

2

**ANACROM – PROGRAMA
COMPUTACIONAL PARA A ANÁLISE DE CROMATOGRAMAS**

Antonio Soares de Gouvêa e Carlos Henrique de Mesquita

INFORMAÇÃO IPEN 5 IPEN - Inf - 5	JANEIRO/1981
---	---------------------

CONSELHO DELIBERATIVO

MEMBROS

Dr. Luiz Cintra do Prado – Presidente

Dr. Edgardo Azevedo Soares Júnior – Vice-Presidente

CONSELHEIROS

Dr. Hécio Modesto de Costa

Dr. Ivano Humbert Marchesi

Dr. Admar Cervellini

Dr. Waldyr Muniz Olive

REPRESENTANTES

Dr. Jacob Charcot Pereira Rios

Dr. Paolo Enrico Maria Zaghen

SUPERINTENDENTE

Hermani Augusto Lopes de Amorim

**ANACROM – PROGRAMA
COMPUTACIONAL PARA A ANÁLISE DE CROMATOGRAMAS**

**Antonio Soares de Gouvêa
CENTRO DE PROCESSAMENTO DE DADOS – CPD**

**Carlos Henrique de Mesquita
CENTRO DE APLICAÇÕES BIOMÉDICAS DE RADIOISÓTOPOS E RADIAÇÕES – CABRR**

Série INFORMAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

F51

COMPUTER CODE: Programming

CHROMATOGRAPHY: Peaks

DATA PROCESSING: Data compilation

RADIATION DETECTION: Spectrometers

GAUSS FUNCTION: Least square fit

LEAST SQUARE FIT: Gauss function

RADIOIMMUNOASSAY: Labelled compounds

LABELLED COMPOUNDS: Radiopharmaceuticals

MATHEMATICAL MODELS: Statistical models

SPECTRA UNFOLDING: Multi-parameter analysis

CPD - AP 9

Aprovada para publicação em Dezembro/1980.

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade dos Autores.

ÍNDICE

	Página
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – PESQUISA DE PICOS E CÁLCULO DO RUÍDO DE FUNDO	2
2.1 – Determinação do Ruído de Fundo.....	2
2.2 – Localização dos Picos.....	2
2.3 – Teste de Significância.....	3
3 – INFORMAÇÕES SOBRE O PROCESSO DE AJUSTE	4
3.1 – Descrição das funções de Ajuste	4
3.2 – Limites do Intervalo de Ajuste	6
3.3 – Método dos Mínimos Quadrados não Linear	6
3.4 – Estimativa Inicial dos Parâmetros de Ajuste	8
3.5 – Cálculo das Áreas	8
3.6 – Análise Estatística	9
4 – DESCRIÇÃO DOS VALORES PRÉ-DEFINIDOS E DADOS DE ENTRADA	9
4.1 – Valores Pré-definidos.....	9
4.2 – Dados de Entrada.....	10
4.2.1 – Cartão Título.....	10
4.2.2 – Modificação das Pré-definições	10
4.2.2.1 – Modelo	11
4.2.2.2 – Ajuste.....	11
4.2.2.3 – Pesquisa.....	11
4.2.2.4 – Teste.....	11
4.2.2.5 – Parâmetros.....	11
4.2.2.6 – Ruído.....	12
4.2.2.7 – Gráfico	12
4.2.2.8 – Exemplo de Modificação das Pré-definições	12
4.2.3 – Valores Observados.....	13
4.2.4 – Intervalo de Ajuste e Estimativas Iniciais.....	13
5 – EXEMPLOS	16
5.1 – Exemplo 1 – Pesquisa e Ajuste de Picos com Gaussianas Simples.....	16
5.1.1 – Descrição e Análise do Ensaio.....	16
5.1.2 – Dados de Entrada	16
5.1.3 – Resultados.....	16
5.2 – Exemplo 2 – Ajuste com Gaussianas Simples, Picos Distintos	22
5.2.1 – Descrição e Análise do Ensaio.....	22
5.2.2 – Dados de Entrada	22
5.2.3 – Resultados.....	23

	Página
5.3 – Exemplo 3 – Ajuste com Gaussianas Modificadas à Esquerda. Picos Distintos.....	28
5.3.1 – Descrição e Análise do Ensaio.....	28
5.3.2 – Dados de Entrada	28
5.3.3 – Resultados.....	28
5.4 – Exemplo 4 – Ajuste com Gaussianas Modificadas à Direita. Picos Sobrepostos.....	34
5.4.1 – Descrição e Análise do Ensaio.....	34
5.4.2 – Dados de Entrada	34
5.4.3 – Resultados.....	36
 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 40

ANACROM – PROGRAMA COMPUTACIONAL PARA A ANÁLISE DE CROMATOGRAMAS

Antonio Soares de Góes* e Carlos Henrique de Mesquita**

RESUMO

O programa ANACROM foi desenvolvido para pesquisa automática de picos e avaliação de parâmetros de cromatogramas tais como: centro, altura, área, largura à meia altura (FWHM) e razão FWHM/Centro de cada pico.

1 – INTRODUÇÃO

Na rotina dos laboratórios modernos desenvolvem-se constantemente experimentos que incluem a purificação, separação ou fracionamento de substâncias. Com muita frequência esse objetivo é alcançado com processos que geram um cromatograma. Nesses casos provavelmente há necessidade do conhecimento da área relativa de cada pico, sua real posição, largura à meia altura (FWHM) e a capacidade de resolução do sistema cromatográfico para discriminar cada composto. Essas informações tornam-se de difícil obtenção quando os picos cromatográficos se mostram parcialmente sobrepostos.

O sistema ANACROM, aqui proposto, é um programa computacional, desenvolvido com o objetivo precípuo de auxiliar a análise de cromatogramas. Sua estrutura efetua opcionalmente a pesquisa automática inicial dos parâmetros de cada pico e a partir dessas estimativas evolui para o cálculo iterativo mais exato dos parâmetros.

A pesquisa automática está baseada no conceito da variação do sinal da derivada primeira, calculada de acordo com o método de SAVITZKY e GOLAY^(1,2). Os pseudo picos eventuais são eliminados pelo critério do teste 't' de STUDENT. Antes da execução do ajuste, o ruído de fundo do cromatograma (valor admitido como sendo constante) é subtraído dos dados experimentais.

A função analítica ajustada ao cromatograma tem a forma geral $y = \sum_{i=1}^n G_i(x)$ onde x é um número representativo da amostragem tubo, submúltiplo do volume, etc. $G(x)$ é uma função Gaussiana simples ou modificada à esquerda ou à direita por um termo exponencial e n é o número de picos parcialmente sobrepostos.

O ajuste de dados utiliza o método dos mínimos quadrados não linear de MARQUARDT-BEVINGTON⁽²⁾.

O sistema oferece ao usuário três gráficos: a) valores experimentais e preditos versus o número da observação (x), b) resíduos versus o número da observação e c) gráfico probabilístico dos resíduos. Esses três gráficos tem a finalidade de fornecer recursos para a avaliação qualitativa do ajuste.

O sistema ANACROM diferencia-se de outros programas^(1,5,11) semelhantes, todos realizados no campo da análise de espectros gama, nos seguintes pontos:

– inclusão do modelo Gaussiana modificada à direita por um termo exponencial. Esse

(*) CPD – Área de Pesquisas

(**) CABRR – Área de Aplicações Médicas de Radioisótopos e Radiações

modelo mostrou-se necessário para cromatogramas sendo inexistente em programas desenvolvidos para análise de espectros gama.

- inclusão de informações estatísticas sobre o processo de ajuste por mínimos quadrados não linear com a impressão de quadro contendo a soma de quadrados e quadrados médios devido ao modelo escolhido e resíduos.
- inclusão do gráfico dos resíduos e gráfico probabilístico (probita contra resíduo) que são elementos importantes na análise do resultado do processo de ajuste.
- reunião de três modelos (gaussiana simples e gaussiana modificada à esquerda e à direita) num mesmo programa.
- possibilidade de execução em separado de cada uma das seguintes ações: pesquisa de picos, ajuste de picos, pesquisa e ajuste de picos, gráfico do cromatograma.

O exame do gráfico dos resíduos permite a avaliação da uniformidade da variância (homocedasticidade). A não constância da variância (heterocedasticidade) pode indicar a inadequacidade do modelo ou a necessidade do emprego de ajuste ponderado⁽⁴⁾. O gráfico dos resíduos leva ainda a identificação de observações que pelo valor discrepante do resíduo devem receber atenção especial. A inspeção do gráfico probabilístico permite verificar se os resíduos têm ou não distribuição normal.

2 – PESQUISA DE PICOS E CÁLCULO DO RUÍDO DE FUNDO

2.1 – Determinação do Ruído de Fundo

O ruído de fundo (BG) é suposto constante para todo o cromatograma, sendo calculado pela expressão:

$$BG = \sum_{i=1}^P y_i / P \quad (1)$$

com

$$y_{min} \leq y_i \leq y_{min} + 2 \sqrt{y_{min}}$$

onde y_{min} é o menor valor observado do cromatograma.

O cálculo do ruído de fundo é opcional. Quando não for determinado pelo programa, o usuário deve fornecer o seu valor.

2.2 – Localização dos Picos.

Após a correção do ruído de fundo é inicializado o processo da procura de picos por meio da variação do sinal (positivo, negativo, positivo) da derivada primeira calculada em cada ponto do cromatograma^(1,4). Para o cálculo da derivada primeira é empregado o método de SAVITZKY e GOLAY⁽¹²⁾. É usada uma função polinomial de convolução e, para cada grupo de $2m + 1$ pontos, (m inteiro e par), o polinômio toma o valor do ponto central.

No trabalho de SAVITZKY e GOLAY constata-se que o cálculo da derivada primeira em cada ponto é dado por:

$$s = 1/N \sum_{r=-m}^{r=m} k_r y_r \quad (2)$$

onde:

Y_r = valor correspondente a r -ésima observação

k_r = r -ésimo elemento do conjunto de $2m + 1$ números inteiros cujos valores dependem de m e do grau do polinômio de convolução usado.

N = fator de normalização.

No programa ANACROM é usada a convolução de cinco pontos ($m = 2$) associada ao polinômio de segunda ordem ($n = 2$) correspondendo ao conjunto k os seguintes valores: -2, -1, 0, 1, 2. É considerado como início do pico o ponto central do grupo de cinco pontos onde o sinal da derivada primeira passa de negativo para positivo. O último ponto do pico corresponde ao ponto central do grupo onde o sinal da derivada primeira passa novamente de negativo para positivo.

2.3 – Teste de Significância

Para a eliminação de picos não significativos é empregado o método descrito por BARNES⁽¹⁾, que consiste em testar o valor de D .

$$D = s_{\max} - s_{\min} \quad (3)$$

usando-se o teste de STUDENT com

$$t = D/s \quad (4)$$

onde s é o erro padrão de D .

Das equações (2) e (3) segue que:

$$D = 1/N \left[\left(\sum_{r=-m}^m k_r y_r \right)_{\max} - \left(\sum_{r=-m}^m k_r y_r \right)_{\min} \right] \quad (5)$$

Numa primeira aproximação, supõe-se que os valores observados (y_r) satisfaçam a distribuição de POISSON. Embora essa hipótese seja desprovida de maior fundamentação teórica, permite dispor de um critério aproximativo capaz de eliminar do processo uma fração apreciável de picos espúrios. Com essa hipótese, a variância em cada ponto é igual a:

$$\sigma_r^2 = y_r$$

e o erro padrão s de D é dado por:

$$s = 1/N \left[\left(\sum_{r=-m}^m k_r^2 y_r \right) + \left(\sum_{r=-m}^m k_r^2 y_r \right) \right]^{1/2} \quad (6)$$

BARNES⁽¹⁾, baseado na hipótese da nulidade de 'D' sugere que o valor de 'Y' calculado pela expressão (4) supere o valor crítico '4' para que o pico seja considerado como estatisticamente significativo.

3 – INFORMAÇÕES SOBRE O PROCESSO DE AJUSTE

3.1 – Descrição das Funções de Ajuste

Para o ajuste dos picos o programa dispõe da função gaussiana e da função gaussiana modificada pela inclusão de uma parte exponencial conforme descrita por LEDERER⁽²⁾ e usada por FELAWKA⁽⁴⁾.

a) Gaussiana Simples

$$y_i = a_1 \exp [-a_{1+2} (x_i - a_{1+1})^2] \quad (7)$$

onde:

a_1 = altura da gaussiana

a_{1+1} = centro da gaussiana

a_{1+2} = parâmetro relacionado com a dispersão da gaussiana

$$a_{1+2} = 1/2(\sigma^2) = 4\ln(2) / (L_y)^2$$

sendo L_y a largura à meia altura da gaussiana.

b) Gaussiana Modificada à Direita

Para a gaussiana com o centro em a_{1+1} tem-se:

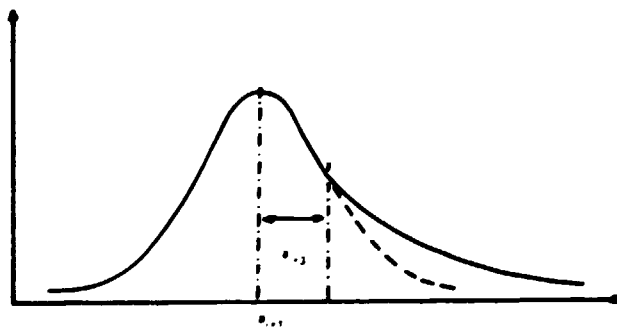


Figura 1 – Gaussiana modificada à direita

$$y_i = a_i \exp[-a_{i+2} (x_i - a_{i+1})^2] \quad \text{para } x_i < a_{i+1} + a_{i+3} \quad (9)$$

$$y_i = a_i \exp[a_{i+2} a_{i+3} (a_{i+3} - 2x_i - 2a_{i+1})] \quad \text{para } x_i > a_{i+1} + a_{i+3}$$

onde a_{i+3} é a posição do termo exponencial à direita do centro (Figura 1).

c) Gaussiana Modificada à Esquerda

Para a gaussiana com o centro em a_{i+1} tem-se

$$y_i = a_i \exp[-a_{i+2} (x_i - a_{i+1})^2] \quad \text{para } x_i > a_{i+1} - a_{i+3} \quad (10)$$

$$y_i = a_i \exp[a_{i+2} a_{i+3} (a_{i+3} + 2x_i - 2a_{i+1})] \quad \text{para } x_i < a_{i+1} - a_{i+3}$$

onde a_{i+3} é a posição do termo exponencial à esquerda do centro.

3.2 – Limites do Intervalo de Ajuste

O início e o fim de cada pico são identificados pela variação do sinal da derivada primeira (negativo \rightarrow positivo). Dois picos são considerados sobrepostos quando o ponto inicial do segundo pico coincide com o último ponto do pico imediatamente anterior. O intervalo de ajuste inclui todos os picos sobrepostos sequencialmente. Cada intervalo de ajuste poderá conter de 1 a 5 picos.

O usuário pode prescindir de pesquisa automática de picos ficando sob sua responsabilidade a definição do intervalo de ajuste e número de picos sobrepostos.

Para um dado intervalo a função a ser ajustada é da forma:

$$y_i \text{ (calculado)} = \sum_{k=1}^{k=n} G_k(x_i) \quad (10)$$

onde:

G_k – gaussiana simples ou modificada

n – número de gaussianas sobrepostas ($n \leq 5$)

3.3 – Método dos Mínimos Quadrados não Linear

No ajuste da expressão (10) aos dados experimentais é empregado o método de mínimos quadrados não linear. A expressão (10) pode ser escrita na forma:

$$y_i = F(x_i, g) \quad (11)$$

onde g é o vetor dos parâmetros das gaussianas

$$\underline{a}^T = (a_1, a_2, \dots, a_p)$$

e procura-se minimizar a expressão:

$$Q = \sum_{i=1}^{I=m} [y_i - F(x_i, \underline{a})]^2 w_i \quad (12)$$

sendo:

y_i — valor correspondente à i-ésima observação

w_i — peso correspondente à observação y_i

m — número de pontos do intervalo de ajuste

Usando-se a fórmula de TAYLOR, a expressão (11) pode ser reescrita numa vizinhança da estimativa $\underline{a}' = (a'_1, a'_2, \dots, a'_p)$ do vetor \underline{a} :

$$y_i = F(x_i, \underline{a}') + \sum_{k=1}^{k=p} \left[\partial F(x_i, \underline{a}) / \partial a_k \right]_{a'_k} \Delta a_k \quad (13)$$

$$\Delta a_k = a'_k - a_k$$

desprezando-se os termos superiores à primeira ordem.

Substituindo-se (13) em (12) a expressão Q se torna linear em relação aos termos Δa_k de correção da estimativa inicial \underline{a}' .

A expressão (12), assim linearizada, pode ser minimizada, resolvendo-se o sistema de equações normais:

$$\partial Q / \partial \Delta a_k = 0 \quad (k = 1, 2, \dots, p) \quad (14)$$

com relação às variáveis Δa_k .

O sistema de equações lineares posto sob a forma matricial é:

$$[A] \underline{\Delta} = \underline{B} \quad (15)$$

onde $\underline{\Delta}^T = (\Delta a_1, \Delta a_2, \dots, \Delta a_p)$

com os seguintes elementos genéricos:

$$A_{jk} = \sum_{i=1}^{I=m} \left[\partial F / \partial a_j \right]_{(x_i, \underline{a}')} \left[\partial F / \partial a_k \right]_{(x_i, \underline{a}')} w_i \quad (16)$$

$$B_j = \sum_{i=1}^{1-m} [y_i - F(x_i, \underline{a}')] [\partial F / \partial a_j]_{(x_i, \underline{a}')} w_i \quad (16')$$

A partir do vetor \underline{a}' , estimativa inicial do vetor \underline{a} dos valores dos parâmetros das gaussianas, é resolvido o sistema de equações(15), obtendo-se como solução o vetor de correção $\underline{\Delta}^{(1)}$, onde o índice superior indica o número da iteração. O vetor $\underline{\Delta}^{(1)} = [A]^{-1} \underline{B}$ é somado ao vetor \underline{a}' e calculado um novo vetor de estimativas $\underline{a}'' = \underline{a}' + \underline{\Delta}^{(1)}$ e assim sucessivamente.

O processo iterativo é interrompido quando

- a solução não converge, sendo essa condição detetada pelo contínuo crescimento do valor de Q após um certo número de sucessivas iterações.
- o valor de Q de uma iteração para a seguinte sofre diminuição fracional menor ou igual a 0.1% (condição pré-definida) ou alternativamente uma certa fração estabelecida pelo usuário. A solução pode ainda ser convergente mas não atingir a precisão da variação fracional estipulada. Nesse caso o processo é também interrompido após ser atingido um número pré-fixado de iterações.
- a solução apresenta um valor negativo em qualquer dos parâmetros das gaussianas.

Para acelerar o processo de convergência é usado o método de MARQUARDT⁽¹⁰⁾ como utilizado por BEVINGTON⁽²⁾. Os elementos da diagonal principal da matriz [A] são multiplicados pelo fator $(1 + \lambda)$ e o sistema de equações(15) fica:

$$([A] + \lambda [I]) \underline{\Delta} = \underline{B} \quad (17)$$

onde [I] é a matriz identidade.

O coeficiente λ faz uma interpolação entre dois extremos: o método de GAUSS-NEWTON ($\lambda = 0$) e o método do gradiente ($\lambda \rightarrow \infty$). Para valores pequenos de λ ($\lambda \rightarrow 0$), o sistema de equações(17) tende para o sistema de equações(15) cuja solução é:

$$\underline{\Delta} = [A]^{-1} \underline{B}$$

Para valores grandes de λ ($\lambda \rightarrow \infty$), o sistema (17) degenera em p relações do tipo

$$\Delta_{aj} = B_j / (\lambda A_{jj}) = -1 / (2 \lambda A_{jj}) \quad \partial Q / \partial a_j$$

que são incrementos na direção do gradiente de Q.

No início do processo λ toma o valor de 0.001. Se durante o ajuste for verificado que o valor de Q sofre um aumento em relação ao valor da iteração precedente, multiplica-se λ por 10 e recalcula-se o vetor $\underline{\Delta}$ das correções. O processo é repetido até que Q diminua de valor ou seja atingido um determinado número de vezes sem ocorrer a diminuição. Nesse último caso, o processo é interrompido, devendo o usuário modificar os valores das estimativas iniciais.

No caso de Q sofrer um decréscimo, o valor de λ é dividido por 10 e inicia-se a iteração seguinte.

3.4 – Estimativa Inicial dos Parâmetros de Ajuste

Como estimativa da altura de cada pico (parâmetro a_1), admite-se o maior valor observado depois de subtraído o ruído de fundo. A posição do ponto correspondente ao maior valor observado é considerado como estimativa do centro da gaussiana (parâmetro a_{1+1}). A estimativa do parâmetro a_{1+2} é feita pela expressão:

$$a_{1+2} = 4 \ln(2) / (L_{1/2})^2$$

sendo a largura a meia altura ($L_{1/2}$) determinada pela diferença entre o número da observação onde a derivada primeira é mínima e o número da observação onde a derivada primeira é máxima.

$$L_{1/2} = (x)_{a_{\min}} - (x)_{a_{\max}}$$

O parâmetro a_{1+3} que define a posição do termo exponencial com relação ao centro da gaussiana é estimado como uma fração do valor da largura à meia altura. Desde que não haja re-definição pelo usuário, admite-se o valor de 0.25 da largura à meia altura como estimativa inicial.

3.5 – Cálculo das Áreas

Para a gaussiana simples a área de cada pico é dada pela expressão:

$$\text{Área} = a_1 \sqrt{\pi / a_{1+2}}$$

com o erro padrão

$$\sigma_{A_1} = [(\sigma_{a_1} / a_1)^2 + (\sigma_{a_{1+2}} / (2 a_{1+2})^2)]^{1/2} \cdot \text{Área}$$

Para a gaussiana modificada, o cálculo da área de cada pico é feito numericamente por meio da expressão:

$$\text{Área} = \sum_{k=-\infty}^{k=\infty} \text{GM}(x_c + k)$$

onde

x_c — centro da gaussiana

GM — expressão da gaussiana modificada

O erro padrão da área é dado pela expressão:

$$\sigma_{A_1} = [\sum_{i=1}^{i=1+3} (\partial A / \partial a_i)^2 \sigma_{a_i}^2]^{1/2}$$

3.6 – Análise Estatística

O erro padrão assintótico de cada parâmetro a_i da gaussiana é dado por:

$$\sigma_{a_i} = (\epsilon_{ii} / A_{ii}) \chi_{red}^2$$

onde

χ_{red}^2 – é o qui-quadrado reduzido referente à última iteração.

$$\chi_{red}^2 = Q / glr$$

glr – graus de liberdade do resíduo, igual ao número de pontos do intervalo de ajuste menos o número de parâmetros do modelo empregado.

A_{ii} – i-ésimo elemento da diagonal principal da matriz [A]

ϵ_{ii} – i-ésimo elemento da diagonal principal da matriz [α]⁻¹, sendo o elemento α_{jk} definido por:

$$1 + \lambda \quad \text{para } j = k$$

$$A_{jk} / \sqrt{A_{jj} A_{kk}} \quad \text{para } j \neq k$$

Após o ajuste de cada conjunto de picos sobrepostos é impresso um quadro contendo informações estatísticas referentes à soma de quadrados e quadrados médios do modelo ajustado, resíduo, total corrigido e total não corrigido.

A seguir são impressos os valores estimados dos parâmetros com os seus erros padrões assintóticos. Logo após seguem de forma destacada, informações sobre o centro do pico, a área, a largura a meia-altura, a razão:

$$R = \text{Largura à meia altura/Centro da gaussiana (FWHM/CENTRO)}.$$

e os erros padrões assintóticos correspondentes.

A homocedasticidade dos resíduos é verificada pelo gráfico RESÍDUO x NÚMERO DA OBS.. O gráfico probabilístico permite verificar se os resíduos têm distribuição normal.

Na impressão dos gráficos, os símbolos X, + e . significam respectivamente: valor observado, valor calculado e valores coincidentes.

4 – DESCRIÇÃO DOS VALORES PPRÉ-DEFINIDOS E DADOS DE ENTRADA

4.1 – Valores Pré-definidos

O programa toma automaticamente as seguintes pré-definições:

- a) Modelo: gaussiana simples.

- b) Pesquisa de picos seguida do processo de ajuste.
- c) Ruído de fundo calculado pelo programa (ver item 2.1).
- d) Variável TESTE igual a zero. O processo de ajuste é interrompido quando qualquer parâmetro do modelo for menor ou igual ao valor de TESTE, sendo nesse caso impresso mensagem para modificação das estimativas iniciais ou valor da variável TESTE.
- e) Lista de parâmetros: para os parâmetros definidos no comando NAMELIST o programa toma os valores iniciados na tabela seguinte:

Tabela IV.1

Parâmetros Pré-definidos no Programa e seus Significados. Estes valores podem ser Alterados pelo Usuário de Acordo com suas Conveniências

PARÂMETRO	VALOR	SIGNIFICADO
FLAMDA	0.001	Parâmetro de controle do processo iterativo
ITMAX	20	Número máximo de iterações
FRACON	0.01	Fração para teste de convergência
MPESO	0	Processo de ajuste não ponderado (peso=1)
PEXP	0.25	Fração da largura a 1/2 altura correspondente à posição do termo exponencial.
ELA	1	Valor mínimo permitido para a estimativa da largura a 1/2 altura.
LVC	1	Imprime valores observados, preditos e resíduos

4.2 – Dados de Entrada

4.2.1 – Cartão Título – as colunas de 1 a 72 são utilizadas para um título identificando os dados do cromatograma. Esse cartão é obrigatório.

4.2.2 – Modificações das Pré-Definições.

Quando deseja-se modificar qualquer pré-definição do programa, deve-se codificar logo após o cartão título, um ou mais cartões contendo cada um deles uma das seguintes palavras (ou apenas as quatro primeiras letras):

MODELO

AJUSTE

PESQUISA

TESTE

PARÂMETROS

RUÍDO

GRÁFICO

nas colunas de 1 a 72 e em qualquer ordem.

4.2.2.1 – MODELO

Implica na substituição do modelo descrito por gaussiana simples, para gaussiana modificada por um termo exponencial. No cartão imediatamente seguinte deverá estar codificado (colunas de 1 a 72):

GME para gaussiana modificada à esquerda.

GMD para gaussiana modificada à direita.

4.2.2.2 – AJUSTE

Implica na execução pelo programa, apenas, do processo ajuste. O usuário deverá fornecer os extremos do(s) intervalo(s) e as estimativas iniciais correspondentes (ver item 4.2.4) aos parâmetros do modelo.

4.2.2.3 – PESQUISA

Implica na execução pelo programa, apenas, do processo de pesquisa de picos.

4.2.2.4 – TESTE

Permite modificar o valor da variável TESTE. No cartão imediatamente seguinte é introduzido o novo valor para a variável, em especificação inteira ou real de simples precisão (formato F ou E), nas colunas de 1 a 72.

4.2.2.5 – PARÂMETROS

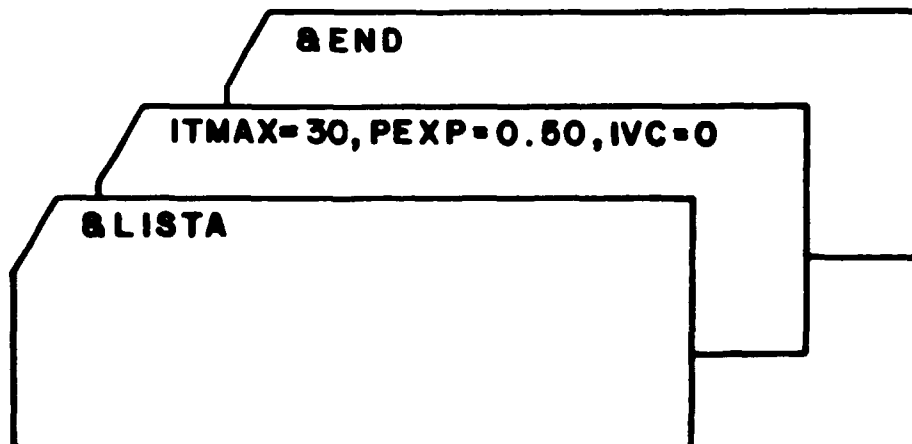
Quando incluído, permite a modificação de qualquer valor definido na lista de parâmetros (ver tabela IV.1). Nos cartões imediatamente seguintes são codificados o nome da lista (&LISTA), os parâmetros com seus novos valores separados por vírgulas e por último o cartão indicativo do fim (&END).

No caso de se desejar, por exemplo, modificar o número de iterações para 30, a estimativa da posição do termo exponencial para 0.50 da largura à 1/2 altura e suprimir a impressão dos valores observados, preditos e resíduos, deve-se codificar após o cartão contendo a palavra PARÂMETROS:

coluna 2
↓
&LISTA

ITMAX = 30, PEXP = 0.50, IVC = 0

&END



Para os parâmetros MPESO e IVC, são possíveis as seguintes alternativas:

- MPESO : 0 Processo de ajuste não ponderado.
 : 0 Processo de ajuste com peso igual ao inverso do valor observado.
 IVC : 0 Não serão impressos os valores observados, preditos e resíduos.
 : ≠ 0 Serão impressos os valores observados, preditos e resíduos.

4.2.2.6 – RUÍDO

Quando codificado, permite introduzir o valor do ruído de fundo, que não mais será calculado pelo programa. No cartão imediatamente seguinte é codificado o valor do ruído de fundo, em especificação inteira ou real de simples precisão (formato F ou E), nas colunas de 1 a 72.

4.2.2.7 – GRÁFICO

Quando codificado, o programa imprime o gráfico dos dados, não executando tanto a pesquisa como o ajuste dos picos. Essa opção será usada quando o usuário apenas desejar visualizar o aspecto do cromatograma.

4.2.2.8 – Exemplo de Modificação das Pré-definições

No caso de se desejar, por exemplo, alterar o modelo para gaussiana modificada à direita, permitir que os parâmetros das gaussianas tomem valores negativos maiores ou iguais a -1×10^6 e atribuir ao ruído de fundo o valor 2×10^6 , o usuário deverá codificar:

MODELO

GMD

TESTE

- 1.0E6

RUÍDO

2.0E6

4.2.3 – Valores Observados

Os valores observados são codificados logo após o cartão obrigatório contendo a palavra DADOS (colunas de 1 a 72). A codificação dos valores observados pode ser feita em especificação inteira ou real de simples precisão (formato F ou E), separados por brancos ou vírgula, nas colunas de 1 a 72. Assim por exemplo:

DADOS

35.2 80 7.9E+1 90.

6.5E1 59.0 47 .32E2 3.1E1

4.2.4 – Intervalo de Ajuste e Estimativas Iniciais

O usuário quando usar a opção AJUSTE, deve obrigatoriamente fornecer logo após a codificação dos valores observados, informações sobre o(s) intervalo(s) de ajuste e estimativas dos valores dos parâmetros do modelo. Inicialmente codificar a palavra INTERVALO ou apenas as quatro primeiras letras nas colunas de 1 a 72. Fornecer no cartão seguinte informações sobre o intervalo de ajuste, em especificação inteira ou real de simples precisão (formato F ou E), com os valores separados por brancos ou vírgula na seguinte ordem:

- a) extremo inferior do intervalo de ajuste
- b) extremo superior do intervalo de ajuste
- c) número de picos a serem ajustados dentro do intervalo

Para introduzir o valor das estimativas iniciais deve ser codificado no próximo cartão a palavra ESTIMATIVA ou apenas as quatro primeiras letras nas colunas de 1 a 72. Fornecer no cartão imediatamente seguinte o valor das estimativas, em especificação inteira ou real de simples precisão, separados por brancos ou vírgula, nas colunas de 1 a 72 na seguinte ordem:

- a) estimativa da posição central da gaussiana
- b) estimativa da largura à $\frac{1}{2}$ altura
- c) estimativa da posição do termo exponencial em relação ao centro (opcional)

Nos modelos GME e GMD, a omissão da estimativa da posição do termo exponencial, leva o programa a assumir como estimativa, o produto da fração PEXT (ver item 4.1) pela estimativa da largura à $\frac{1}{2}$ altura.

Para cada intervalo de ajuste, o usuário deve incluir um cartão INTERVALO seguido do cartão contendo a indicação dos extremos do intervalo e número de picos, e um cartão ESTIMATIVA seguido do(s) cartão(ões) contendo os valores iniciais dos parâmetros da gaussiana. Observe-se que o número

máximo de picos sobrepostos por intervalo é de 5.

4.2.4.1 – Exemplo

No caso de se ter, por exemplo, dois intervalos de ajuste com os seguintes dados:

INTERVALO	EXTREMO INFERIOR	EXTREMO SUPERIOR	NÚMERO DE PICOS
1	5	40	2
2	50	70	1

INTERVALO	PICO	ESTIMATIVA DO CENTRO	ESTIMATIVA DA LARGURA A 1/2 ALTURA
1	1	15	3
	2	25	5
2	1	60	4

deve-se codificar:

INTERVALO

5 40 2

ESTIMATIVA

15 3

25 5

INTERVALO

50 70 1

ESTIMATIVA

60 4

5 - EXEMPLOS

5.1 - Exemplo 1 - Pesquisa e Ajuste de Picos com Gaussianas Simples

5.1.1 - Descrição e Análise do Ensaio

O cromatograma analisado refere-se à Insulina-¹²⁵I marcada pelo método convencional da Cloramina-T segundo Greenwood^(8,7) e purificada usando-se Sephadex G-50(fino), coluna (50 x 1cm), equilibrada com tampão, fosfato 0.2M, pH 7.4. As frações colhidas continham 1 ml e a radioatividade presente foi medida em detector de NaI(Tl) tipo poço.

Os dados foram submetidos ao sistema ANACROM com as seguintes opções: pesquisa automática de picos e modelo soma de gaussianas simples. A pesquisa identificou três picos sobrepostos. As informações estatísticas relativas ao processo de ajuste dos mínimos quadrados não linear, mostram que a fonte de variação devida ao resíduo é relativamente bem menor do que a fonte de variação devida ao modelo, sugerindo a adequacidade da função ajustada. Os gráficos subsequentes (Figuras 2, 3 e 4), confirmam a qualidade do ajuste. Apesar do número de observação ser inteiro, frequentemente encontra-se na abscissa valores fracionários devido ao critério de cálculo que define os limites da escala.

5.1.2 - Dados de Entrada

```

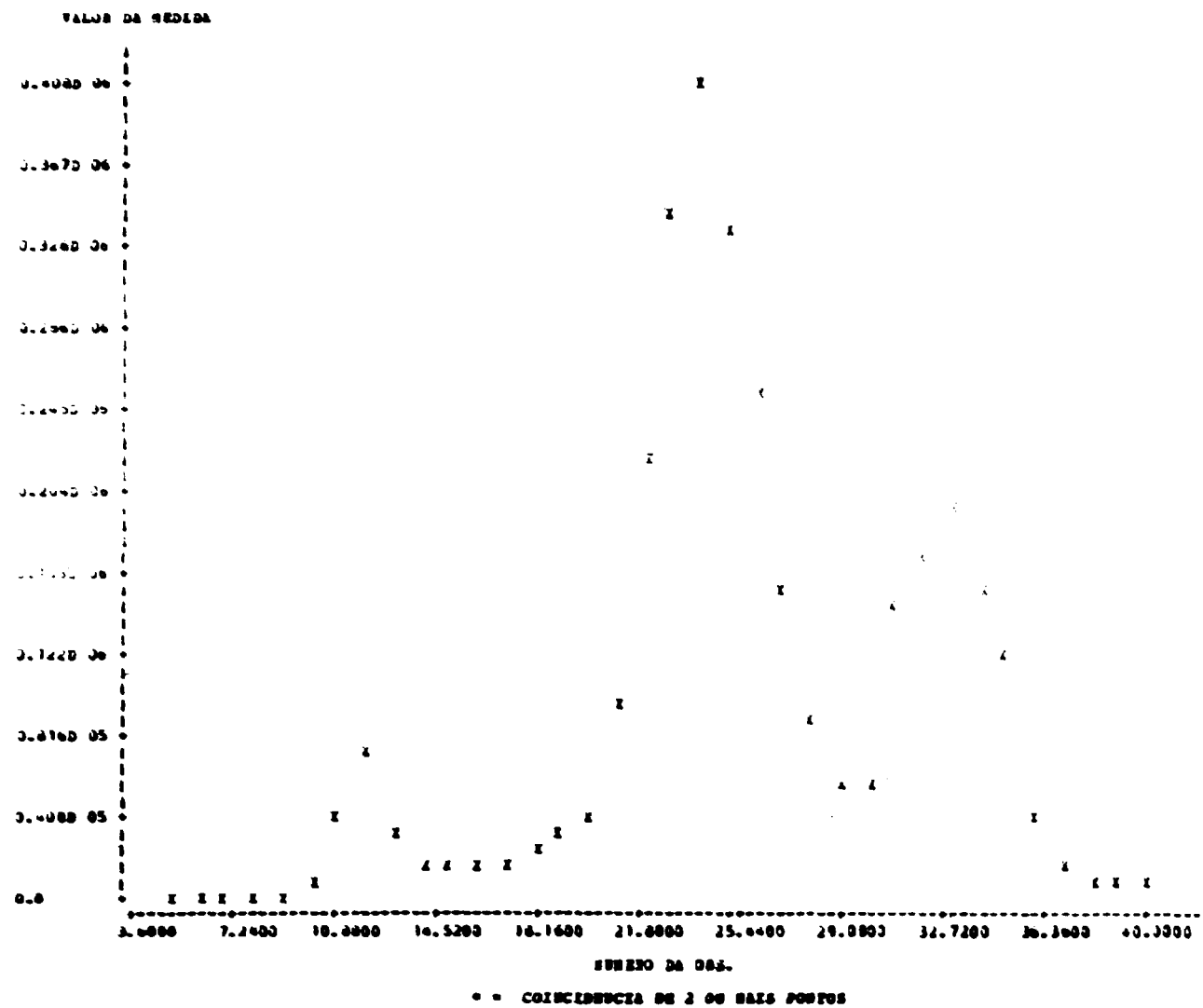
EXEMPLO 1 * PESQUISA DE PICOS * AJUSTE COM GAUSSIANAS SIMPLES
DADOS
407      539      426      551      454      493      614
632      2150     7696     44112    72235    34314    13512
13377    13988    18590    24894    23350    44634    24545
221215   343385   406254   336319   256114   154503   57743
54342    61171    144326   168055   194104   157425   124305
38126    16650    11002    8296     7901
  
```

5.1.3 - Resultados

INFORMACOES SOBRE A PESQUISA DE PICOS

EXEMPLO 1 * PESQUISA DE PICOS * AJUSTE COM GAUSSIANAS SIMPLES

NUMERO DO PICO	INICIO DO PICO	FIM DO PICO	ESTIMATIVA DO CENTRO	ESTIMATIVA DA ALTURA	ESTIMATIVA DA LARGURA
-----	-----	-----	-----	-----	-----
1	5	16	12.	71846.	4.0000
2	16	30	24.	405805.	4.0000
3	30	40	33.	193655.	4.0000



INFORMACOES ESTATISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR
 MODELO SOMA DE GAUSSIANAS

PONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	9	0.69236111D 12	0.76929012D 11
RESIDUO	27	0.42925771D 10	0.15899434D 09
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	36	0.69665369D 12	
TOTAL (CORRIGIDO)	35	0.41298613D 12	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	66743.13131	10857.70734
CENTRO	11.99122869	0.2212159421
SIGMA	1.075976553	0.5646831934
ALTURA	391955.7220	8234.297758
CENTRO	24.15241961	0.4925405723D-01
SIGMA	2.012478976	0.2885715957
ALTURA	192628.1629	9277.424854
CENTRO	32.82352839	0.9969596314D-01
SIGMA	1.990996255	0.5777587964

NUM	LARGURA A 1/2 ALT.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA (m)	ERRO PADRAO ASSINT.	FUNH/CENTRO	ERRO PADRAO ASSINT.
1	2.532548039	0.4367449249	5.772194797	1.391108325	0.2112000430	0.3662851401D-01
2	4.736812939	0.1193260156	63.40150363	2.921626126	0.1961216729	0.4956703012D-02
3	4.686248620	0.2414627003	30.82630157	2.296384774	0.1427710197	0.7369769070D-02

OBS.	VALOR OBSERVADO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
5	454.	449.	5.
6	499.	449.	50.
7	614.	450.	164.
8	632.	518.	114.
9	2150.	1849.	301.
10	7696.	12492.	-4806.
11	44112.	44113.	-1.
12	72295.	67130.	5105.
13	34814.	43456.	-9642.
14	15512.	12133.	6379.
15	13377.	1800.	11577.
16	13998.	621.	13377.
17	18590.	1159.	17431.
18	24394.	4111.	20783.
19	23850.	15236.	13614.
20	44634.	47090.	-2456.
21	34545.	115375.	-20830.
22	221215.	221677.	-462.
23	343385.	333134.	10251.
24	406254.	391293.	14961.
25	336019.	359225.	-23206.
26	256114.	256159.	-45.
27	154509.	147162.	7347.
28	87743.	73713.	14030.
29	54342.	52464.	1878.
30	61171.	76672.	-15501.
31	144326.	128248.	16078.
32	168055.	177480.	-9425.
33	194104.	192347.	1757.
34	157425.	162223.	-4798.
35	124308.	106431.	17877.
36	38126.	54400.	-16274.
37	16850.	21790.	-4940.
38	11002.	7009.	3993.
39	8296.	2016.	6280.
40	7901.	740.	7161.

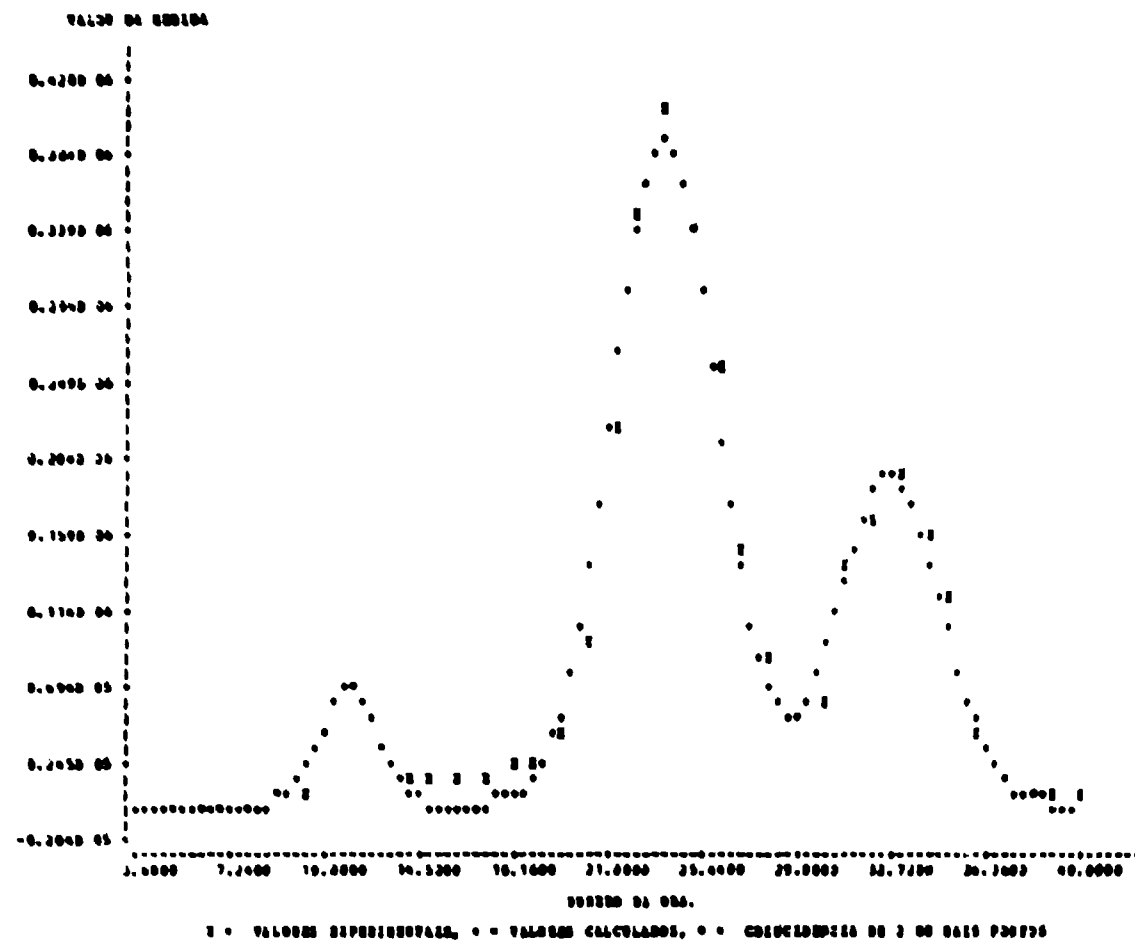


Figura 2 – Perfil do cromatograma do exemplo 5.1

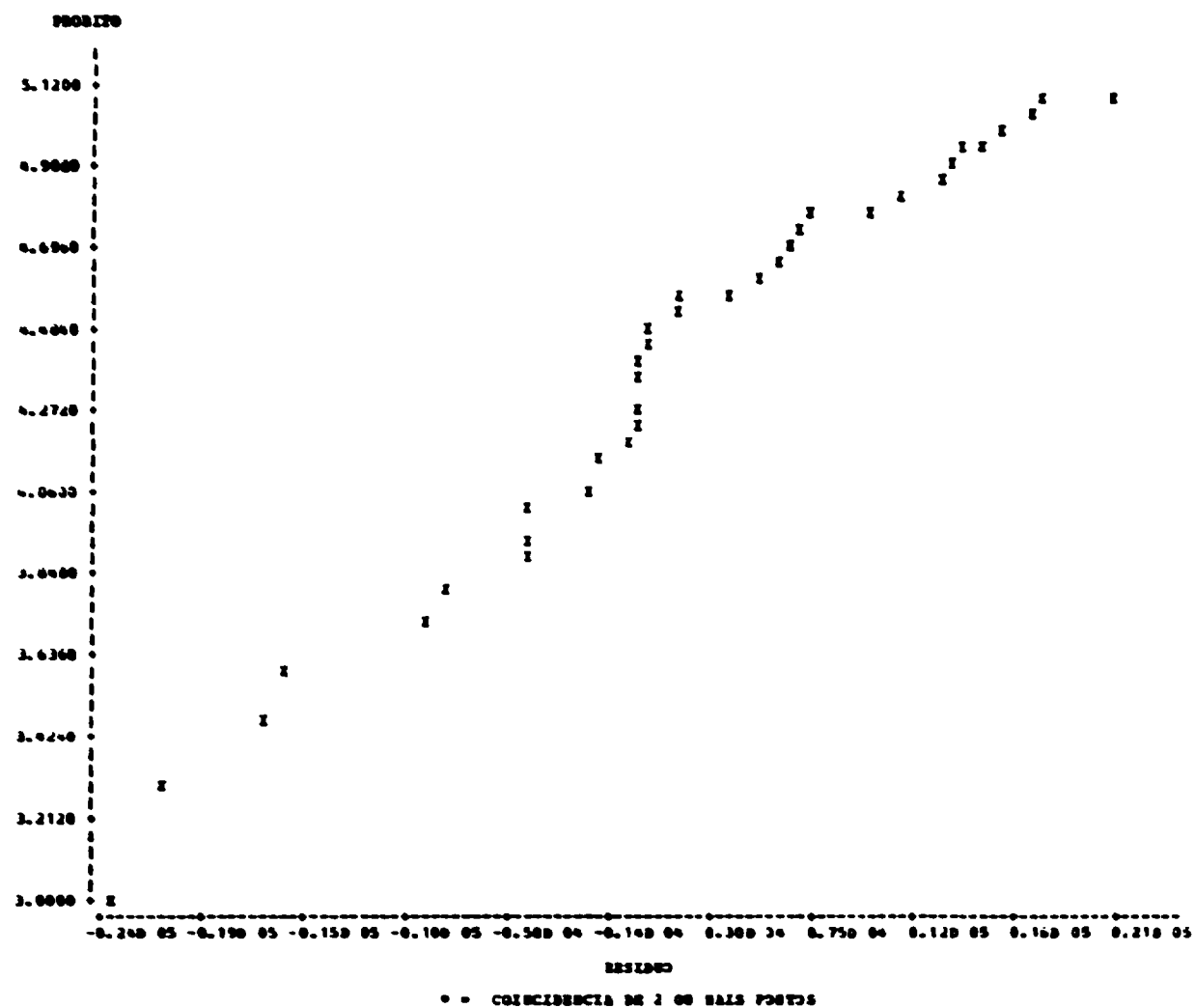


Figura 4 — Gráfico Probabilístico

5.2 – Exemplo 2 – Ajuste com Gaussianas Simples. Picos Distintos

5.2.1 – Descrição e Análise do Ensaio

Os dados do cromatograma referem-se à Albumina-¹³¹I marcada pelo método da Cioramina-T de acordo com Bocci^(3,6) e imediatamente purificada em resina de troca aniônica de Amberlite IRA-410. Uma alíquota do eluato foi submetida a cromatografia ascendente em papel Watmann número 1, fita de 23 x 2,5 cm, utilizando-se metanol a 75% como solvente. Recortaram-se 40 tiras de 0,5 cm e mensurou-se a radioatividade presente em cada uma em detetor de NaI(Tl) tipo poço.

Os dados experimentais foram submetidos ao sistema ANACROM para ajuste direto (modelo gaussianas simples), prescindindo-se de pesquisa automática de picos. Esta conduta foi adotada exclusivamente para ilustrar esse tipo de alternativa. Os picos foram ajustados separadamente, sendo fornecido para cada um deles o intervalo de ajuste e a estimativa do centro e da largura à meia altura. O ajuste dos dois picos poderia ter sido simultâneo, entretanto a diferença de amplitude dos mesmos deixaria o segundo pico desaparecido no gráfico do cromatograma. As informações do processo dos mínimos quadrados não linear mostram que o resíduo é relativamente pequeno face a fonte de variação devida ao modelo. Entretanto a observação dos gráficos subsequentes (Figuras 5 a 7) sugere inadequacidade do modelo escolhido. Foram omitidos os gráficos correspondentes ao primeiro ajuste por terem sido considerados desnecessários, pois são semelhantes aos do segundo ajuste.

5.2.2 – Dados de Entrada

```

EXEMPLO      2 * AJUSTE DIRETO * GAUSSIANAS SIMPLES * PICOS DISTINTOS
AJUSTE
DADOS
40           108           199           2491           16870           33469           62956
88487        165350        285736        161330        8429           1024           1000
1098         1340         1502         2384         2863         4904         10117
9190         3901         1486         370         113         87         85
82           90           69           82
INTERVALO
1 14 1
ESTIMATIVAS
10 2
INTERVALO
15 27 1
ESTIMATIVAS
21 3

```

5.2.3 - Resultados

OBS.	VALOR OBSERVADO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
-----	-----	-----	-----
15	1093.	40.	1058.
16	1340.	45.	1295.
17	1502.	106.	1396.
18	2384.	553.	1831.
19	2863.	2368.	495.
20	4904.	6215.	-1311.
21	10117.	9607.	510.
22	9190.	8699.	491.
23	3901.	4619.	-718.
24	1486.	1454.	32.
25	370.	295.	75.
26	113.	67.	46.
27	87.	42.	45.

I N F O R M A C O E S S O B R E A S A R E A S

NUM. PICO	AREA (%)	ERRO PADRAO ASSINT.
-----	-----	-----
1	95.62506889	17.53447328
2	4.374931106	0.7820387731

INFORMACOES ESTADISTICAS EIRIOS OABABOS EAC LIBAL

GOBLO SOA DE OABABOS

POST	G.L.	SOMA DOS OABABOS	SOMA DOS OABABOS NEGATIVOS
GOBLO	3	0.233264200 09	7780066.
RESIDJO	10	11007075.	1120707.5
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	13	0.24452070 09	
TOTAL (CORRIGIDO)	12	0.128439900 09	

PARANETRO
VALOR ESTIMADO
SOMA
ALTIMA
CORRETO
SOMA

0024.531166
21.31651917
1.363907035

022.2720400
0.1333304671
0.4936565996

PARANETRO
VALOR ESTIMADO
SOMA
ALTIMA
CORRETO
SOMA

005 - AAAAA A 1/2 ALT. 000 PARANETRO ASSISE. AREA (S) 0000 PARANETRO ASSISE. PARANETRO ASSISE. 0.14219670310-01

1 3.210444072 0.2023192064 100.0000000 17.01970400 3.1506220957

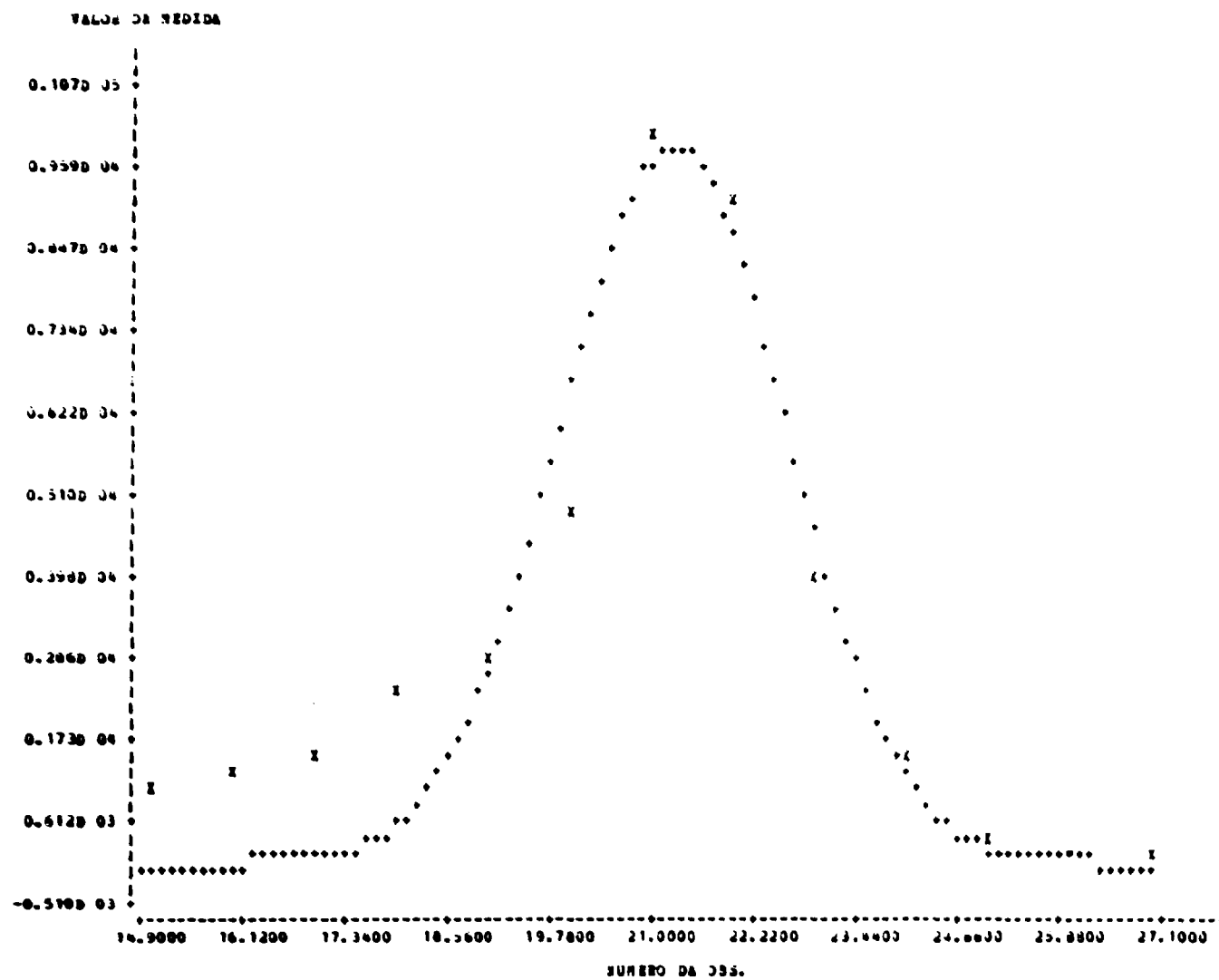
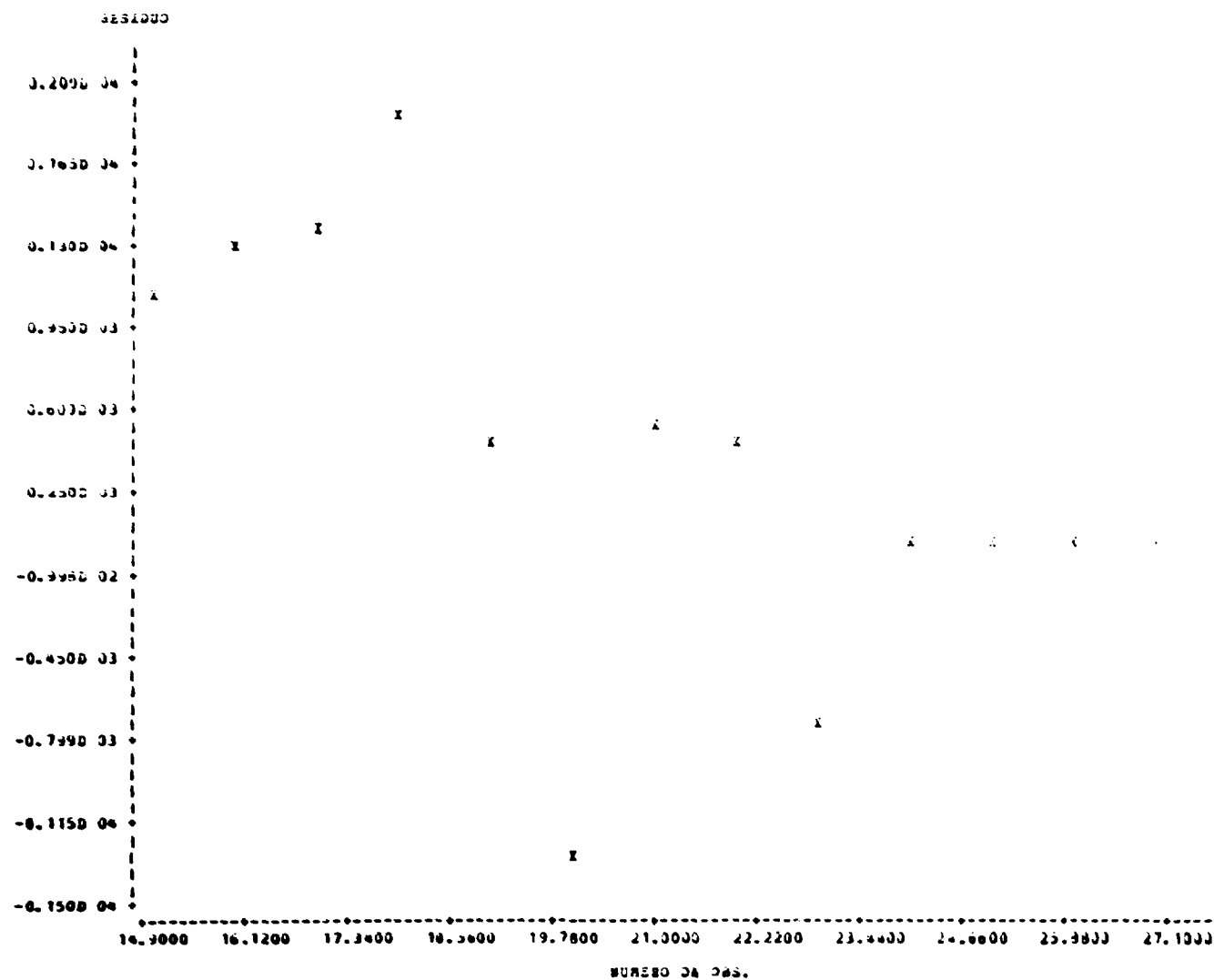


Figura 5 — Perfil do segundo pico do cromatograma do exemplo 5.2



• = COINCIDENCIA DE 2 OU MAIS PONTOS

Figura 6 — Gráfico dos resíduos

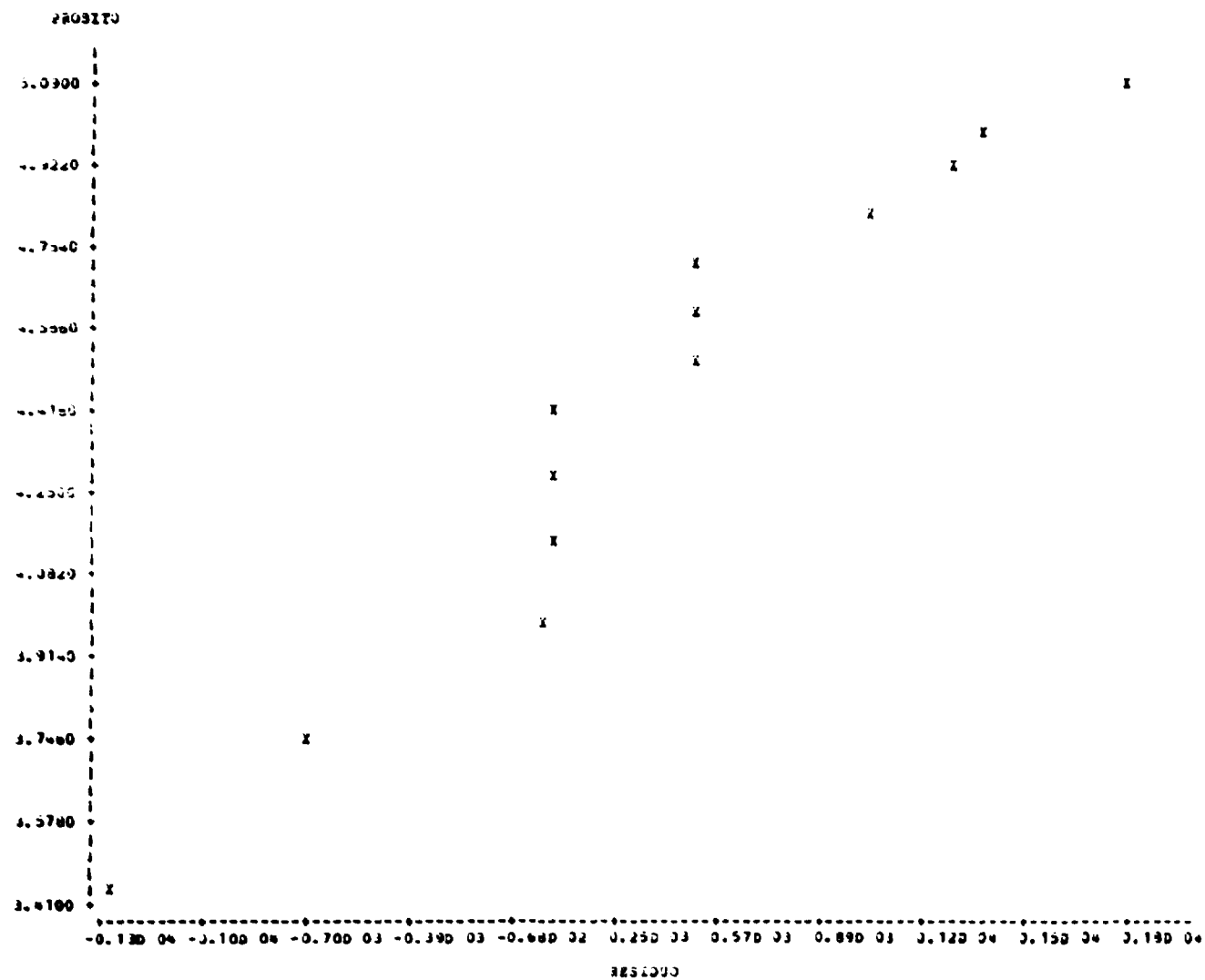


Figura 7 - Gráfico Probabilístico

5.3 – Exemplo 3 – Ajuste ~~exp~~ Gaussianas Modificadas à Esquerda. Picos Distintos

5.3.1 – Descrição e Análise do Ensaio

Os dados do cromatograma deste exemplo são os mesmos do exemplo anterior(5.2). Os gráficos (valores observados versus número da observação) de ambos os picos sugerem a utilização de uma componente exponencial à esquerda. O parâmetro TESTE teve o seu valor pré-definido alterado para -1×10^5 (-1.0E05 em anotação FORTRAN), permitindo que o processo iterativo de ajuste fosse interrompido quando qualquer parâmetro do modelo tomasse um valor negativo maior ou igual ao mesmo. Embora um valor negativo não tenha significado físico, ele pode ocorrer eventualmente em alguma fase do processo iterativo.

O modelo 'gaussiana modificada à esquerda' mostrou-se mais adequado. Verifica-se acentuada redução da componente RESÍDUO e visível melhoria do gráfico do cromatograma, gráfico da dispersão dos resíduos e gráfico probabilístico (Figuras 8 a 10).

5.3.2 – Dados de Entrada

```

EXEMPLO 3 * AJUSTE DIRETO * GAUSSIANA MODIFICADA A ESQUERDA
MODELO
GME
TESTE
-1.0E5
AJUSTE
DADOS
40      108      199      2491      16870      33469      62956
88487   165350   285736   161330   8429      1024      1000
1098    1340     1502     2384     2863     4904     10117
9190    3901     1486     370      113      87       85
82      90       69       82
INTERVALO
1 14 1
ESTIMATIVAS
10 3
INTERVALO
15 27 1
ESTIMATIVAS
21 3

```

5.3.3 – Resultados

INFORMACOES SOBRE AS AREAS

NUM.PICO	AREA (%)	ERRO PADRAO ASSINT.
-----	-----	-----
1	95.73555002	65.61505159
2	4.264449976	2.569294392

INFORMACOES ESTATISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR
 MODELO SOMA DE GAUSSIANAS MODIFICADAS A ESQUERDA

FONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	4	0.24160085D 09	60400212.
RESIDUO	9	2851225.6	316802.85
TOTAL (NAO CORREGIDO)	13	0.24445207D 09	
TOTAL (CORREGIDO)	12	0.12843998D 09	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	10307.85539	537.4960681
CENTRO	21.47268076	0.1032978729
SIGNA	1.126945522	0.3449998204
POS.XIP	0.6633486405	0.1879165963

QUE LANGUEIRA A 1/2 ALT.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA (%)	ERRO PADRAO ASSINT.	PONHO/CENTRO	ERRO PADRAO ASSINT.
1	2.652514732	0.2547508365	100.0000000	52.57803238	0.1235297428
					0.1187910406D-01

OBS.	VALOR OBSERVADO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
-----	-----	-----	-----
15	1098.	457.	641.
16	1340.	743.	597.
17	1502.	1225.	277.
18	2384.	2038.	346.
19	2863.	3409.	-546.
20	4904.	5720.	-816.
21	10117.	9480.	637.
22	9190.	9279.	-89.
23	3901.	4155.	-254.
24	1486.	874.	612.
25	370.	117.	253.
26	113.	43.	70.
27	87.	40.	47.

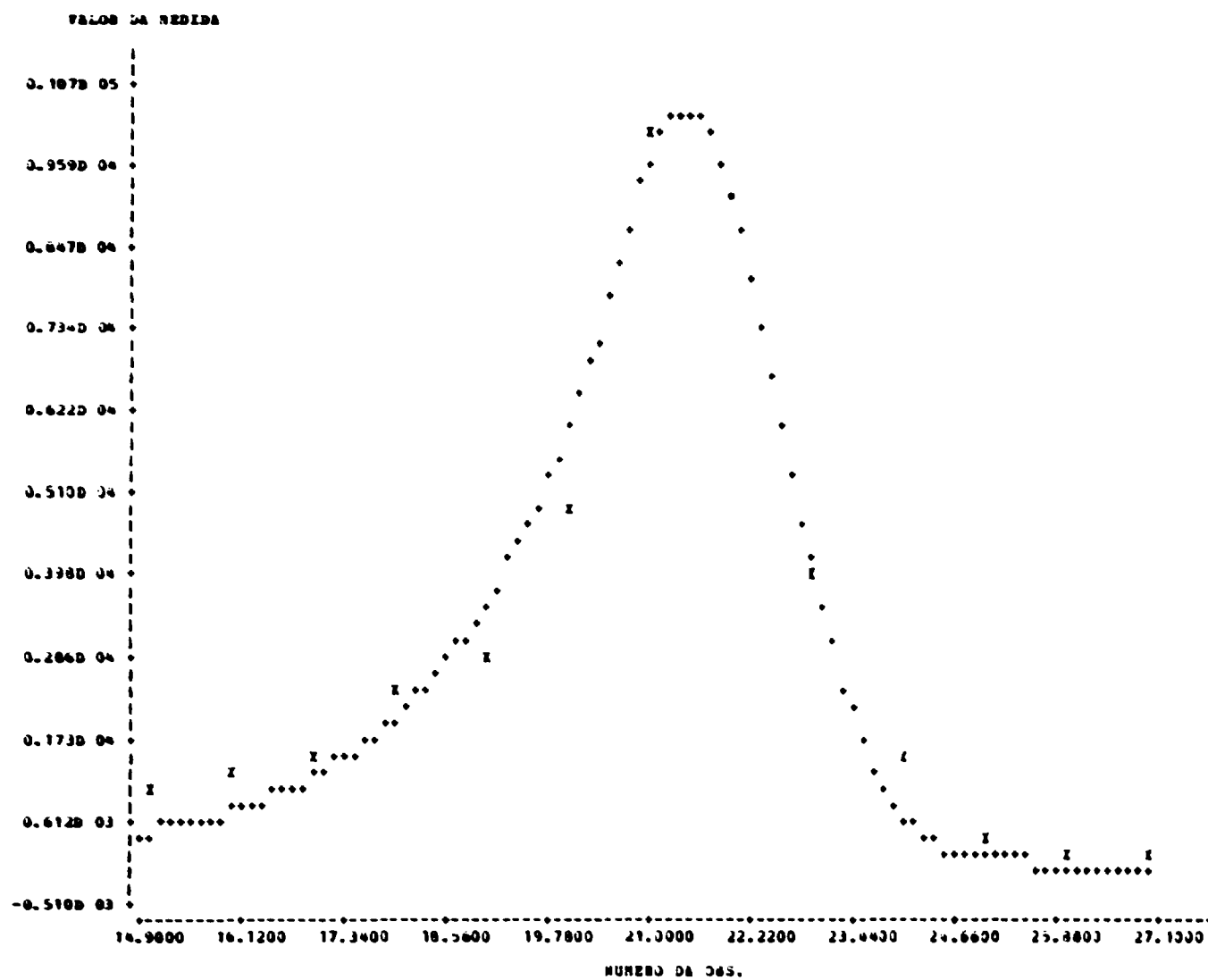


Figura 8 — Perfil do segundo pico do cromatograma do exemplo 5.3

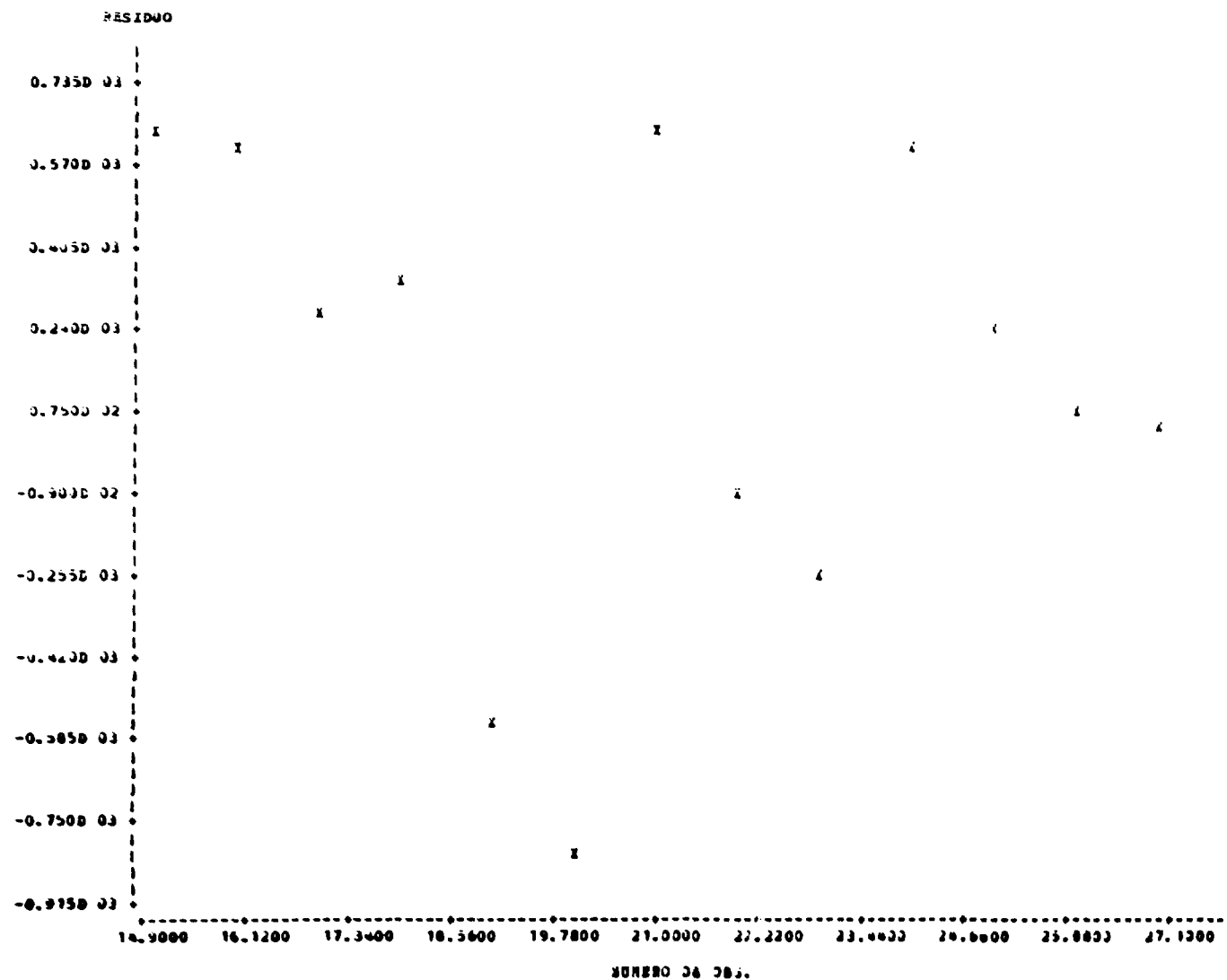


Figura 9 — Gráfico dos resíduos

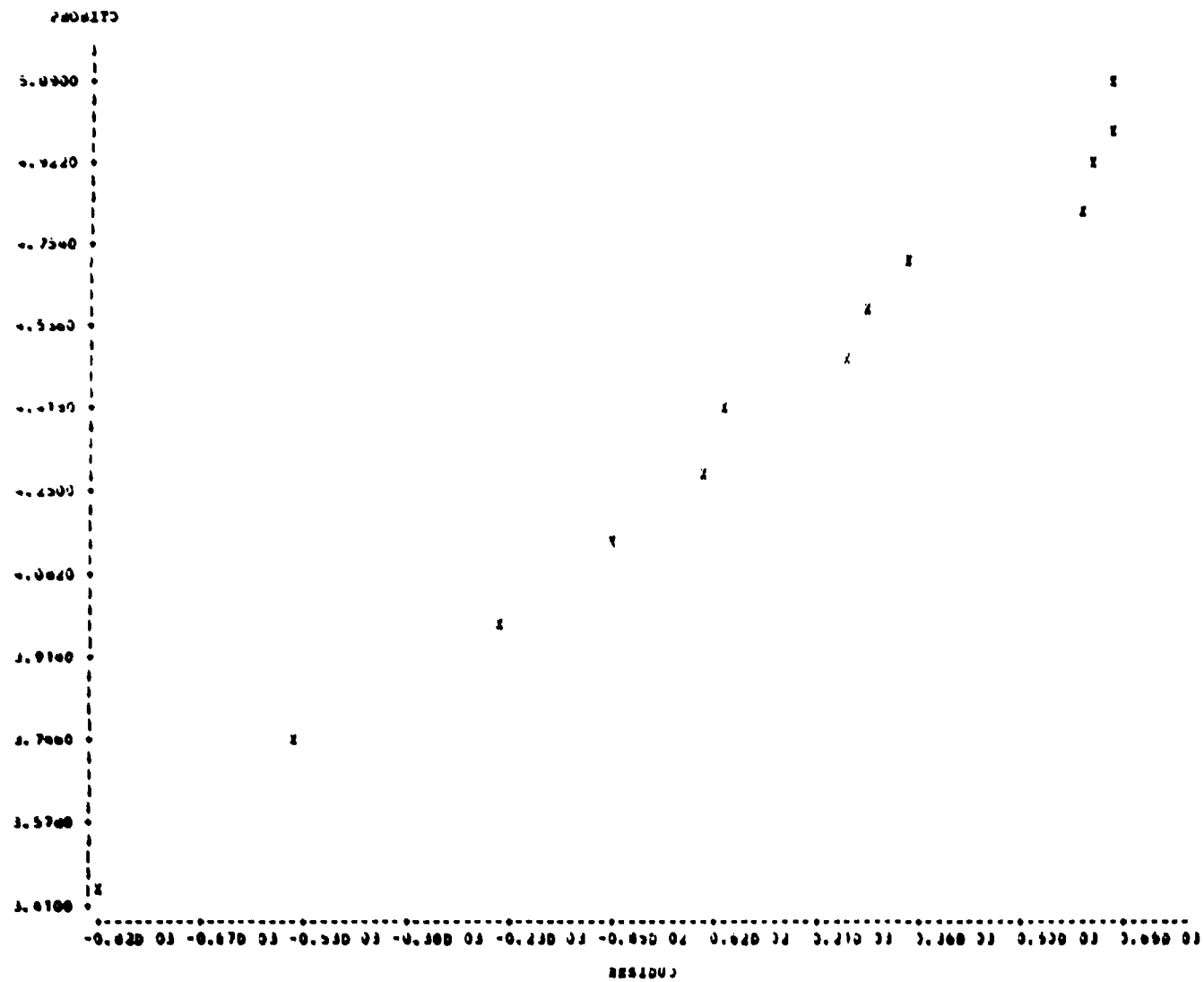


Figure 10 - Gráfico probabilístico

5.4 – Exemplo 4 – Ajuste com Gaussianas Modificadas à Direita. Picos Sobrepostos

5.4.1 – Descrição e Análise do Ensaio

Os dados desse exemplo referem-se à insulina-¹²⁵I radioiodada pelo método controlado da Cloramina-T⁽¹³⁾, purificada imediatamente em coluna de celulose. O substrato purificado foi convenientemente diluído em tampão, veronal 0.02M, pH 8.6, com atividade de aproximadamente 2×10 CPM/ml. Alíquotas de 1 ml foram liofilizadas e mantidas a 4°C por 45 dias. Recombinou-se um frasco com 1 ml de água destilada, submetendo-o a cromatografia em Sephadex G-50 (fino), coluna (50 x 1 cm), equilibrado com tampão veronal, usado também na eluição. As frações colhidas continham 1 ml e a radioatividade foi medida em detector de NaI(Tl) tipo poço.

Os dados experimentais foram submetidos ao sistema ANACROM para ajuste direto (modelo soma de gaussianas modificadas à direita). Três picos foram ajustados simultaneamente, fornecendo-se o intervalo de ajuste e as estimativas da posição central e largura à meia altura. Como não foi dada a estimativa da posição do termo exponencial, é admitido o valor pré-definido no sistema, isto é, 0.25 da estimativa da largura à meia altura. As informações estatísticas decorrentes do processo de ajuste, bem como os gráficos subsequentes (Figuras 11 a 13) confirmam a escolha apropriada do modelo.

5.4.2 – Dados de Entrada

```

EXEMPLO  4 * GAUSSIANA MODIFICADA A DIREITA * PICOS SOBREPOSTOS
MODELO
GMD
TESTE
-1.0E10
AJUSTE
DADOS
496      221      269      194      279      203      211
521      243      647      21922    61253    61376    39167
25139    11032    7770    4429    7217    6817    15426
27173    51936    92765    124142   131153   127175   104908
70439    57362    44078    43050    45632    47770    50208
48817    44267    33679    26858    19276    13520    10445
5740     3939    2572    1904    1497    1196    892
759      681     807     511     777     521     425
INTERVALO
6 50 3
ESTIMATIVAS
13 3
26 5
35 5

```


INFORMACOES ESTATISTICAS MINIMOS QUADRADOS NAO LINEAR
 MODELO SOBRE OX GAUSSIANAS MODIFICADAS A DIREITA

PONTE	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADOS MEDIOS
MODELO	12	0.107676110 12	0.897300930 10
RESIDUO	33	0.130426080 09	3952305.3
TOTAL (NAO CORRIGIDO)	45	0.107806540 12	
TOTAL (CORRIGIDO)	44	0.586293250 11	

PARAMETRO	VALOR ESTIMADO	ERRO PADRAO ASSINTOTICO
ALTURA	70334.59350	1373.945942
CENTRO	12.50852730	0.43753269180-01
SIGMA	0.9701262059	0.1422270244
POS. EXP	0.4634076883	0.59207237180-01
ALTURA	135070.2941	1384.998228
CENTRO	26.15444506	0.34185428740-01
SIGMA	2.357033615	0.2371044556
POS. EXP	2.272703113	0.3390553868
ALTURA	44740.12509	1373.456130
CENTRO	35.60357254	0.2283269795
SIGMA	3.185617498	2.395415843
POS. EXP	3.645636174	0.9322131938

NUM LADEIRA A 1/2 ALT.	ERRO PADRAO ASSINT.	AREA (A)	ERRO PADRAO ASSINT.	PERIM/CENTRO	ERRO PADRAO ASSINT.
1	2.283405899	0.1220014552	16.29964332	3.603392761	0.1825479436
2	5.547798242	0.83711252390-01	58.43581971	6.400499229	0.2121163432
3	7.498053081	0.6257467142	25.26453697	5.638863122	0.2105983345

OBS.	VALOR OBSERVADO	VALOR CALCULADO	RESIDUO
6	203.	199.	4.
7	211.	199.	12.
8	521.	201.	320.
9	243.	301.	-58.
10	647.	2684.	-2037.
11	21922.	21194.	728.
12	61253.	61505.	-252.
13	61376.	62081.	-705.
14	39167.	37819.	1348.
15	25139.	23071.	2068.
16	11032.	14115.	-3083.
17	7770.	8723.	-953.
18	4429.	5678.	-1249.
19	7217.	4672.	2545.
20	6817.	6566.	251.
21	15426.	13718.	1708.
22	27173.	29479.	-2306.
23	51988.	55805.	-3817.
24	92765.	89466.	3299.
25	124142.	120336.	3806.
26	131153.	135551.	-4398.
27	127175.	128077.	-902.
28	104908.	102237.	2671.
29	70439.	72568.	-2129.
30	57362.	54328.	3034.
31	44078.	45577.	-1499.
32	43050.	43479.	-429.
33	45632.	45314.	318.
34	47770.	48306.	-536.
35	50208.	49919.	289.
36	48817.	48434.	383.
37	44267.	43393.	874.
38	33679.	35610.	-1931.
39	26858.	26070.	188.
40	19276.	18697.	579.
41	13520.	13089.	431.
42	10445.	9182.	1263.
43	5740.	6460.	-720.
44	3939.	4563.	-624.
45	2572.	3241.	-669.
46	1904.	2320.	-416.
47	1497.	1678.	-181.
48	1196.	1230.	-34.
49	892.	918.	-26.
50	759.	701.	58.

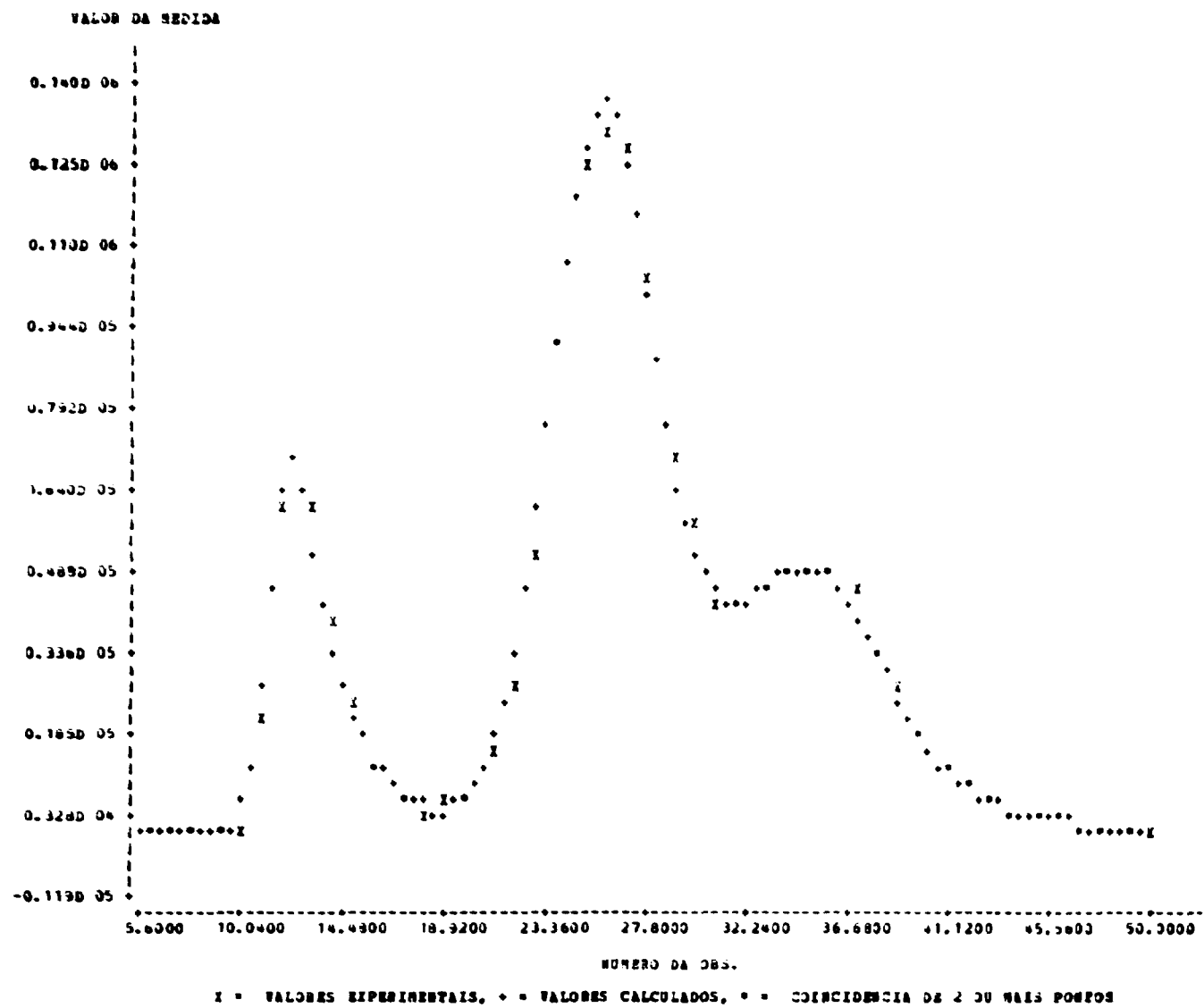


Figura 11 — Perfil do cromatograma do exemplo 5.4

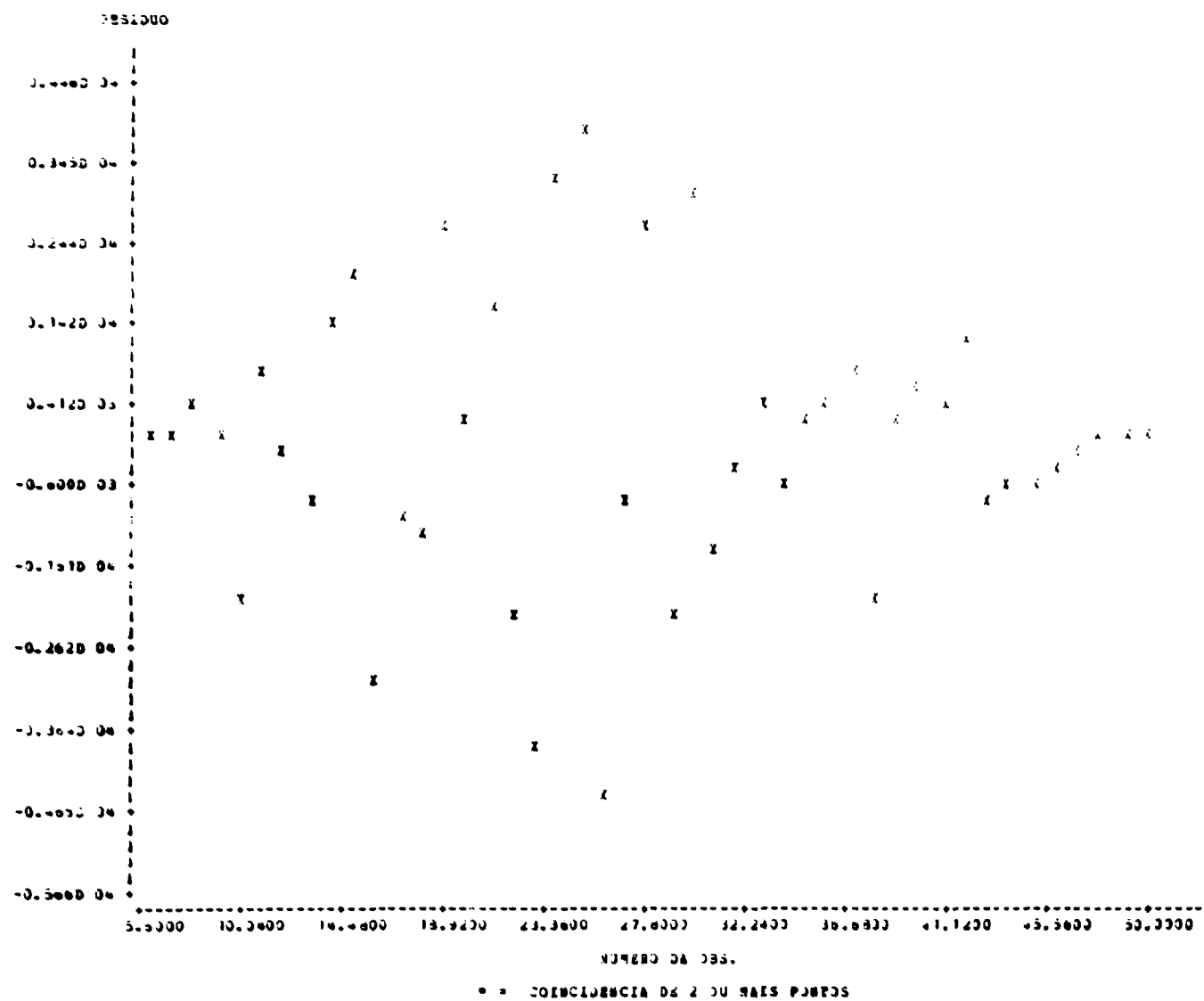
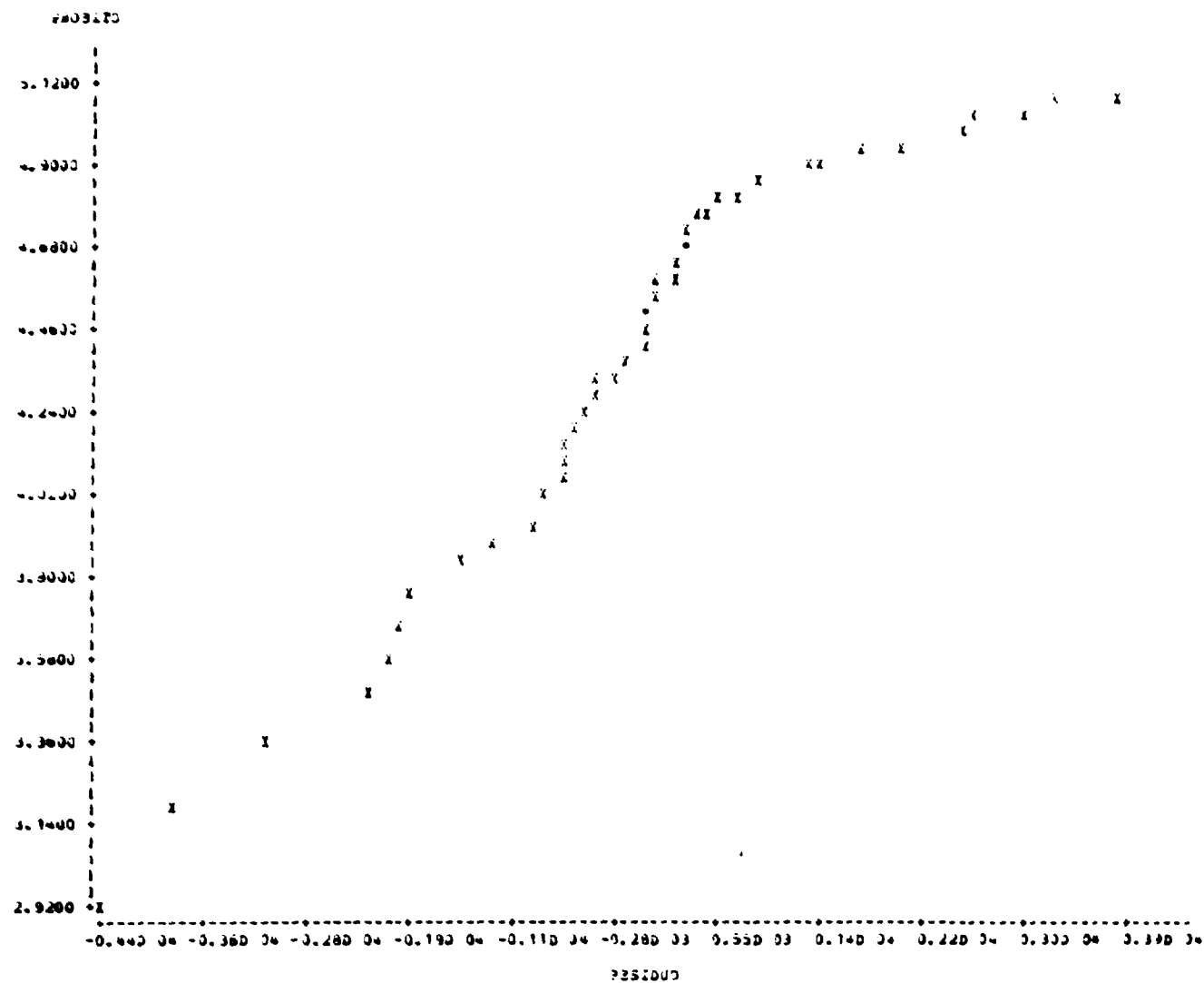


Figure 12 — Gráfico dos resíduos



* = COINCIDENCIA DE 2 OU MAIS PONTOS

Figura 13 - Gráfico probabilístico

ABSTRACT

ANACROM is a computer code developed for automatic peak search and evaluation of some chromatograms parameters such as: centroid, height, area, full width at half maximum (FWHM) and resolution for each peak. Estimated parameters are accompanied by their associated asymptotic standard errors. The peak search is based on the concept of sign changes of the first derivative. The method of Savitzky and Golay is used to compute the first derivative.

The pseudo-peaks are eliminated by a 't' test described by Barnes. A constant back-ground is subtracted of the experimental values.

The fitting function has a general form $y = \sum_{i=1}^n G_i(x)$ where $G(x)$ is a simple Gaussian function or a modified Gaussian by a left or right exponential term, and n is the number of overlapping peaks.

The fitting of the data uses the Marquardt-Bevington method to find the non-linear least-squares estimates of the parameters.

Three plots are obtained: a) experimental and predicted values versus observation number, b) residuals versus observation number and c) probabilistic graph of residuals. They should help the users to confirm the goodness of the model chosen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. BARNES, V. G. *An advanced computer code for the analysis of high resolution gamma-ray spectra*. UKAEA, 1968. (PG REPORT 834(W)).
2. BEVINGTON, P. R. *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. New York, N. Y., McGraw Hill, 1969.
3. BOCCI, V. Efficiency labelling of serum protein with ^{131}I using chloramic T. *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 15:449-56, 1964.
4. DRAPER, N. R. & SMITH, H. *Applied regression analysis*. New York, N. Y., John Wiley, 1966.
5. FELAWKA, L. T.; MOLNAR, J. G.; CHEN, J. D.; BOASE, D. G. GAMAN: a computer program for the qualitative and quantitative evaluation of Ge(Li) gamma-ray spectra. Pinawa, Atomic Energy of Canada, Jan. 1973. (AECL-4217).
6. GONÇALVES, R. S. V. *Marcação de soro albumina humana com Iodo-131 para diagnóstico em medicina nuclear*. São Paulo, Instituto de Energia Atômica, Fev. 1969. (Dissertação de mestrado, Instituto de Energia Atômica). (IEA-DT-154).
7. GOUVEA, A. S. & MESQUITA, C. H. ANACROM: a computer code for radiochromatograms analysis. *RADIOPHARMACEUTICAL chemistry, third International symposium on...*, held in St. Louis, Missouri, Jun. 16-20, 1980.
8. GREENWOOD, F. C.; HUNTER, W. M.; GLOVER, J. S. The preparation of ^{131}I labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89:114-23, 1963.
9. LEDERER, M. C. (UCRL-18948(1969)) apud FELAWKA, L. T.; MOLNAR, J. G. CHEN, J. D.; BOASE, D. G. GAMAN: a computer program for the qualitative and quantitative evaluation of Ge(Li) gamma-ray spectra. Pinawa, Atomic Energy of Canada, Jan, 1973 (AECL-4217).
10. MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of non linear parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 2: 431-41, 1963.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IPEN foram revistas e enquadradas na NB-88 de Associação Brasileira de Normas Técnicas.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Caixa Postal, 11 049 – Pinheiros

CEP 05508

01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011

Endereço Telegráfico – IPENUCLEAR

Telex – (011) 23592 - IPEN - BR