luz chegando no detetor quando o analisador gira. Cada pico corresponde a meia volta do analisador, ou seja, as posições 0° , $+45^\circ$, 90° e -45° . Este gráfico foi obtido usando-se a lâmpada de Xenônio em 546 nm. Observamos um alto nível de ruído como também variações nas alturas dos picos. Concluimos que devido a essas variações de in-

tensidade de luz nessas posições, seria difícil obter bons resultados com esta lâmpada.

Mesmo com esta flutuação procuramos obter o espectro de atividade ótica de algumas substâncias. A Figura 40 mostra o espectro de dispersão rotatória ótica da sacarose na região visível. Esta substância não tem banda de absorção nesta região então o que se observa é a variação do índice de refração com o comprimento de onda. A Tabela VI mostra os valores do ângulo de rotação versus

Figura 39. Gráfico da intensidade de luz chegando no detetor através do analisador girante. A lâmpada usada é de Xenônio.

Figura 40. Espectro de DRO de Sacarose obtido por EPC usando a lâmpada de Xenônio (linha cheia). Espectro de rotação específica da sacarose obtido na literatura (30) (linha tracejada).

TABELA VI

DRO de sacarose obtido no EPC

LAMBDA	RT
350	5.75
355	6.62
360	6.95
365	6.04
370	6.48
375	5.85
380	6.08
385	5.42
390	5.54
395	5.2
400	4.71
405	4.78
410	5.13
415	4.68
420	4.7
425	4.19
430	4.41
435	3.73
440	4.34
445	3.75
450	3.89
455	3.5
460	3.68
465	1.66
470	3.5
475	3.15
480	3.43
485	2.91
490	2.83
495	2.86
500	2.92
505	2.36
510	2.6
515	1.98
520	2.55
525	2.33
530	2.36
535	2.2
540	2.44
545	2
550	2.2
555	1.94
560	2.29
565	1.94
570	1.89
575	1.9
580	1.77
585	1.7
590	1.88
595	1.43
600	1.64

λ , obtido no EPC. O espectro de sacarose foi obtido no intervalo de 350 a 600 nm, o número de pontos no espectro é de 51, o número de leituras para cada ponto é de 10. A forma da curva apresenta ser hiperbólica concordando com os resultados teóricos e também perfeitamente de acordo com a curva de rotação específica da sacarose (Curva Tracejada) obtida da literatura (30). A curva tracejada foi obtida entrando com os valores da Tabela VII no EPC que fez então o gráfico $[\alpha]$ versus λ . Na tabela VII são encontrados os valores da tabela da referência 30. Portanto, da Figura 40 apesar da forma qualitativa da curva poder ser deduzida, o ruído é bastante alto e proíbe qualquer tentativa de se obter dados quantitativos.

Para observar o efeito Cotton procuramos um material que tivesse grande atividade ótica, tentando superar o grande ruído observado nos espectros. Este material foi uma lâmina plástica retardadora $\lambda/4$ (da Bausch-Lomb). Esta lâmina exibe uma elipticidade e efeito Cotton positivos na região visível, como está explicado a seguir.

A lâmina retardadora obedece a seguinte equação (31):

$$\delta = 2\pi \Delta n d / \lambda_0 \quad (3.4)^*$$

onde δ é a diferença de fase entre as componentes (na direção dos eixos rápido e lento da lâmina) do campo elétrico $\vec{E}$ da luz linearmente polarizada, incidindo sobre a lâmina, d é a espessura da lâmina, λ_0 é o comprimento de onda no vácuo e Δn é a diferença entre os índices de refração do eixo rápido e do eixo lento da lâmina.

Suponha que $\vec{E}$ faça um ângulo ϕ com relação ao eixo rápido, como mostra a Figura 41.

TABELA VII

ROTAÇÃO ESPECÍFICA OBTIDO DA LITERATURA (30)

LAMBDA	ROTAÇÃO ESPECÍFICA
382.6	173.1
383.3	171.8
388.9	166.7
414.4	144.2
419.1	140
426.1	134.9
427.2	134.2
428.2	133.6
431.5	130.7
433.7	129.8
435.3	128.5
435.8	128.49
437.6	127.2
438.4	126.5
467.8	109.69
468	109.49
472.2	107.38
480	103.62
481.1	103.07
508.6	91.16
510.6	90.46
515.3	88.68
521.8	86.21
546.1	78.16
570	71.24
578	69.22
578.2	69.1
589.3	66.45
636.2	56.51
643.8	55.04
670.8	50.51

Figura 41. Esboço da lâmina $\lambda/4$, onde mostra o eixo rápido

(F) e o eixo lento (S). Os eixos X e Y são do sistema de referência do laboratório.

A componente de $\vec{E}$ que é paralelo ao eixo rápido está adiantada em 90° com relação a componente de $\vec{E}$ perpendicular a este eixo, para o λ_0 que satisfaz a equação (3.4). Se as amplitudes destas componentes forem diferentes, teremos uma luz elipticamente polarizada emergindo da lâmina. Se as amplitudes forem iguais ($\phi=45^\circ$) teremos uma luz circularmente polarizada. Neste caso, o módulo do ângulo de elipticidade, $[\chi]$, é igual a 45° , enquanto que a rotação ou azimuth é indeterminado.

Agora, fazendo uma varredura em comprimento de onda passando por λ_0 (fora de λ_0 a lâmina retardadora não funciona com a retardação de $\lambda/4$), teremos diversas elipses com seus eixos maior girados em relação a $\vec{E}$ dependendo do valor de δ . A Equação que, nos dá a relação entre o azimuth ou rotação do eixo maior da elipse com relação ao eixo-x do sistema de referencial adotado (31) é

$$\operatorname{tg} 2\alpha = \operatorname{tg} (2\phi) \cos \delta \quad (3.5)$$

sendo

$$\operatorname{tg} \phi = \frac{a_2}{a_1} \quad (3.6)$$

onde a_2 e a_1 são as amplitudes dos campos elétricos componentes vi -

brando nas direções y e x, respectivamente.

Portanto, das equações (3.4) e (3.5), admitindo os valores de $\lambda < \lambda_0$, δ é maior que 90° e teremos rotações óticas negativas e a elipse não se encontra com seus eixos paralelos aos eixos da lâmina retardadora. Se $\lambda = \lambda_0$, das equações (3.4) e (3.5), teremos que $\delta = 90^\circ$ mas a $\text{tg } 2\alpha$ é igual a zero. Isto indica que a elipse se encontra com seus eixos paralelos aos eixos da lâmina retardadora. Se $\lambda > \lambda_0$, δ é menor que $\pi/2$ teremos rotações óticas positivas.

A Figura 42 mostra o espectro de rotação ótica da lâmina retardadora obtido no EPC. O espectro é composto de 21 pontos o intervalo de comprimento de onda abrange de 400 a 600 nm, o número de leitura foi de 10 para cada uma das 4 posições do analisador. A Tabela X mostra os valores da rotação ótica versus λ . A lâmpada usada foi a de Xenônio.

Observa-se que $\alpha \approx 0$ para $\lambda \approx 515$ nm. Este deve ser, portanto, o valor de λ_0 para esta lâmina. O efeito Cotton previsto também é claramente observado.

O método matemático que usamos é incapaz de determinar o sinal da elipticidade, isto é, o "handedness" ou o sinal de uma banda de dicroísmo circular, mas como foi visto na parte teórica (Capítulo II) é possível determinar o sinal do dicroísmo circular ou elipticidade a partir do sinal do efeito Cotton conhecido.

A Figura 43 mostra a elipticidade obtida para a lâmina retardadora. A banda foi feita positiva para ficar de acordo com o efeito Cotton positivo obtido na rotação ótica. A Tabela VII mostra estes dados na forma χ versus λ . O máximo da elipticidade é observado em torno de 515 nm, e coincide com o ponto de inflexão da curva do efeito Cotton, como já mencionado na parte teórica. Esperava-se em $\lambda = \lambda_0$ um valor de $\chi = 45^\circ$, mas o valor obtido foi pró-

Figura 42. DRO da lâmina retardadora (Bausch-Lomb).

Figura 43. Espectro de Elicidade da lâmina retardadora (Bausch-Lomb).

TABELA VIII

DC E DRO DA LÂMINA RETARDADORA $\lambda/4$ OBTIDO NO EPC

LAMBDA	DC	RT
400	13.46	-4.46
410	9.57	-4.31
420	4.84	-4.78
430	5.06	-4.49
440	8.97	-5
450	14.11	-4.86
460	19.29	-5.75
470	23.62	-5.56
480	27.82	-6.69
490	32.76	-7.52
500	36.73	-10.6
510	40.73	-16.56
520	42.77	37.71
530	40.64	10.62
540	37.33	5.6
550	33.79	2.33
560	30.4	1.69
570	26.85	.29
580	32.86	.93
590	22.06	-.35
600	19.17	-.28

ximo de 43° . Possivelmente, o eixo do polarizador não se encontrava exatamente a 45° do eixo rápido da lâmina retardadora e por isso a luz emergente não era circularmente polarizada.

Um outro provável fator responsável pelo valor de χ diferente de 45° em $\lambda = \lambda_0$ é a oscilação da intensidade de luz incidente. Esta oscilação pode ser notada em torno de $\lambda = 580 \text{ nm}$ onde se observa um máximo que não deveria ocorrer.

Com a troca da lâmpada de Xenônio pela lâmpada incandescente houve uma notável melhora na relação sinal/ruído.

O primeiro teste que fizemos foi verificar a lei de Malus. Isto nos dá uma indicação do alinhamento dos polarizadores e da reprodutibilidade quando se gira o analisador. A Figura 44 mostra a curva experimental do movimento do analisador girante, quando não há amostra presente no caminho da luz. O comprimento de onda usado foi 546 nm . Nota-se que o resultado obtido foi excelente.

Repetimos também o teste feito anteriormente com a lâmpada de Xenônio e mostrado na Figura 39. A Figura 45 mostra a curva das intensidades de luz devido ao movimento do analisador girante, observando as posições de 0° , $+45^\circ$, 90° e -45° , nas quais o analisador está parado. O erro introduzido no ângulo de rotação devido a pequena diferença na terceira casa decimal entre as intensidades de luz nas posições $+45^\circ$ e -45° é de $0,2^\circ$. Esta diferença de intensidade tem principalmente duas origens: a resolução angular de 1° e flutuação da rede elétrica.

Com esta nova lâmpada, obtemos o espectro de rotação ótica da cânfora, mostrado na Figura 46. O que se nota, na verdade, é apenas o efeito de dispersão ótica, já que a cânfora não absorve no visível. É preciso salientar que foram graficados apenas 41 pontos. A Tabela IX mostra os valores dos ângulos de rotação ótica. O número de leitura em cada posição de parada do analisador foi de 20. O intervalo de comprimento de onda foi de 400 a 600 nm . O intervalo de

INTENSIDADE DA LUZ

Figura 44. Intensidade de luz devido ao giro do analisador de acordo com a Lei de Malus. Esta curva foi obtida com a lâmpada incandescente.

INTENSIDADE DA LUZ

Figura 45. Intensidade de luz quando o analisador girante é posicionado em $\beta = 0^\circ, 45^\circ, 90^\circ, -45^\circ$. Obtida com a lâmpada incandescente.

Figura 46. Espectro de DR0 de Canfôra.

TABELA IX

DRO DE CÂNFORA OBTIDO NO EPC

LAMBDA	RT
400	3.58
405	3.59
410	2.90
415	2.91
420	2.49
425	2.75
430	2.31
435	2.24
440	2.21
445	1.99
450	2.08
455	1.75
460	1.65
465	1.96
470	1.53
475	1.38
480	1.59
485	1.61
490	1.10
495	1.37
500	1.02
505	1.14
510	1.
515	.997
520	.98
525	.976
530	.970
535	.86
540	.858
545	.841
550	.741
555	.790
560	.704
565	.834
570	.657
575	.576
580	.545
585	.768
590	.580
595	.527
600	.427

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

No capítulo anterior, demonstramos a utilização do EPC como espectrofotômetro de absorção e como espectropolarímetro. Além da grande versatibilidade do nosso equipamento, vamos detalhar a seguir suas vantagens e desvantagens em relação aos equipamentos comerciais.

Vantagens do EPC sobre alguns espectrofotômetros comerciais:

1. possibilidade de se obter espectro de absorção ótico de várias substâncias mantendo as intensidades de luz transmitida através da referência guardada em memória (Ver programa);
2. os espectros de absorção ótica podem ser manipulados, como por exemplo, fazer diferença espectral, deconvolução de bandas, etc... Já que podemos obter todos os valores de absorbância versus comprimento de onda em Tabela;
3. podemos obter a média de vários espectros de absorção de uma mesma amostra, melhorando desta maneira a relação sinal/ruído;
4. para cada valor de intensidade de luz lida, o motor do monocromador está parado, possibilitando precisão na determinação do comprimento de onda no qual a leitura de intensidade de luz está sendo feita;

5. a disposição dos componentes óticos permite o uso do EPC para medida de Dicroísmo Linear;
6. com o monocromador parado em um determinado comprimento de onda é também possível observar mudanças na transmitância de uma amostra com o tempo;
7. pelas comparações entre os espectros obtidos no EPC e os espectros obtidos no espectrofotômetro Beckman-DK-2 observamos melhor resolução nos espectros obtidos no EPC;
8. Facilidade na determinação dos máximos de absorção , que podem ser achados facilmente na Tabela de absorção versus comprimento de onda;

Algumas limitações ou propriamente dificuldades são apresentadas pelo EPC funcionando como espectrofotômetro na fase em que se encontra montado:

1. a linha de base sofre flutuação. A flutuação na linha de base é devido a instabilidade da fonte de luz, já que as leituras dos sinais da referência e amostra não são feitas em tempo real. Esta flutuação contribuiu para baixar notadamente a relação sinal/ruído. A lâmpada de Xenônio, por exemplo, chega a ter flutuações da ordem de 10% a 40% (32). O efeito de flutuação da linha de base pode ser minimizado controlando-se automaticamente a tensão da fotomultiplicadora. A utilização de uma fenda variável também contribui para esta minimização. Outra possibilidade é mudar de lâmpada, procurando uma lâmpada on

- de os efeitos de flutuações sejam menores, o uso da lâmpada incandescente torna a linha de base mais estável;
2. tempo de varredura do intervalo espectral maior que nos espectrofotômetros comerciais. O tempo de varredura do intervalo espectral pode ser menor se tivermos um radiômetro com resposta mais rápida;
 3. relação sinal/ruído menor que nos aparelhos comerciais;
 4. não temos o controle automático do fluxo de energia incidindo sobre a amostra. O fluxo de energia sobre a amostra pode ser controlado automaticamente com a utilização de uma fenda variável;
 5. a quantidade máxima de pontos do espectro é limitada a 256 pontos. A limitação do espectro é devido aos 8 bits que os conversores D/A operam. O número de pontos do espectro pode ser aumentado mudando os conversores D/A para outros com maior capacidade em bits;
 6. a capacidade de memória do microcomputador limita o espectrômetro. O microcomputador usado limita a operação do espectrômetro por ter somente 16K de memória utilizável. Com este microcomputador também não é possível guardar os dados em fita ou disquete para manipulação posterior. Para tornar mais versátil o EPC, seria preciso a troca do microcomputador por outro com mais memórias e disponibilidade para disquete e outros periféricos. Um microcomputador que tivesse impressora gráfica resolveria também o proble-

- de os efeitos de flutuações sejam menores, o uso da lâmpada incandescente torna a linha de base mais estável;
2. tempo de varredura do intervalo espectral maior que nos espectrofotômetros comerciais. O tempo de varredura do intervalo espectral pode ser menor se tivermos um radiômetro com resposta mais rápida;
 3. relação sinal/ruído menor que nos aparelhos comerciais;
 4. não temos o controle automático do fluxo de energia incidindo sobre a amostra. O fluxo de energia sobre a amostra pode ser controlado automaticamente com a utilização de uma fenda variável;
 5. a quantidade máxima de pontos do espectro é limitada a 256 pontos. A limitação do espectro é devido aos 8 bits que os conversores D/A operam. O número de pontos do espectro pode ser aumentado mudando os conversores D/A para outros com maior capacidade em bits;
 6. a capacidade de memória do microcomputador limita o espectrômetro. O microcomputador usado limita a operação do espectrômetro por ter somente 16K de memória utilizável. Com este microcomputador também não é possível guardar os dados em fita ou disquete para manipulação posterior. Para tornar mais versátil o EPC, seria preciso a troca do microcomputador por outro com mais memórias e disponibilidade para disquete e outros periféricos. Um microcomputador que tivesse impressora gráfica resolveria também o proble-

ma da limitação do gráfico a 256 pontos. Esta implementação faria do EPC um espectrômetro de grande capacidade em automação.

As vantagens do EPC funcionando como espectropolarímetro são:

1. não usa modulador eletro-ótico ou foto-elástico ou birefringentes;
2. o sistema ótico é o mais simples possível (Ver Figura 23);
3. as leituras de intensidades de luz são obtidas com os motores de passo do analisador e do monocromador parados. Isto evita diferenças de comprimentos de onda em cada leitura, como ocorre em espectrômetro analógico;
4. usa um mancal pneumático, obtendo centralização do analisador com precisão;
5. a utilização do microcomputador para comandar o motor de passo que faz girar e posicionar o analisador. Isto elimina os incômodos círculos divididos usados nos analisadores de giro contínuo (22);
6. obtemos a rotação ótica e elipticidade simultaneamente;
7. a transmitância do sistema é em torno de 50%, possibilitando trabalhar com amostras absorventes;

8. o método matemático é semelhante ao método do elipsômetro de analisador girante, o que nos garante sua confiabilidade;

9. o método elimina a absorção ótica.

10. Versatibilidade.

As limitações e problemas do EPC funcionando como es-
pectropolarímetro:

a) Limitações primárias:

1. resolução angular baixa, 1° ;

2. longo tempo de resposta do radiômetro;

b) Limitações secundárias:

1. flutuação da fonte de luz e instabilidade da rede elétrica;

2. baixa qualidade da luz monocromática;

3. imprecisão no alinhamento;

4. capacidade limitada do microcomputador usado;

5. falta de controle automático do nível de energia;

6. fotomultiplicadora de baixa eficiência;

7. baixa relação sinal/ruído. O ruído típico é da ordem de meio grau.

Alguns dos itens acima podem ser solucionados como segue:

1. a resolução angular pode ser melhorada para valores de $0,01^{\circ}$ se fizermos uma redução de 750:1 ou adquirir outro motor de passo cujo passo típico seja menor;
2. a resposta do radiômetro é o fator de maior limitação do EPC. A sua escala de tempo de resposta vai de 10 a 0,1 segundos. Mesmo utilizando a escala de 0,1 segundos, o tempo de leitura do radiômetro é muito maior que o tempo de leitura do microcomputador. Isto acarreta em erros de leitura do microcomputador.

A solução para esse problema é girar o analisador lentamente, isto é, fazer o tempo para cada passo ser 0,3 segundos. Isto faz com que o analisador dê uma volta completa em cerca de dois minutos. Esta solução acarreta outro problema, ou seja, para se obter um espectro, com 100 pontos é necessário cerca de uma hora e 45 minutos. Uma outra solução é a substituição do radiômetro 7070 ORIEL por outro;

3. A luz monocromática para polarimetria ou elipsometria, deve ser de ótima resolução. Quando a luz é perfeitamente monocromática também é perfeitamente polarizada (31). Geralmente os monocromadores para esse tipo de espectrômetro são de dupla grade de difração ou duplo prismas ou ainda grade de difração e prisma, isto é, duplo monocromador;
4. o alinhamento dos componentes óticos tem muitas limitações. Para se obter um bom alinhamento os componentes óticos, principalmente os polarizadores devem po

der ser micrometricamente movidos. Assim, poderemos obter o alinhamento com alta precisão;

5. embora o microcomputador tenha 16K de memória RAM , só o programa executado em BASIC ocupa 14K de memória. Não temos condições de manipulação de arquivos quer seja em fita magnética, quer seja em disquete . A solução é adquirir um microcomputador com maior capacidade;
6. devido a falta de controle automático de nível de energia torna-se difícil minimizar alguns dos problemas acima citados, tal como, flutuação da fonte de luz. As soluções seriam usar uma fenda variável movida por servo-motor e controlada através de um sensor foto-elétrico, ou usar uma tensão na fotomultiplicadora variável de acordo com a flutuação da intensidade de luz;
7. a fotomultiplicadora é de baixa eficiência. Para que se possa detetar o nulo é necessário aumentar a sensibilidade do radiômetro por um fator de 100 vezes . A solução seria utilizar uma fotomultiplicadora que pudesse detectar pouca e muita quantidade de luz;
8. a relação sinal/ruído é um fator importante em todo instrumento. Devido alguns problemas citados acima , esta relação é baixa para algumas amostras, como por exemplo, amostras biológicas. Para melhorar esta relação seria necessário resolver os problemas já citados, principalmente a flutuação da lâmpada e a resposta do radiômetro.

Em resumo, concluímos que se corrigidas algumas deficiências, tempo de resposta do radiômetro, eficiência da fotomultiplicadora, estabilização da flutuação da fonte de luz e qualidade do monocromador, o EPC seria um espectrômetro muitíssimo versátil e eficiente.

É nossa intenção em prosseguimento ao projeto, procurar efetuar as soluções propostas aos problemas encontrados, além de tentar implementar o EPC para medidas foto-acústicas.

A P Ê N D I C E

A.1 - Sistema de Detecção para fotomultiplicadora

O sistema de detecção usado é o radiômetro 7070 Detection System-ORIEL. É um instrumento de larga variedade de aplicações na medida de radiação de luz. Altamente sensível, estável, permite medir desde 200 a 1100 nm, abrangendo o ultravioleta, visível e infravermelho próximo. A Tabela X resume as características deste detector (18).

No painel frontal temos as seguintes chaves:

Power - usada para ligar o radiometro, a rede elétrica.

Volts - usada para estabelecer a voltagem nos dinodos.

Measure (Volts/corrente) - usada para o display apresentar a alta voltagem aplicada a fotomultiplicadora, isto é, no dinodo ou a corrente da fotomultiplicadora.

Response - usada para selecionar o tempo de resposta do sistema.

Ambient Suppress - usada para cancelar a corrente produzida pela luz ambiente.

Multiplicador - usada para selecionar a sensibilidade da fotodetector em amperé.

TABELA X

Características do 7070 Detection System ORIEL (18)

Voltagem do dinodo	0 a -1000V
Corrente mostrada no display	0,000 a 1,999 x M
Voltagem da saída "recorder" (fundo de escala)	100 mV
Estabilidade à temperatura ambiente +27°C	±0,1%
Intervalo de temperatura de operação	14°C a 40°C
Linearidade	0,05%
Voltagem da rede (50-60 Hz)	220/230 VAC
Resposta: rápida	0,1 seg.
média	1,0 seg.
lenta	10,0 seg.
Intervalo do Multiplicador (corrente)	10 ⁻⁵ a 10 ⁻⁹ A
Intervalo do display analógico	0 a 2
Intervalo do display digital: voltagem	0 a -1000V
corrente	0,000 a 1,999
Intervalo da supressão do ambiente	10 ⁻⁵ a 10 ⁻⁹ A.

Atenuador - usada para atenuar a leitura no painel frontal.

Zero (on/off) - usada para desligar o sensor (fotomultiplicador) de maneira que se possa zerar o eletrometro.

Zero (potenciômetro) - usada para zerar os medidores do painel frontal quando Zero (on/off) está em on.

Display digital - usada para mostrar a alta voltagem do dinodo ou mostrar a corrente da fotomultiplicadora.

Display analógico - usada para mostrar apenas a corrente.

No painel traseiro, temos:

Conector BNC - usado para receber o sinal da fotomultiplicadora.

Conector (25 pinos) - usado para conectar, impressora, interface para computador, etc. Tem os dados do display digital convertido em BCD paralelo e multiplexado.

Conector de alta voltagem - usado para conectar a fonte de alimentação de alta voltagem à fotomultiplicadora.

Recorder jacks - usado para conectar um registrador ou osciloscópio. Esta saída é conectada ao display analógico.

A.2 - Motores de passos ou de pulso e "driver-control"

Dois motores de passos são usados no EPC, um com o analisador e um outro com a grade do monocromador.

Estes motores foram construídos pelo Departamento de Engenharia Elétrica - EESC-USP, juntamente com seus respectivos "driver-control". O "driver-control" opera por lógica TTL, podendo ser interfaceado a um microcomputador.

O passo típico deste motor é de $7,5^{\circ}$. O torque depende da frequência de excitação ou pulsos de onda quadrada por segundo. A figura 47 mostra o gráfico do torque (g.cm) versus pps. A linha cheia indica a operação sem rampa e a linha tracejada indica a operação com rampa (24).

Através do "driver-control" é possível fazer o motor girar no sentido horário ou anti-horário, parar com o rotor travado, ou destravado, dar passos por períodos curtos ou longos. Cada motor tem o seu próprio "driver-control". O "driver-control" do motor do analisador é ligeiramente diferente do "driver-control" do motor do monocromador. Descreveremos a seguir as entradas e saídas do "driver-control" do analisador.

CLK (clock) - nesta entrada se aplica os pulsos de onda quadrada para excitação do motor. A relação entre frequência de pulso (Hz) e rotação do motor, é dada por:

$$f(\text{RPM}) = 1,25 f_0(\text{Hz})$$

DIR (direção) - nesta entrada, se define o sentido de rotação, horária (nível alto) ou anti-horário (nível baixo).

P1 (Parada 1) - esta entrada serve para controlar o movimento do motor.

P2 (Parada 2) - esta entrada também é usada para controle do movimento do motor. A operação desta entrada é inversa a operação da entrada P1.

O "driver-control" do motor do monocromador tem praticamente as mesmas entradas do "driver-control" anterior, apenas com os códigos de controles invertidos. As entradas são as seguintes:

C (Clock) - entrada para pulsos de onda quadrada.

Figura 47. Gráfico do Torque dos motores de passos

D (Direção) - nível alto - rotação anti-horária.
 nível baixo - rotação horária.

As entradas 1 e 2 estão invertidas com relação às entradas P1 e P2. O controle do movimento do motor é feito através destas entradas. A Tabela XI resume como estas entradas devem estar para que o motor seja acionado ou não.

TABELA XI

Controle de movimento dos motores de passo				
1	2	P1	P2	
0	0	1	1	motor para livre
1	0	0	1	motor para livre
0	1	1	0	motor em rotação normal
1	1	0	0	motor para travado

As saídas são semelhantes em ambos "driver-control":

P-fio preto do motor, M-fio marrom do motor, L-fio laranja do motor, A = fio amarelo do motor. Vcc = alimentação do "driver-control" e motor. Os fios vermelhos devem ser ligados nesta entrada.

Características elétricas

corrente no "driver-control" = 200 mA

corrente no conjunto, (motor + "driver-control") =

a) motor parado e travado = 900 mA

b) motor parado livre = 200 mA

Tensão: 12 Vcc

A.3 - Interface

A interface é o circuito eletrônico que comunica o radiômetro 7070, os "drivers-control" e o registrador ao microcomputador. Através da interface o microcomputador pode enviar controles para os motores de passos, receber dados do radiômetro e enviar dados ao registrador.

A Figura 48 mostra o esquema eletrônico da interface.

A interface tem três LED'S, um dos quais indica o LIGA/DESLIGA, os outros dois indicam o funcionamento dos motores. Quando os LED'S do funcionamento dos motores estão acesos, indicam que os motores estão em operação. Quando esses LED'S estão apagados indicam que o microcomputador está lendo o sinal da fotomultiplicadora ou processando os dados, ou ainda, graficando o resultado. Quando os três LED'S estão acesos e os motores sem funcionar, indicam que a interface está desprogramada.

Os componentes básicos da interface são: o decodificador de endereço e as portas de entradas e saídas. O decodificador usado foi o 74LS138 e as portas de entradas e saídas são Z80 - PIO que é um circuito programável e que apresenta dois portos, A e B. A e B são virtualmente idênticos e são usados para interfacear diretamente ao periférico.

Como pode ser visto no esquema eletrônico, Z80-PIO-1 é usada para enviar controles para os motores de passos; a Z80-PIO-2 é usada para receber e transmitir os dados do radiômetro 7070 Oriel e a Z80-PIO-3 é usada para enviar dados aos conversores D/A. Esta 3a. Z80-PIO e os dois conversores D/A-Mcl408L8 MOTOROLA (26) compõem a interface do registrador. Através desta interface, o microcomputador pode controlar os eixos X-Y do registrador. Como os conversores D/A são de 8 bits, a precisão do gráfico fica limitada a no máximo 256 pontos.

Figura 48. Esquema eletrônico da Interface

A Figura 49 mostra a configuração dos pinos da Z80-PIO (25). Eles podem ser divididos em cinco partes:

1. Duto de dados da Unidade Central de Processamento (CPU)
2. Controle da Z80-PIO
3. Controle de Interrupção
4. Linhas de dados dos portos A e B
5. Alimentação e clock.

Descreveremos a seguir a função de cada pino.

D_7-D_0 - duto de dado da central de processamento. É bidirecional e é usado para transferir todo da do e comando entre a Z80-CPU e Z80-PIO.

B/A Sel - (Entrada) - Seleciona qual dos portos A ou B vai ser usado. É usado durante a transfe - rência de dado. O nível baixo seleciona o porto A enquanto o nível alto seleciona o porto B.

C/D Sel - (Entrada) - Seleciona entre controle ou da - dos para Z80-PIO. Um nível alto é interpretado como um comando que está sendo transferido da Unidade Central de processamento para a Z80-PIO. Um nível baixo é interpretado como um dado a ser transferido entre a unidade central de processamento e a PIO.

$\overline{CE}$ - Chip Enable (Entrada) - habilita a porta para en - trada ou saída de dados.

clock - é usado para sincronizar certos sinais inter - namente (é uma entrada).

Figura 49. Configuração dos pinos da Z80-PIO

$\overline{M1}$ - é um sinal do ciclo da máquina (é uma entrada).

$\overline{IORQ}$ - (Entrada) - é usado juntamente com B/A Sel, C/D Sel, $\overline{CE}$ e $\overline{RD}$ para transferir comando e dados entre a Z80-CPU e Z80-PIO. Quando $\overline{CE}$, $\overline{RD}$ e $\overline{IORQ}$ estão ativos há uma operação de leitura de dados. Quando $\overline{CE}$ e $\overline{IORQ}$ estão ativos mas $\overline{RD}$ inativo há uma operação de escrita de dado.

$\overline{RD}$ - (Entrada) - é usado com B/A Sel, C/D Sel, $\overline{CE}$ e $\overline{IORQ}$ para transferir dados da Z80-PIO para Z80-CPU.

IEI (Entrada) - habilita uma interrupção de entrada.

IEO (Entrada) - habilita uma interrupção de saída.

INT - (Saída) - Quando é ativa a Z80-PIO requisita uma interrupção da Z80-CPU.

A_0-A_7 - duto do porto A (bidirecional). São usados para transferir dados ou comandos para o aparelho periféricos.

$\overline{ASTB}$ e $\overline{BSTB}$ - são linhas para pulsos de "strobe" vindas do aparelho periféricos; são entradas para os portos A e B respectivamente.

ARDY e BRDY - são linhas de leituras dos registros dos portos A e B respectivamente. É uma saída.

B_0-B_7 - duto do porto B.

É importante lembrar que as Z80-PIO são portas paralelas programáveis e nenhum dado entra ou sai sem sua programação prévia. Há para isto quatro modos de programação (25).

Modo 0 = saída (OUTPUT)

Modo 1 = entrada (INPUT)

Modo 2 = bidirecional

Modo 3 = controle (control)

Os modos 0, 1, 2 para serem usados é necessário utilizar as linhas de "Handshake" enquanto que o modo 3 não necessita destas linhas. Neste modo, ainda podem ser selecionadas as linhas do duto de dados que vão operar. Para programar a Z80-PIO no modo 3, envia-se inicialmente uma palavra binária que informará a Z80-PIO em que modo ela operará, depois é necessário informar em quais linhas do duto de dados entrará ou sairá dados.

Por exemplo:

D ₇	D ₆	D ₅	D ₄	D ₃	D ₂	D ₁	D ₀
0	1	1	1	0	1	0	0

a linha que tiver o bit igual a 1 será uma entrada (INPUT) e as linhas com bit igual a 0 será uma saída (OUTPUT). Assim, D₆, D₅, D₄ e D₂ são vias de entrada de dados para o microcomputador.

As três Z80-PIO que usamos estão programadas no modo 3. A Z80-PIO-1 (motores) são programadas com as seguintes instruções, em Basic: OUT 129, 207; OUT 129, 0. Na primeira instrução, a CPU informa a Z80-PIO o modo de operação; na segunda instrução informa que as oito linhas operarão como saída.

A Z80-PIO- 2 (fotomultiplicadora) tem a seguinte programação: OUT 133, 207: OUT 133, 15; OUT 133, 207: OUT 133, 240; OUT 135, 207: OUT 135, 15; OUT 135, 207: OUT 135, 16.

A Z80-PIO- 3 (conversores D/A) está programada do seguinte modo: OUT 137, 207:OUT 137,0 ;OUT 139, 207: OUT 139,0.

Nos programas utilizados mostramos o uso desta programação.

As voltagens aplicadas aos componentes da interface são: $V_{cc} = +4a5V$; $V^{(-)} = -10a-12V$, $V^{(+)} = +10a+12V$. Devemos usar um osciloscópio ou um bom multímetro para verificar estas tensões.

A.4 - Microcomputador

O microcomputador que está sendo usado é D-8000-Dismac versão TRS-80. A linguagem BASIC é usada para comandos, cálculos, leitura e escrita. Nesta linguagem está escrito todo o programa principal.

O D-8000 utiliza Z-80-CPU. A Z80-CPU é encapsulado em um padrão industrial de 40 pinos (27). A Figura 50 mostra a configuração dos pinos e a função de cada um é descrita a seguir:

A_0-A_{15} (Duto de endereço) - entrada "Tri-state", ativa em nível alto. O duto de endereço fornece o endereço para a memória e para os periféricos. Os 8 bits menos significativos são usados diretamente para selecionar 256 portos de entrada ou saída.

D_0-D_7 (Duto de dados) - entrada/saída "Tri-state", ativa em nível alto. O duto de dados é usado para trocar dados com memória e periféricos.

$\overline{M}_1$ (um ciclo de máquina) - entrada, ativa em nível baixo.

Figura 50. Configuração dos pinos da UCP

$\overline{\text{MREQ}}$ (Requisita memória) - saída, ativa em nível baixo.

Este sinal indica que o duto de endereço contém um endereço válido para uma operação de ler ou escrever em memória.

$\overline{\text{IORQ}}$ (requisita entrada/saída) - saída "Tri-state" ativa em nível baixo. O $\overline{\text{IORQ}}$ indica que a metade menos significativa do duto de endereço contém um

endereço válido para uma operação de ler ou escrever em entrada/saída,

$\overline{\text{RD}}$ (ler memória) - saída "Tri-state", ativa em nível

baixo. $\overline{\text{RD}}$ indica que a CPU deseja ler dado da memória ou de um periférico.

$\overline{\text{WR}}$ (escrever memória) - saída "Tri-state", ativa em nível

baixo. $\overline{\text{WR}}$ indica que o duto de dados da CPU contém dado válido para ser armazenado na memória endereçada ou periférico.

$\overline{\text{RFSH}}$ (Refresh) - saída "Tri-state", ativa em nível baixo.

$\overline{\text{RFSH}}$ indica que os 7 bits menos significativos do duto de endereço contém um endereço para memória dinâmica.

$\overline{\text{HALT}}$ (Estado Halt) - saída, ativa em nível baixo. Halt

indica que a CPU tem executado uma instrução "Halt software".

$\overline{\text{WAIT}}$ (wait) - entrada, ativa em nível baixo. WAIT indica à Z80-CPU que a memória endereçada ou periférico não estão prontos para uma transferência de dado.

$\overline{\text{INT}}$ (Requisita interrupção) - entrada, ativa em nível baixo. $\overline{\text{INT}}$ é gerada pelo periférico.

$\overline{\text{NMI}}$ - entrada, disparada na transição negativa. A linha de interrupção não mascarável tem prioridade superior do que $\overline{\text{INT}}$.

$\overline{\text{RESET}}$ - entrada, ativa em nível baixo. RESET leva o contador de programa a zero e inicializa a CPU.

$\overline{\text{BUSRQ}}$ - entrada, ativa em nível baixo. O sinal é usado para requisitar a via de endereço da CPU, via de dado e sinais "tri-state" do controle de saída, para ir a um estado de alta impedância, de maneira que os periféricos possam controlar essas vias.

$\overline{\text{BUSAK}}$ -saída, ativa em nível baixo. É usado para indicar ao aparelho requisitante que as vias de endereço da CPU, via de dados e via de sinais - "Tri-state" do controle tem sido ativadas para o estado de alta impedância e o periférico pode agora controlar esses sinais.

$\emptyset$ (clock) - relógio.

Com a finalidade de ser mais informativo, relacionaremos em seguida, os pinos de conexões para expansão para periféricos, isto é, o barramento do D-8000:

Nº dos pinos	sinal	Nº dos pinos	sinal
1	GND	26	A10
2	GND	27	A13
3	A7	28	A11
4	A6	29	A12
5	A5	30	PHI
6	A4	31	PINT
7	A1	32	NC
8	A3	33	NC
9	A2	34	PHLDA
10	A0	35	PHANTOM
11	D5	36	HALT
12	D2	37	PWAIT
13	NC	38	IORQ
14	D1	39	PHOLD
15	D0	40	WR
16	D3	41	RD
17	D7	42	CCDBS/STADBS
18	D6	43	MREQ
19	Vcc	44	DODBS/ADDBS
20	D4	45	M1
21	A15	46	RESET
22	A8	47	RFSH
23	A14	48	NMI
24	A9	49	GND
25	NC	50	GND

PHI "clock" - 1,79 MHz
PINT interrupção
NC não conecte

PHLDA	PROCESSOR "HOLD ACKNOWLEDGE"
PHANTOM	"PHANTOM"
HALT	"HALT"
PWAIT	PROCESSOR "WAIT"
IORQ	REQUISIÇÃO DE ENTRADA/SAÍDA
PHOLD	PROCESSOR "HOLD"
WR	PROCESSOR "WRITE"
RD	PROCESSOR "READ"
CCDBS/STABS	"CONTROL AND STATUS BUS DISABLE"
MREQ	REQUISIÇÃO DE MEMÓRIA
DODBS/ADDBS	"DATA AND ADDRESS BUS DISABLE"
M1	PRIMEIRO ESTADO DE INSTRUÇÃO DO CICLO
RESET	"CPU RESET"
RFSH	"DYNAMIC MEMORY REFRESH"
NMI	NÃO MASCARA INTERRUPÇÃO

Os pinos pares se encontram no lado superior do barramento.

A.5 Gravador Cassete

O Gravador Cassete é usado para gravar os programas em fitas magnéticas.

A.6 - Registrador

O registrador usado é da Hewlett-Packard 7004B com duas entradas: entrada X e entrada Y. Também funciona no modo Y ,t.

A.7 - Impressora

A impressora que usamos é CENTRONICS, fabricada por DATA COMPUTER CORPORATION.

A.8 - Sequência de acionamento

Para bom desempenho do aparelho e para evitar problemas sérios com a eletrônica, o usuário deve seguir a sequência de acionamento.

O primeiro procedimento é verificar se cada aparelho eletrônico, isto é, fonte de alimentação da lâmpada, fonte de alimentação da interface, radiômetro, fontes de alimentação dos motores, microcomputador, registrador, impressora, etc., estão conectados nas suas respectivas voltagens.

O segundo procedimento é ligar o ventilador que serve para refrigerar a lâmpada e, em seguida, ligar a lâmpada que serve como fonte de luz; deixá-la aquecer antes de qualquer medida, para que se obtenham medidas estáveis.

Enquanto a lâmpada aquece, podemos continuar acionando os outros aparelhos. Mas, antes, devemos ligar o ar comprimido. Coloque cerca de 25 libras no manômetro. Abra a válvula que se encontra na base do filtro de ar, deixando escapar ar para verificar se o ar comprimido está sujo ou com água. Caso o ar esteja sujo ou com água, devemos melhorar o processo de filtração. Se o ar comprimido estiver seco, abra a torneira que dá passagem do ar comprimido para o mancal. Regule a pressão do ar que sai para o mancal, por exemplo, 500 gf/cm². Abra o compartimento do analisador e verifi-

que se o eixo-suporte está livre para girar. Assim, acionamos o mancal.

O quarto procedimento, é verificar se a fenda do monocromador está aberta ou fechada. Caso esteja aberta, feche-a. Ligue o radiômetro, lembrando que o multiplicador deve se encontrar na posição 10^{-5} . Também deve esperar uns 15 minutos para por em operação (Ver manual de instruções). Mantemos -450 a -500 Volts nos dinodos ou a tensão que melhor convém para as medidas.

O quinto procedimento é ligar o registrador, ajustando resposta da pena, filtros, linha de zero, etc. Colocar pena e papel suficientes para o espectro.

O sexto procedimento é ligar as fontes dos motores.

O sétimo procedimento é ligar a interface, verificando antes se está ligada ao barramento do microcomputador e se os periféricos estão devidamente ligados às suas saídas. Lembrar que a tensão de alimentação é de 5 Volts. Devemos esperar alguns minutos para que a fonte de alimentação se estabilize e só depois devemos ajustar a tensão e corrente necessárias para a operação da interface. Sempre é bom conservá-la fora da tensão crítica, evitando aquecimento dos integrados e possíveis queimas.

Caso seja necessário, isto é, se for usar a impressora deve-se ligá-la e mantê-la no modo "PRINT". Quando a impressora tiver ligada, o botão servo do registrador deve ser desligado, devido a interferência causada pela impressora. Se houver outros aparelhos a serem ligados, fazê-lo antes de ligar a interface e o microcomputador, lembrando a necessidade de ter a rede elétrica estável.

Por fim, ligar o microcomputador e esperar aparecer a imagem na tela. Simultaneamente aperte a tecla "BREAK" e o botão "RESET". Feito isto, aparecerá na tela a palavra "READY ?". Para entrar na linguagem "BASIC", aperte a tecla "NEW LINE" ou "ENTER".

O microcomputador está pronto para receber o programa.

Seguindo estas instruções, estaremos contribuindo para o bom funcionamento do EPC.

A.9. - Introdução do Programa

A introdução do programa pode ser feita através do teclado ou por cassete. O gravador usado é geralmente National ou CCE, pois são recomendados pelo fabricante do microcomputador, devido corresponderem à velocidade dentro dos padrões exigidos. Devemos ajustar o nível de Tonalidade e Volume no gravador.

As saídas do microcomputador para o gravador são distinguíveis por cores dos cabos: branco liga na entrada "MIC" do gravador; azul liga na entrada "REMOTE" e preto liga na entrada "EAR".

Para chamar o programa da fita cassete, deve-se proceder do seguinte modo:

- a) Tecle - CLOAD "A" - se desejar obter espectro de absorção ótica ou tecle- CLOAD "E" - se desejar obter espectro de atividade ótica.
- b) Em seguida baixe a tecla "play" do gravador e aperte a tecla NEW LINE ou ENTER.

Quando o microcomputador encontrar o programa desejado, aparecerá na tela dois asteriscos, um piscando e outro fixo. Quando todo programa for copiado, aparecerá na tela a palavra READY. Para começar, executar o programa e só teclar RUN e apertar a tecla NEW LINE ou ENTER.

Mostramos, a seguir, os programas para obtenção da atividade ótica e absorção ótica.

PROGRAMA PARA OBTENÇÃO DE ATIVIDADE ÓTICA

```

5 CLS
10 DIM A(256,7)
15 PRINT"PROGRAMA PARA OBTENCAO DA ATIVIDADE OTICA."
20 PRINT"RESPONDA AS SEGUINTE PERGUNTAS:"
25 INPUT"DESEJA TIRAR MEDIA(S/N)";M$
26 IF M$="S" OR M$="s" THEN 27 ELSE 29
27 INPUT"QUANTAS VEZES";M:GOTO30
29 M=1
30 OUT129,207:OUT129,0
32 INPUT"DESEJA DETERMINAR O ERRO(S/N)";W$
33 IF W$="S" OR W$="s" THEN GOSUB500
39 INPUT"DESEJA GRAFICO(S/N)";G$
40 IF G$="S" OR G$="s" THEN 41 ELSE 46
41 INPUT"DESEJA TRACAR OS EIXOS(S/N)";E$
42 IF E$="S" OR E$="s" THEN 43 ELSE 46
43 INPUT"ENTRE ALTURAS DAS MARCAS EM X,Y(MINIMO 05, MAXIMO 250)";MX,MY
44 INPUT"ENTRE OS INTERVALOS DE CADA MARCAS";IX,IY
45 INPUT"VELOCIDADE DA PENA";VP
46 INPUT"VELOCIDADE DO ANALISADOR";VA
47 INPUT"VELOCIDADE DE VARREDURA";NF
48 INPUT"NUMEROS DE PASSOS";NP
50 INPUT"LAMBDA INICIAL,LAMBDA FINAL";LI,LF
55 INPUT"COLOCOU AMOSTRA(S/N)";A$
56 IF A$="S" OR A$="s" THEN 60 ELSE 55
60 K=1:LB=LI:DLB=NP/3.6
65 A(K,1)=LB
70 GOSUB300
95 IF LB>=LF THEN 115 ELSE 100
100 K=K+1:LB=LB+DLB
105 GOSUB235
110 GOTO65
115 NN=((LF-LI)/DLB)+1:OUT128,96
120 GOSUB170
125 PRINT"NUMEROS DE PONTOS=",NN
130 IF G$="S" OR G$="s" THEN GOSUB400
135 INPUT"DESEJA TABELA(S/N)";T$
136 IF T$="S" OR T$="s" THEN 140 ELSE 160
140 LPRINT "LAMBDA          DC          RT"
145 FOR K=1 TO NN
150 LPRINT A(K,1),A(K,7),A(K,6)
155 NEXT K
160 INPUT"DESEJA REIMPRIMIR O GRAFICO(S/N)";R$
161 IF R$="S" OR R$="s" THEN 130 ELSE 165
165 END
170 FOR K=1 TO NN
172 R1=(A(K,3)-A(K,5))/(A(K,3)+A(K,5))
173 R2=(A(K,4)-A(K,2))/(A(K,4)+A(K,2))
175 R3=(R1/R2)-E1
176 A(K,6)=(1/2)*ATN(R3)*(180/3.1416)
177 R4=SQR(R12+R22)-E2

```



```

178 R5=ABS((1-R4)/(1+R4))
180 R6=SQR(R5)
185 A(K,7)=ATN(R6)*(180/3.1416)
190 NEXT K
195 RETURN
200 FOR P=1 TO 45
205 OUT128,180
210 FOR I=0 TO VA:NEXT I
220 OUT128,164
225 NEXT P
230 RETURN
235 FOR J0=1 TO NP
240 OUT128,45
245 FOR I=0 TO NF:NEXT I
250 OUT128,44
255 NEXT J0
260 RETURN
300 FOR J=2 TO 5
310 GOSUB2180
315 A(K,J)=C
320 GOSUB200
325 NEXT J
330 RETURN
400 OUT137,207:OUT137,0:OUT136,0
401 OUT139,207:OUT139,0:OUT138,0
405 PRINT"PREPARAR O PLOTTER."
408 PRINT"COLOQUE PAPEL, AJUSTE A EXPANSAO DE ESCALA, BAIXE A PENA."
410 INPUT"DESEJA GRAFICO DE ROTACAO OTICA(S/N)";O$
411 IF O$="S" OR O$="s" THEN 415 ELSE 420
415 J=6:GOTO431
420 INPUT"DESEJA GRAFICO DA ELIPTICIDADE(DC)(S/N)";D$
421 IF D$="S" OR D$="s" THEN 425 ELSE 160
425 J=7
431 INPUT"DESEJA AJUSTAR X,Y(S/N)";X$
432 IF X$="S" OR X$="s" THEN 433 ELSE 443
433 INPUT"ENTRE X MINIMO,X MAXIMO";X1,X2
434 INPUT"ENTRE Y MINIMO,Y MAXIMO";Y1,Y2
435 GOTO450
443 X1=A(1,1):X2=A(1,1):Y1=A(1,J):Y2=A(1,J)
444 FOR K=1 TO NN
445 IF A(K,1)<X1 THEN X1=A(K,1)
446 IF A(K,1)>X2 THEN X2=A(K,1)
447 IF A(K,J)<Y1 THEN Y1=A(K,J)
448 IF A(K,J)>Y2 THEN Y2=A(K,J)
449 NEXT K
450 K=1:IF E$="S" OR E$="s" THEN GOSUB700
451 Z1=(A(K,1)-X1)/(X2-X1):I1=ABS(Z1):V1=INT(250*I1)
453 GOSUB900
455 Z2=(A(K,J)-Y1)/(Y2-Y1):I2=ABS(Z2):V2=INT(250*I2)
456 GOSUB950
460 IF K=NN THEN 470 ELSE 465
465 K=K+1:GOTO451
470 RETURN
500 VA=100:FOR K=1 TO 10
505 GOSUB 300
510 NEXT K
515 NN=10:FOR K=1 TO NN
520 GOSUB170
525 W1=W1+R3:W2=W2+R4
530 NEXT K
535 E1=W1/10:E2=W2/10
536 FOR K=1 TO NN
537 G1=G1+A(K,6):G2=G2+A(K,7)
538 NEXT K
539 ER=G1/10:EE=G2/10
540 PRINT"ERRO MEDIO NA D. R. 0=",ER

```

```

541 PRINT"ERRO MEDIO NO D. C=",EE
545 RETURN
700 PX=0:PY=0
705 OUT138,PX
710 FOR I=0 TO 330*VP:NEXT I
715 OUT136,MY
725 OUT136,0
728 FOR I=0 TO 330*VP:NEXT I
730 IF PX=250 THEN 740 ELSE 735
735 PX=PX+IX:GOTO 705
740 OUT138,0
745 OUT136,PY
750 FOR I=0 TO 330*VP:NEXT I
755 OUT138,MX
765 OUT138,0
768 FOR I=0 TO 330*VP:NEXT I
770 IF PY=250 THEN 780 ELSE 775
775 PY=PY+IY:GOTO 745
780 OUT136,0
790 RETURN
900 OUT138,V1
920 RETURN
950 OUT136,V2
970 RETURN
1000 PRINT"PROGRAMA TESTE PARA OBTENCAO DA EXTINCAO."
1001 OUT129,207:OUT129,0
1002 INPUT"VELOCIDADE,TEMPO";VL, TM
1003 FOR K=1 TO 45
1004 OUT128,176
1005 FOR I=0 TO VL:NEXT I
1006 OUT128,160
1007 NEXT K
1008 FOR I=0 TO TM:NEXT I
1009 GOTO1003
1010 CLS
1015 PRINT"PROGRAMA PARA TESTE NR02"
1020 INPUT"VELOCIDADE,TEMPO";VE, TE
1025 OUT129,207:OUT129,0
1030 FOR K=1 TO 3
1035 GOSUB1065
1040 NEXT K
1045 FOR K=1 TO 3
1050 GOSUB1120
1055 NEXT K
1060 GOTO1030
1065 OUT128,240:OUT128,224
1070 FOR J=1 TO 45
1085 OUT128,176:OUT128,160
1090 FOR I=0 TO VE:NEXT I
1100 NEXT J
1105 FOR I=0 TO TE:NEXT I
1110 RETURN
1120 OUT128,208:OUT128,192
1125 FOR J=1 TO 45
1130 OUT128,144:OUT128,128
1135 FOR I=0 TO VE:NEXT I
1140 NEXT J
1150 RETURN

```

```
2180 CC=0
2190 FOR I=1 TO M
2200 OUT133,207:OUT133,15:A0=INP(132)
2210 OUT133,207:OUT133,240:A1=INP(132)
2220 OUT135,207:OUT135,15:B0=INP(134)
2230 OUT135,207:OUT135,16:B1=INP(134)
2240 CM=B1/16+0.1*B0+0.01*A1/16+0.001*A0
2241 CC=CC+CM
2243 NEXT I
2245 C=CC/M
2250 RETURN
```

PROGRAMA PARA OBTENÇÃO DA ABSORBÂNCIA

```

5 CLS
8 U$="#. ###":V$="###. #"
10 DIM A(256,5)
15 PRINT"PROGRAMA PARA OBTENCAO DA ABSORBANCIA. "
25 INPUT"QUANTAS MEDIAS DESEJA TIRAR";M
40 INPUT"VELOCIDADE DE VARREDURA";NF
45 INPUT"NUMERO DE PASSOS";NP
50 INPUT"LAMBDA INICIAL,LAMBDA FINAL";LI,LF
60 INPUT"COLOCOU REFERENCIA(S/N)";B#
61 IF B#="S" OR B#="s" THEN 70 ELSE 60
70 OUT129,207:OUT129,0:OUT128,96
80 DLB=NP/2.6:LB=LI:K=1
90 GOSUB 2180
100 A(K,1)=LB:A(K,3)=0
110 K=K+1:GOSUB 500
120 LB=LB+DLB
130 A(K,1)=LB
140 GOSUB 2180
150 A(K,3)=0
160 IF LB>=LF THEN 165 ELSE 110
165 NN=K
170 OUT128,96
180 INPUT"COLOCOU A AMOSTRA(S/N)";T#
181 IF T#="S" OR T#="s" THEN 190 ELSE 180
190 LD=LB
200 FOR J=1 TO NP
205 OUT128,110
207 OUT128,111
210 FOR V=0 TO 23:NEXT V
215 OUT128,110
220 NEXT J
230 LD=LD-DLB
240 IF LD>LI THEN 200
250 OUT128,96
260 PRINT"VERIFIQUE SE O MONOCROMADOR ESTA NA POSICAO INICIAL. "
265 INPUT"CASO NAO ESTEJA COLOQUE-0. PODEMOS MEDIR(S/N)";F#
270 IF F#="S" OR F#="s" THEN 290 ELSE 260
290 GOSUB 2180
300 A(1,2)=0
310 FOR K=2 TO NN
320 GOSUB 500
330 GOSUB 2180
340 A(K,2)=0
350 NEXT K
355 OUT128,96
370 PRINT"LAMBDA          I          10"
380 FOR K=1 TO NN
390 FOR J=1 TO 2:PRINT A(K,J):NEXT J
400 PRINT
405 NEXT K
406 PRINT"NUMERO TOTAL DE PONTOS=",NN
407 GOSUB 500
408 INPUT"DESEJA TABELA(S/N)";P#
409 IF P#="S" OR P#="s" THEN GOSUB 625
410 INPUT"DESEJA GRAFICO(S/N)";G#
411 IF G#="S" OR G#="s" THEN GOSUB 425

```

```

415 INPUT"DESEJA REIMPRIMIR(S/N)";R$
416 IF R$="S" OR R$="s" THEN 425 ELSE 417
417 INPUT"DESEJA NOVO ESPECTRO(S/N)";N$
418 IF N$="S" OR N$="s" THEN 420 ELSE 423
420 INPUT"A MESMA REFERENCIA";M$
421 IF M$="S" OR M$="s" GOTO 170 ELSE 25
423 END
425 OUT137,207:OUT137,0:OUT136,0
426 OUT139,207:OUT139,0:OUT138,0
428 PRINT"PREPARE O PLOTTER."
430 INPUT"DESEJA TRACAR OS EIXOS(S/N)";E$
431 IF E$="S" OR E$="s" THEN GOSUB700
432 INPUT"DESEJA GRAFICO DE 1-ABSORBANCIA OU 2-TRANSMITANCIA";D
433 IF D=1 THEN J=4 ELSE J=5
434 Y1=A(1,J):Y2=A(1,J)
435 FOR K=1 TO NN
436 IF A(K,J)<Y1 THEN Y1=A(K,J)
437 IF A(K,J)>Y2 THEN Y2=A(K,J)
438 NEXT K
439 PRINT"Y-MINIMO=";Y1
440 PRINT"Y-MAXIMO=";Y2
441 INPUT"DESEJA AJUSTAR Y(S/N)";X$
442 IF X$="N" OR X$="n" THEN 444
443 INPUT"ENTRE YMINIMO, YMAXIMO";Y1,Y2
444 IF A(1,J)>Y2 THEN A(1,J)=Y2
445 IF A(1,J)<Y1 THEN A(1,J)=Y1
446 V1=0:Z2=(A(1,J)-Y1)/(Y2-Y1):V2=INT(250*Z2)
447 GOSUB900
448 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
449 FOR K=2 TO NN
450 IF A(K,J)>Y2 THEN A(K,J)=Y2
451 IF A(K,J)<Y1 THEN A(K,J)=Y1
453 Z1=(A(K,1)-LI)/(LF-LI):V1=INT(200*Z1)
455 Z2=(A(K,J)-Y1)/(Y2-Y1):V2=INT(250*Z2)
456 GOSUB900
458 FOR I=0 TO 2000:NEXT I
460 NEXT K
470 RETURN
500 FOR J=1 TO NP
505 OUT128,108
510 OUT128,109
520 FOR I=0 TO NF:NEXT I
525 OUT128,108
530 NEXT J
540 OUT128,100
545 RETURN
600 FOR K=1 TO NN
605 X=A(K,2)/A(K,3)
608 A(K,5)=X
610 A(K,4)=-0.4343*LOG(X)
615 NEXT K
620 RETURN
625 INPUT"1-ABSORBANCIA OU 2-TRANSMITANCIA";T
627 IF T=1 THEN J=4 ELSE J=5
629 IF J=5 THEN LPRINT"LAMBDA TRANSMITANCIA":GOTO635
630 LPRINT"LAMBDA ABSORBANCIA"

```

```

635 FOR K=1 TO NN
636 Z=INT(K/4):IF(K-4*Z)=0 THEN 540
638 LPRINT"      ":LPRINTUSINGV$;A(K,1):LPRINT"      "
      :LPRINTUSINGU$;A(K,J):LPRINT"      ":GOTO645
640 LPRINT"      ":LPRINTUSINGV$;A(K,1):LPRINT"      "
      :LPRINTUSINGU$;A(K,J)
645 NEXT K
650 RETURN
700 PX=0:PY=0
705 OUT138,PY
710 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
715 OUT136,100
725 OUT136,0
728 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
730 IF PX=200 THEN 740 ELSE 735
735 PX=PX+40:GOTO 705
740 OUT138,0
742 INPUT"ESPERE A PENA VOLTAR A X=0 E APERTE NEW LINE":K$
745 OUT136,PY
750 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
755 OUT138,100
765 OUT138,0
768 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
770 IF PY=250 THEN 780 ELSE 775
775 PY=PY+50:GOTO 745
780 OUT136,0
790 RETURN
900 OUT138,V1:OUT136,V2
920 RETURN
2180 CC=0
2190 FOR I=1 TO M
2200 OUT133,207:OUT133,15:A0=INP(132)
2210 OUT133,207:OUT133,240:A1=INP(132)
2220 OUT135,207:OUT135,15:B0=INP(134)
2230 OUT135,207:OUT135,16:B1=INP(134)
2240 CM=B1/16+0.1*B0+0.01*A1/16+0.001*A0
2241 CC=CC+CM
2243 NEXT I
2245 C=CC/M
2250 RETURN

```

OUTROS PROGRAMAS:

PARA OBTENÇÃO DE CINÉTICA

```
10 CLS
15 OUT129,207:OUT129,0:OUT129,95
20 U$="##. ##":V$="###. #"
25 DIMA(256,4)
30 PRINT"PROGRAMA PARA OBTENÇÃO DE CINÉTICA."
35 INPUT"INTERVALO DE TEMPO(EM MINUTOS)":T
40 INPUT"NUMERO DE PONTO":NP
45 IF(T*NP)>200THENPRINT"ERRO-VALOR SUPERIOR AO LIMITE":GOTO35
50 TE=0
55 FORK=1TONP
60 GOSUB2200
65 A(K,2)=0:A(K,1)=TE
70 FORI=0TO22000+T:NEXTI
75 TE=TE+T
80 NEXTK
85 FORK=1TONP
90 A(K,3)=A(K,2)/A(K,1,2)
95 A(K,4)=0.4343*LOG(A(K,3))
100 NEXTK
105 INPUT"DESEJA TABELA(S/N)":T$
110 IFT$="S"THENGOSUB630
115 INPUT"DESEJA GRAFICO(S/N)":G$
120 IFG$="S"THENGOSUB425
125 INPUT"DESEJA REIMPRIMIR":R$
130 IFR$="S"THENGOSUB425
135 END
425 OUT137,207:OUT137,0:OUT136,0
426 OUT139,207:OUT139,0:OUT138,0
428 PRINT"PREPARE O PLOTTER."
430 INPUT"DESEJA TRACAR OS EIXOS(S/N)":E$
431 IF E$="S" OR E$="N" THEN GOSUB700
432 INPUT"DESEJA GRAFICO DA 1-RAZÃO(I(T)/I(0))
      OU 2-DIFERENÇA(ABS(0)-ABS(T))":N
433 IFN=1THENJ=3ELSEJ=4
434 Y1=A(1,J):Y2=A(1,J)
435 FOR K=1 TO NP
436 IF A(K,J)<Y1 THEN Y1=A(K,J)
437 IF A(K,J)>Y2 THEN Y2=A(K,J)
438 NEXT K
439 PRINT"Y-MINIMO=";Y1
440 PRINT"Y-MAXIMO=";Y2
441 INPUT"DESEJA AJUSTAR Y(S/N)":X$
442 IF X$="N" OR X$="N" THEN446
443 INPUT"ENTRE YMINIMO, YMAXIMO":Y1,Y2
446 V1=0:Z2=(A(1,J)-Y1)/(Y2-Y1):V2=INT(250*Z2)
447 GOSUB900
448 FORI=0TO6600:NEXTI
449 FORK=2TONP
453 Z1=A(K,1)/A(NP,1):V1=INT(200*Z1)
455 Z2=(A(K,J)-Y1)/(Y2-Y1):V2=INT(250*Z2)
456 GOSUB900
458 FOR I=0 TO 2000:NEXT I
460 NEXT K
470 RETURN
```

```

630 INPUT"DESEJA TABELA DA 1-RAZAO(I(T)-I(O)
      OU 2-DIFERENCA(ABS(O)-ABS(T))":T
631 IFT=1THENJ=ELSEJ=4
632 IFJ=3THENLPRINT"RAZAO I(T)/I(O)":GOTO635
634 LPRINT"DIFERENCA ABS(O)-ABS(T)"
635 FOR K=1 TO NP
636 Z=INT(K/4):IF(K-4*Z)=0 THEN 640
638 LPRINT"      ":LPRINTUSINGV$;A(K,1):LPRINT"      "
      :LPRINTUSINGU$;A(K,J):LPRINT"      "
640 LPRINT"      ":LPRINTUSINGV$;A(K,1):LPRINT"      ":LPRINTUSINGU$;A(K,J)
645 NEXT K
650 RETURN
700 PX=0:PY=0
705 OUT138,PX
710 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
715 OUT136,100
725 OUT136,0
728 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
730 IF PX=200 THEN 740 ELSE 735
735 PX=PX+40:GOTO 705
740 OUT138,0
742 INPUT"ESPERE A PENA VOLTAR A X=0 E APERTE NEW LINE":K$
745 OUT136,PY
750 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
755 OUT138,100
765 OUT136,0
768 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
770 IF PY=250 THEN 780 ELSE 775
775 PY=PY+50:GOTO 745
780 OUT136,0
790 RETURN
900 OUT138,V1:OUT136,V2
920 RETURN
2200 OUT133,207:OUT133,15:A0=INP(132)
2210 OUT133,207:OUT133,240:A1=INP(132)
2220 OUT135,207:OUT135,15:B0=INP(134)
2230 OUT135,207:OUT135,16:B1=INP(134)
2240 C=B1/16+0.1*B0+0.01*A1/16+0.001*A0
2250 RETURN

```


PARA OBTENÇÃO DE GRÁFICO

```

5 DIMX(256),Y(256)
8 U$="##. ##":V$="###. #"
10 CLS
20 PRINT"PROGAMA PARA OBTENCAO DE GRAFICO"
30 INPUT"ENTRE NUMERO DE PONTOS":N
40 INPUT"ENTRE X-INICIAL E X-FINAL":XI,XF
50 FORT=1TON
60 PRINT:INPUT"ENTRE X,Y":X(T),Y(T)
70 NEXTT
80 INPUT"DESEJA CORRIGIR PONTOS(S/N)":C$
90 IF C$="N" THEN 408 ELSE INPUT"QUAL O NUMERO":J
100 FORT=1TON
110 IF T=J THEN PRINT"ANTIGOS VALORES DE X=":X(T):PRINT"Y=":Y(T):GOTO130
120 NEXTT
130 INPUT"ENTRE NOVOS VALORES DE X,Y":X(T),Y(T)
140 GOTO80
408 INPUT"DESEJA TABELA(S/N)":P$
409 IF P$="S" OR P$="s" THEN GOSUB 630
410 INPUT"DESEJA GRAFICO(S/N)":G$
411 IF G$="S" OR G$="s" THEN GOSUB425
415 INPUT"DESEJA REIMPRIMIR(S/N)":R$
416 IF R$="S" OR R$="s" THEN 425 ELSE 423
423 END
425 OUT127,207:OUT137,0:OUT136,0
426 OUT139,207:OUT139,0:OUT138,0
428 PRINT"PREPARE O PLOTTER."
430 INPUT"DESEJA TRACAR OS EIXOS(S/N)":E$
431 IF E$="S" OR E$="s" THEN GOSUB700
434 Y1=Y(1):Y2=Y(1)
435 FOR K=1 TO N
436 IF Y(K)<Y1 THEN Y1=Y(K)
437 IF Y(K)>Y2 THEN Y2=Y(K)
438 NEXT K
439 PRINT"Y-MINIMO=":Y1
440 PRINT"Y-MAXIMO=":Y2
441 INPUT"DESEJA AJUSTAR Y(S/N)":X$
442 IF X$="N" OR X$="n" THEN446
443 INPUT"ENTRE YMINIMO, YMAXIMO":Y1,Y2
445 V1=0:Z2=(Y(1)-Y1)/(Y2-Y1):V2=INT(250+Z2)
447 GOSUB900
448 FORI=0TO6500:NEXTI
449 FORK=2TON
453 Z1=(X(K)-XI)/(XF-XI):V1=INT(200+Z1)
455 Z2=(Y(K)-Y1)/(Y2-Y1):V2=INT(250+Z2)
456 GOSUB900
458 FOR I=0 TO 2000:NEXT I
460 NEXT K
470 RETURN
635 FOR K=1 TO NN
636 Z=INT(K/4):IF(K-4*Z)=0 THEN 640
638 LPRINT" ":LPRINTUSINGV$:X(K):LPRINT" "
      :LPRINTUSINGV$:Y(K):LPRINT" ":GOT
640 LPRINT" ":LPRINTUSINGV$:X(K):LPRINT" ":LPRINTUSINGV$:Y(K)
645 NEXT K
650 RETURN

```

```
700 PX=0:PY=0
705 OUT138,PX
710 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
715 OUT136,100
725 OUT136,0
728 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
730 IF PX=200 THEN 740 ELSE 735
735 PX=PX+40:GOTO 705
740 OUT138,0
742 INPUT"ESPERE A PENA VOLTAR A X=0 E APERTE NEW LINE":K#
745 OUT136,PY
750 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
755 OUT138,100
765 OUT138,0
768 FOR I=0 TO 6600:NEXT I
770 IF PY=250 THEN 780 ELSE 775
775 PY=PY+50:GOTO 745
780 OUT136,0
790 RETURN
900 OUT138,V1:OUT136,V2
920 RETURN
```

BIBLIOGRAFIA

1. VELLUZ, L.; LEGRAND, M. Optical Circular Dichroism - Principles, Measurements, and Applications - 1a. edição. Academic Press Inc (London, 1965).
2. SNATZKE, G.; ECKHARDT, G. - Experimental Methods in Biophysical Chemistry - cap. 3, 67-132. Editor Claude Nicolau - John Wiley Sons. Bristol (1973).
3. SHECHTER, E. e BLOUT, E.R. - Proc. Natl. Acad. Sci-US- 51 695 - 702 (1965).
4. BEYCHOK, S. - Science, vol. 154, 1288-1299 (1966).
5. LEVINE, I.N. - Química Cuántica - cap. 12 - p.332 - Editorial AC, libros científicos y técnicos - Madrid - Espanha (1977).
6. KAUZMANN, W. - Quantum Chemistry - Academic Press Inc. N. York (1957).
7. JIRGERSON, B. - Optical Activity of Protein and other Macromolecules. 2a. ed. New York. Springer-Verlag - 1973 (Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, 5).
8. MOFFIT, W. - The Journal of Chemical Physics - Vol. 25, nº 3 - 467 - 478 (1956).
9. SHECHTER, E.; BLOUT, E.R. - II - Proc. Natl. Acad. Sci. - US 51, 794-800 (1964).

10. SHECHTER, E.; CARVER, J.P.; BLOUT, E.R. - III - Proc. Natl. Acad. Sci.-US. 51, 1029-1036 (1964).
11. CARVER, J.P.; SHECHTER, E.; BLOUT, E.R. - IV - Journal of the American Chemistry Society - 88:11 - 2550 - 25-1 (1966).
12. CARVER, J.P.; SHECHTER, E.; BLOUT, E.R. - V - Journal of the American Chemistry Society - 88:11 - 2562-2673 (1966).
13. GREENFIELD, N.; FASMAN, G.D. - Biochemistry - 8, 4108-4116 (1969).
14. GREENFIELD, N.; DAVIDSON, B.; FASMAN, G.D. - Biochemistry 6, 1630 (1967).
15. WOODY, R.W. - J. Polymer Sci. Macromolecular Reviews, 12, 181-321 (1977).
16. QUADRIFOGLIO, F. - Second Summer College in Biophysics - International Centre for Theoretical Physics - Trieste (1984).
17. CARROLL, B.; BLEI, I. - Science, 142, 200-208 (1963).
18. ORIEL - Photomultiplier - Photodiode Detection System (Manual) - ORIEL Corporation of America - USA.
19. BAUSCH-LOMB - Instructions High Intensity Grating Monocromator - 2a. edição - USA.
20. HECHT, E.; ZAJAC, A. - OPTICS - 1a. edição - Addison - Wesley Publishing Company, INC. Cap. 4 p. 77 (1974).

21. SHURCLIFF, W.A. - Polarized Light: Production and Use -
Harward University Press, Cambridge (1962).
22. AZZAM, R.M.A.; BASHARA, N.M. - Ellipsometry and Polarized
Light - Holland Publishing Company, Netherlands - 1977.
23. RUDOLPH, H. - Journal of the Optical Society of America, 45,
50-59 (1955).
24. DIGEMEC - Equipamento Eletro-Mecânicos Digitais Ltda. Caracte -
rísticas dos Motores de Passo com Rotor de Ferrita Tubular -
São Carlos - SP.
25. Technical Manual - MK 3881 - Z80 PIO Microcomputer Divices -
New England - Technical Sales Corporation - Burlington -
Publicado por MOSTEK CORP. com a permissão de ZILOG, Inc.
USA - 1978.
26. MOTOROLA INC - Semiconductor Data Library - Linear Intergrated
Circuits, Vol. 6/série B, p. 5.54, 5.62, Motorola Semiconduct
tor Products Inc. USA - 1976.
27. Technical Manual - MK 3880 - Central Processing Unit - Z80 -
Microcomputer Devices - New England Technical Sales
Corporation. Burlington - Publicado por MOSTEK CORP. com a
permissão de ZILOG, Inc. USA - 1978.
28. ANTONINI, E.; BRUNORI, M. - Hemoglobin and Myoglobin in their
Reactions with Ligands - North - Holland Publishing Company -
Amsterdam - p. 19 (1971) - Netherlands (serie Frontiers of
Biology - 21).

29. LEWIS, J.W.; TILTON, R.F.; EINTERZ, C.M.; MILDER, S.J.;
KUNTZ, I.D.; KLIZER, D.S. - J. Phys. Chem. 89, 289-294
(1985).
30. WEAST, R.C. - CRC Handbook of Chemistry and Physics - CRS
Press, Inc. - 59a. edição - p. E. 382 - USA (1978-1979).
- 31: BORN, M.; WOLF, E. - Principles of Optics - Eletromagnetic
Theory of Propagation Interference and Diffraction of
Light - Permamon Press - 6a. edição - 1980 - Great
Britain.
32. BUDDE, W. - Stability of High-Pressure Xenon Lamps, J. Opt.
Soc. Am., 52, 343-345 (1962).