UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

JOÃO MARCELO PEREIRA NOGUEIRA

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EMBARCADO PARA
REALIZAÇÃO DE ESTUDOS ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA

São Carlos

2020

JOÃO MARCELO PEREIRA NOGUEIRA

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA EMBARCADO PARA
REALIZAÇÃO DE ESTUDOS ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA

Dissertação apresentada a Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, como requisito para a obtenção do
Título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Varela Magalhães

Versão Corrigida

São Carlos

2020

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **JOÃO MARCELO PEREIRA NOGUEIRA.**

Título da dissertação: "Desenvolvimento de um sistema embarcado para realização de estudos através de espectroscopia de fluorescência".

Data da defesa: 07/12/2020

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Associado **Daniel Varela Magalhães**

(Orientador)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Cristina Kurachi**

(Instituto de Física de São Carlos/IFSC-USP)

Aprovado

Prof. Dr. **Ricardo Augusto Souza Fernandes**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica:

Prof. Associado **Carlos de Marqui Junior**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me acompanhar durante toda minha vida, amparando-me em momentos difíceis, permitindo-me enxergar as soluções e desenvolver habilidades para solucionar todas as dificuldades encontradas.

À minha esposa, Andrea, pela enorme paciência, sempre me dando sua amizade e o seu amor, que servem de suporte e de incentivo para alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais, Zuelinda e Paulo, que me instruíram e me educaram, ensinando-me os valores necessários para a vida.

Aos meus filhos, Paulo e a Maria, por todo o carinho e o amor que me oferecem, gerando a energia e a força necessária para buscar sempre o melhor.

Aos amigos, Diego Soler, Marcos Miotti e Yuri Oda, que me esclareceram muitas dúvidas ao longo desse trabalho, a Lilian, e ao José Dirceu, que sempre se prontificaram em me ajudar na realização das medidas, nos detalhes da montagem e na calibração do sistema. Também aqueles que estão ou que passaram pelo LIEPO, principalmente o Leandro Boni, que junto ao pessoal da oficina mecânica me ajudaram com os desenhos mecânicos deste projeto.

À professora Cristina Kurachi e ao professor Daniel Varela, que ofereceram a oportunidade de contribuir com esse trabalho.

Ao professor Sebastião Pratavieira, por toda explicação e esclarecimento sobre os conceitos físicos envolvidos nesse trabalho e também pela grande ajuda durante a realização das medidas.

Aos professores do programa de Pós-Graduação da Escola de Engenharia de São Carlos, pelo conhecimento oferecido durante as disciplinas na realização do curso de Mestrado.

RESUMO

NOGUEIRA, J.M. P. **Desenvolvimento de um sistema embarcado para realização de estudos através da espectroscopia de fluorescência.** 2020. 107f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica de espectroscopia óptica amplamente utilizada em diversas áreas de pesquisas. Sua aplicação é considerada como uma opção rápida, não invasiva e não destrutiva, apresentando grande sensibilidade a alterações físicas e químicas em determinados grupos de moléculas. Na indução e na detecção de fluorescência é necessário que se tenha um sistema composto por aparatos ópticos, incluindo a fonte de luz de excitação e o sistema de detecção que muitas vezes exige o uso de um computador. Contudo essa configuração é bastante limitada, especialmente quando o sistema deve ser transportado para experimentos realizados em campo. Além de comprometer a segurança dos componentes do sistema, o transporte pode também afetar o alinhamento óptico da configuração, inviabilizando a reprodução das medidas. Em vista desses problemas, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema integrado portátil e robusto, capaz de realizar a espectroscopia de fluorescência induzida por laser em campo. Componentes miniaturizados foram utilizados na montagem do sistema, como um computador dedicado com um programa embarcado, junto com um espectrômetro e a fonte de luz de excitação disponível em dois comprimentos de onda, 403 nm e 532 nm. Um programa chamado de *EspectroVIS* foi escrito na linguagem de programação orientada a objetos C++ para operar o sistema. Esse programa faz a comunicação com o espectrômetro, fornece ferramentas de visualização de rápida análise e ferramentas numéricas para filtragem e detecção de picos, permitindo que os espectros coletados sejam salvos em uma imagem ou em um arquivo de texto durante a medição. O sistema foi validado através de medidas em amostras conhecidas, gerando incerteza na ordem de ± 2 nm. O projeto e o desenvolvimento do sistema integrado, bem como exemplos de aplicações do seu uso, serão apresentados ao longo desta dissertação.

Palavras-chave: Sistema Embarcado. Espectroscopia de Fluorescência. Instrumentação.

ABSTRACT

NOGUEIRA, J. M.P. **Development of an embedded system for fluorescence spectroscopy studies**: subtitle. 2020. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Fluorescence spectroscopy is an optical spectroscopic technique, applied in several areas of research. Its application is considered as a faster, non-invasive and non-destructive, having great sensitivity to physical changes and defined in groups of molecules. To make the fluorescence induction and detection, it is necessary to have a system composed of optical devices, including the excitation light and the detection system that often requires the use of a computer. This configuration is limited, when the system must be transported in field experiments. Care should be taken to ensure the component safety and optical alignment during the transport, this must be considered to ensure the reproduction of the measure. Thus, The present work aims is proposed to develop an integrated system capable of performing laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS). The system must be portable and robust, allowing it to be operated in the field. Miniaturized components were used in its assembly, such as a dedicated computer with an embedded program together with a spectrometer and the excitation light source available in two wavelengths, 403 nm and 532 nm. A program called *EspectroVIS* was written in object-oriented programming in C++ to operate the system. The program communicates with the spectrometer, provides visualization tools for rapid exploratory analysis, and numerical tools for filtering and peak detection, allowing the collected spectra be saved in an image or text file in measurement. The system was validated through measurements on known samples, generating uncertainty in the order of ± 2 nm. The design and development of the integrated system, as well as examples of applications for its use, will be presented throughout this dissertation.

Keywords: Embedded System. Fluorescence Spectroscopy. LIFS. Instrumentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Espectro magnético de frequências.....	23
Figura 2 – Processos de interação entre o feixe de luz incidente e o meio.....	26
Figura 3 – Diagrama de Jablonski simplificado explicando o mecanismo da fluorescência.....	28
Figura 4 – Ilustração demonstrando o deslocamento de Stokes.....	29
Figura 5 – Diagrama de um sistema de espectroscopia de fluorescência.....	29
Figura 6 – Diferentes espectros de fontes de luz utilizados na indução da fluorescência: A) lâmpada de arco de mercúrio, B) lâmpada halógena com filamento de tungstênio, C) lâmpada de arco de deutério, D) lâmpada de arco xênon, E) LED de 520 nm e F) laser de diodo de 532 nm.....	34
Figura 7 – Largura de banda para os filtros de interferência e de absorção.....	35
Figura 8 – Mecanismo de difração de uma rede tipo echellette.....	37
Figura 9 – Espectros de absorção da hemoglobina com níveis de sinal idênticos, composto por diferentes SNRs.....	39
Figura 10 – Sensor CCD de linha <i>ITR-511</i> , 2048 pixels, 14 X 196 micrômetros.....	40
Figura 11 – Arquitetura de software de um sistema embarcado.....	42
Figura 12 – Laser de diodo violeta <i>NDV4313E</i>	46
Figura 13 – Variações potência óptica e do pico de emissão em função da temperatura	47
Figura 14 – Dissipador projetado para condicionar o laser de diodo violeta.....	48
Figura 15 – Relação da tensão direta e corrente direta no laser violeta para diferentes temperaturas.....	48
Figura 16 – Nível de ruído apresentado na saída da fonte: A) tensão positiva e B) tensão negativa.....	50
Figura 17 – Esquema do circuito de proteção impedindo possíveis transientes de tensão no laser de diodo.....	51
Figura 18 – Configuração interna para emissão de um laser verde formado por <i>Nd:YVO₄</i>	52
Figura 19 – Laser verde <i>A-D532-50TAC863434</i>	53
Figura 20 – Suporte SMA para acoplamento óptico entre laser verde e a fibra óptica..	53
Figura 21 – Espectrômetro <i>STS VIS</i>	55

Figura 22 – Ilustração destacando o caminho de luz, bem como a forma como se distribuem as fibras de excitação e coleta na extremidade de investigação da sonda.....	57
Figura 23 – Acessórios utilizados no caminho óptico do sistema de espectroscopia de fluorescência.....	58
Figura 24 – Filtros ópticos utilizados para atenuação da luz dos lasers verde e violeta.	58
Figura 25 – Curvas de transmitância para os filtros ópticos <i>GG420</i> e <i>OG570</i>	59
Figura 26 – Computador em módulo <i>Colibri T20 256MB V1.2A</i>	61
Figura 27 – Computador em módulo na placa de suporte <i>Iris Board</i>	62
Figura 28 – <i>Display LCD touchscreen EDT display</i>	63
Figura 29 – Pinagem para interface de comunicação serial entre o <i>STS-VIS</i> e a <i>IRIS Board</i>	64
Figura 30 – Estrutura mecânica do sistema de espectroscopia de fluorescência, destacando a posição para os componentes: A) parte superior e B) parte inferior.....	65
Figura 31 – Desenho mecânico para o sistema de espectroscopia de fluorescência.....	66
Figura 32 – Sistema de espectroscopia de fluorescência finalizado.....	67
Figura 33 – Chamadas de acesso do programa embarcado através do sistema operacional.....	69
Figura 34 – Acesso ao programa <i>EspectroVIS</i>	70
Figura 35 – Inicializando o espectrômetro <i>STS-VIS</i>	70
Figura 36 – Trecho de código definindo a estrutura usada por um comando durante a comunicação com o espectrômetro.....	74
Figura 37 – Trecho de código enviando o comando para ajustar o tempo de integração no espectrômetro.....	74
Figura 38 – Gráfico em 2D mostrado exibindo um espectro típico de emissão para o laser violeta.....	77
Figura 39 – Conteúdo de arquivo texto, com a intensidade e comprimento de onda de cada ponto coletado pelo espectrômetro.....	78
Figura 40 – Configurações implementadas no programa para operação do sistema.....	79
Figura 41 – Espectro de lâmpada fluorescente com a filtragem SG habilitada.....	82
Figura 42 – Espectro de emissão apresentado pela lâmpada <i>T8 TL-D 4100K – NEUTRA – 32W/64</i>	84

Figura 43 – Espectro de emissão apresentado pela lâmpada <i>T8 MASTER TL-D ECO</i> <i>32W/840</i>	85
Figura 44 – Espectro coletado do LED Rebel 1W de cor branco.....	87
Figura 45 – Espectro coletados a partir dos LEDs Rebel 1W nas cores: A) azul, B) ciano e C) Verde.....	88
Figura 46 – Espectro coletados a partir dos LEDs Rebel 1W nas cores: A) âmbar, B) laranja e C) vermelho.....	89
Figura 47 – Espectro visualizado em acriflavina com excitação em 403nm.....	91
Figura 48 – Espectro de emissão do <i>Photogem</i> ®, utilizando diferentes tipos de solventes: A) etanol e B) água.....	93
Figura 49 – Espectro de emissão da curcumina com excitação em 403 nm.....	94
Figura 50 – Espectro de emissão típico da Rodamina 6G com excitação em 532 nm...	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

API	–	<i>Application Programming Interface</i>
ARM	–	<i>Advanced RISC Machine</i>
BSP	–	<i>Board Support Package</i>
BW	–	<i>Bandwidth</i>
CCD	–	<i>Charge Coupled Device</i>
CoM	–	<i>Computer on Module</i>
CISC	–	<i>Complex Instruction Set Computer</i>
FWHM	–	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GDI	–	<i>Graphics Device Interface</i>
GUI	–	<i>Graphical User Interface</i>
IV	–	<i>Infravermelho</i>
LCD	–	<i>Liquid Cristal Display</i>
LDR	–	<i>Light Dependent Resistor</i>
LED	–	<i>Light-Emitting Diode</i>
LSB	–	<i>Less Significant Bit</i>
LIFS	–	<i>Light Induced Fluorescence Spectroscopy</i>
MIPS	–	<i>Microprocessor without Interlocked Pipeline Stages</i>
MSB	–	<i>Most Significant Bit</i>
NIST	–	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PDA	–	<i>Photodiode Array</i>
PMT	–	<i>Photomultiplier Tube</i>
POC	–	<i>Point-of-Care</i>
RISC	–	<i>Reduced Instruction Set Computer</i>
SBC	–	<i>Single Board Computer</i>
SNR	–	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>
SoC	–	<i>System On Chip</i>
SPARK	–	<i>Scalable Processor ARChitecture</i>
UART	–	<i>Universal Asynchronous Receiver/Transmitter</i>
UV	–	<i>Ultravioleta</i>
VIS	–	<i>Visível</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Motivação.....	19
1.1 Objetivos.....	20
1.2 A estrutura da dissertação.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Interações de luz com a matéria.....	23
2.2 O fenômeno da fluorescência.....	27
2.3 Sistema para medida de fluorescência.....	29
2.3.1 A luz de excitação.....	30
2.3.2 Seletores de comprimento de onda.....	34
2.3.2.1 Filtros ópticos.....	35
2.3.2.2 Monocromador.....	35
2.3.3 Detectores de luz.....	37
2.3.3.1 Resposta espectral de um detector.....	38
2.3.3.2 A razão sinal-ruído.....	38
2.3.2.3 O tempo de resposta de um detector.....	39
2.4 O computador embarcado.....	40
2.4.1 O programa embarcado.....	42
3 O SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA PORTÁTIL.....	45
3.1 A luz de excitação do sistema de espectroscopia de fluorescência	45
3.1.1 Laser violeta.....	46
3.1.1.1 Estabilização térmica do laser violeta.....	46
3.1.1.2 A polarização do laser violeta.....	48
3.1.1.2 Circuito de proteção do laser violeta.....	51
3.1.2 Laser verde.....	52
3.2 O espectrômetro.....	54
3.3 As fibras ópticas e o suporte para os filtros ópticos.....	56
3.4 Os filtros ópticos.....	58
3.5 O Computador embarcado no sistema de espectroscopia de fluorescência.....	59

3.5.1 O computador em módulo e a placa de desenvolvimento.....	60
3.5.2 A placa de desenvolvimento <i>Iris Board</i>	61
3.5.3 A tela de visualização.....	62
3.6 A interface de comunicação entre o computador embarcado e o espectrômetro.....	63
3.7 A integração do sistema de espectroscopia de fluorescência.....	64
3.8 O programa desenvolvido para o sistema de espectroscopia de fluorescência.....	68
3.8.1 O Desenvolvimento do programa embarcado.....	68
3.8.2 A comunicação com espectrômetro.....	71
3.8.3 O gráfico apresentado pelo <i>EspectroVIS</i>	76
3.8.4 O armazenamento dos espectros coletados.....	77
3.8.5 A configuração do <i>EspectroVIS</i>	78
3.8.5.1 A seleção de janelas.....	79
3.8.5.2 O ajuste do tempo de integração.....	80
3.8.5.3 A normalização usando o método Máximo-Mínimo.....	80
3.8.5.4 A detecção de picos.....	80
3.8.5.5 O filtro de suavização Savitzky-Golay.....	81
3.8.6 Considerações adicionais sobre o programa embarcado.....	82
4 RESULTADOS.....	83
4.1 Espectros em fontes de luz artificial conhecidas.....	83
4.1.1 Espectro em lâmpadas fluorescentes.....	83
4.1.2 Espectro de diodos emissores de luz.....	86
4.2 Medidas de fluorescência em fármacos e substâncias fluorescentes.....	90
4.2.1 Acriflavina.....	91
4.2.2 <i>Photogen</i> ®.....	92
4.2.3 Curcumina.....	94
4.2.3 Rodamina 6G.....	95
5 CONCLUSÃO.....	97
5.1 Trabalhos futuros.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICE A – Esquemático da fonte de corrente do laser violeta.....	107

1 INTRODUÇÃO

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica de espectroscopia óptica aplicada na análise da fluorescência de uma determinada amostra (RAYMOND, 1983) e pode fornecer importantes informações sobre os átomos ou as moléculas em dois aspectos distintos: identificando-se o conjunto de comprimentos de onda e a quantidade de luz absorvida durante a excitação e o intervalo de comprimentos de onda e a intensidade de luz emitida durante a desativação da molécula (LAKOWICZ, 2006).

A principal característica da fluorescência emitida é que ela só depende da propriedade eletrônica da molécula que a emitiu (LAKOWICZ, 2006). Assim, a fluorescência pode ser reconhecida como uma “assinatura” da molécula. Este princípio faz com que a fluorescência seja uma técnica analítica bastante robusta na identificação de moléculas (GUILBAULT et al., 1973).

Nas últimas décadas, o uso de técnicas ópticas que utilizam fluorescência como métodos de investigação vem tornando-se bastante atrativas em diferentes áreas de pesquisas. Considerado como uma opção mais rápida, não invasiva, não destrutiva e de baixo custo operacional a espectroscopia de fluorescência têm encontrando amplo uso na análise de numerosos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial (SOTOMAYOR et. al, 2008). Exemplos de sua aplicação podem ser conferidos com destaque no auxílio de diagnósticos de doenças como neoplasias e cânceres nos tecidos biológicos (KURACHI, 2004; XIN-HUA, 2005, BORISOVA et al., 2014), na detecção de doenças e estresses em plantas (MAXWELL; JOHNSON, 2000; BAKER, 2008; RAZAVI et al., 2008), na caracterização de óleo e na contaminação de resíduos oleosos (EL-HUSSEIN, 2015; SORSTROM, 1985; KRAHENBUHL et al., 2018), no monitoramento de contaminação em carne de frango, porco e carneiro e na análise de queijos, leite e óleos comestíveis (COURROL e SAMAD, 2018; DUREK et al., 2016; LIU; METZGER, 2007), etc.

1.1 Motivação

Atualmente, a miniaturização de instrumentos analíticos com o objetivo de aplicação em análises de campo, sistemas para realização de diagnósticos do tipo *point-of-care* (POC), sistemas para análises ambientais e análises aeroespaciais, têm se tornado uma das principais tendências na indústria de tecnologia.

Os instrumentos utilizados nas medidas de fluorescência são os fluorímetros e os espectrômetros. A diferença entre eles está no resultado fornecido. O fluorímetro coleta a fluorescência emitida em pequenas bandas espectrais (WILLIAMS, 2000; LAKOWICZ, 2006) enquanto que o espectrômetro fornece uma distribuição de intensidades detectadas ao longo de uma região espectral inteira. Atualmente, os espectrômetros mais comuns fornecem a fluorescência detectada em cada comprimento de onda cobrindo a região entre o ultravioleta (UV), luz visível (VIS) e parte do infravermelho (IR) (VO-DIHN, 2003).

Em ambos os sistemas uma fonte de luz em conjunto com elemento de dispersão é utilizado na indução da fluorescência. A luz emitida pela molécula será proporcional à sua concentração, no meio em que se encontra. Desta forma a fluorescência pode ser detectada, por componentes optoeletrônicos.

O grande desafio na aplicação da espectroscopia de fluorescência, está na construção do sistema de excitação e detecção. Essa montagem pode ser facilmente concebida utilizando a infraestrutura dentro dos laboratórios de pesquisas, porém exige certa complexidade para que seja transportado até o local dos experimentos. Outro fator importante é que a grande maioria dos espectrômetros portáteis encontrados no mercado, não estão integrados com a fonte de excitação e não possibilitam a visualização dos espectros em tempo real. Estes espectrômetros necessitam de uso de um computador com programas específicos do fabricante durante sua operação, que muitas vezes estão limitados ao uso do sistema operacional. Desta forma, para compensar essas limitações é proposto nesse trabalho o desenvolvimento de um sistema de espectroscopia de fluorescência portátil que permita a realização de estudos *in-situ*.

1.2 Objetivos

Este trabalho tem por objetivo geral o desenvolvimento, a montagem e a caracterização de um sistema de espectroscopia de fluorescência para investigação de moléculas biológicas, integrando a luz de excitação e o sistema de detecção. No sistema deve ser incorporado um computador embarcado com um programa de controle dedicado. O sistema deve ser facilmente operado e robusto para ser transportado com segurança, evitando que os componentes ópticos e eletrônicos possam ser danificados.

Assim os objetivos específicos deste trabalho são definidos conforme apresentado na sequência:

- Selecionar os componentes que compõem o sistema de espectroscopia de fluorescência;

- Desenvolver e configurar a instrumentação necessária para a operação do sistema;
- Desenvolver os desenhos mecânicos permitindo o transporte, a configuração e a utilização do sistema durante aplicações em campo;
- Desenvolver um programa de controle que permita ao usuário visualizar os sinais de fluorescência em tempo real em um gráfico em duas dimensões, na faixa do espectro eletromagnético visível;
- Validar o sistema medindo espectros de fontes de luz conhecidas e substâncias fluorescentes.

1.3 A estrutura da dissertação

Este trabalho está organizado em 5 capítulos. O Capítulo 2, apresenta conceitos necessários para o entendimento e o desenvolvimento do sistema de espectroscopia de fluorescência.

No Capítulo 3 são descritos os componentes selecionados para o sistema, bem como o desenvolvimento do sistema, considerando sua estrutura de *hardware* e de *software*.

No Capítulo 4 são reportados os resultados obtidos e as discussões durante a caracterização do sistema.

No Capítulo 5 são apresentados as conclusões e as sugestões para futuros trabalhos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Interações de luz com a matéria

A luz é caracterizada de acordo com seu comportamento ondulatório ou corpuscular. Como uma onda ela apresenta os parâmetros físicos de amplitude, comprimento de onda e direção do ângulo de vibração, representando sua polarização. Como corpúsculo, ela é caracterizada por um conjunto de pacotes de energia chamados fótons (CHUNG, et al., 2012).

A energia de cada pacote é relacionada pelo comprimento de onda, conforme expresso pela Lei de Planck na Equação 1.

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1)$$

Na qual E é a energia, h a constante de Planck ($h=6,626 \times 10^{-34} J.s$), c a velocidade da luz ($c=2,998 \times 10^8 m.s^{-1}$), ν a frequência (Hz) e λ o comprimento de onda (nm) do fóton.

Na Figura 1, o espectro eletromagnético estende-se, em ordem decrescente de energia, com radiações de altíssima energia (raios-X e raio γ) com comprimentos de onda muito curtos ($10^{-10} - 10^{-15}$)m, até ondas de rádio com longos comprimentos de onda ($10^3 - 10^0$)m de mais baixa energia.

Fonte: Ronan, (2007), editado pelo autor.

A maioria dos grupos funcionais formados pelas moléculas orgânicas possuem absorção característica entre as regiões do ultravioleta (100 – 400) nm e do visível (400 – 700) nm (LAKOWICZ, 2006). A excitação é normalmente escolhida dentro do espectro ultravioleta (UV) entretanto, radiações no violeta, no azul e no verde também podem ser empregadas com o interesse de atingir grupos específicos de moléculas, por exemplo, quando se deseja atingir uma profundidade de penetração maior para análises realizadas em tecidos biológicos (BAGNATO; KURACHI; VOLLET-FILHO, 2008).

As moléculas que interagem com fótons são caracterizadas como cromóforos. Dependendo do tipo de interação observada, podem ser denominadas como absorvedores (grupos químicos que absorvem a luz e não produzem fluorescência), espalhadores (estruturas que alteram a direção do fóton incidente) e fluoróforos (grupos químicos que podem converter a luz absorvida em fluorescência).

Quando a luz se propaga em um material de determinado índice de refração (como o ar), ao incidir em outro material com índice de refração diferente, a trajetória da luz é redirecionada conforme a lei de Snell, expresso na Equação 2.

$$n_1 \text{sen} \theta_i = n_2 \text{sen} \theta_t \quad (2)$$

Em que n_1 e n_2 são os índices de refração para o primeiro e o segundo material, θ_i e θ_t correspondem aos ângulos de incidência e transmissão medidos com relação a normal à superfície.

Se a largura do feixe for pequena comparada à fronteira do material ou a sua curvatura, ocorrem processos de reflexão e transmissão da luz de forma refratada (MORIYAMA, 2011).

Na superfície da interface dois tipos de refletância podem ocorrer: reflexão especular, e reflexão difusa. Na reflexão especular, o ângulo do feixe de reflexão é igual ao ângulo do feixe incidente (em relação a normal) e é geralmente associada a superfície polida ou lisa. Na reflexão difusa, a luz se espalhada sobre superfície (a luz é emitida diferentes ângulos) está associada à reflexão de superfícies rugosas, foscas ou opacas (BLITZ, 1998). Parte da luz espalhada se propaga na direção contrária à do feixe, esse efeito é denominado como luz retroespalhada.

A refletância luminosa total é uma grandeza adimensional definida como a razão entre o fluxo luminoso refletido (reflexão especular e difusa) e o fluxo luminoso que é incidente sobre a superfície, conforme expresso na Equação 3 (SOUZA et al., 2011).

$$R_t = \frac{I_{re} + I_{rd}}{I} \quad (3)$$

Em que I é o fluxo luminoso incidido sobre a amostra, I_{re} é o fluxo especular e I_{rd} é o fluxo de luz difusa, espalhada sobre a superfície.

A luz refletida depende do ângulo de incidência do feixe, dos índices de refração dos dois materiais e da polarização da onda incidente (LAKOWICZ, 2006). Utilizando as relações de Fresnell para reflexão especular para a luz não polarizada temos que:

$$R_e = \frac{I_{re}}{I} = \frac{1}{2} \left[\frac{tg^2(\theta_i - \theta_t)}{tg^2(\theta_i + \theta_t)} + \frac{sen^2(\theta_i - \theta_t)}{sen^2(\theta_i + \theta_t)} \right] \quad (4)$$

Para uma superfície lisa e plana, quando o feixe incide com direção normal à superfície, i.e., $\theta_i = \theta_t = 0$, a reflexão é mínima, o feixe refletido tem o mesmo ângulo do feixe incidente e a equação de Fresnel é escrita conforme expresso na Equação 5.

$$R_e = \frac{(n_1 - n_2)^2}{(n_1 + n_2)^2} \quad (5)$$

A luz que atravessa o meio, também pode se espalhar ao interagir com as moléculas, os fótons que interagem são reemitidos, em geral em uma direção diferente da inicial, apresentando ou não mudança na sua energia. Caso os fótons espalhados alcancem a superfície também podem ser observados como reflexão difusa. Assim a refletância total também pode ser expressa pela Equação 6.

$$R_t = R_e + R_d \quad (6)$$

Se o meio absorvente é uma solução com uma dada concentração, geralmente dissolve-se o analito num solvente que seja transparente, como água, ou etanol, para que em seguida seja medido o quanto de luz é capaz de atravessar a amostra (PINA, 1994). Considerando apenas os processos de absorção, verifica-se que a intensidade do feixe luminoso (em função do comprimento de onda), diminui ao atravessar o meio absorvente conforme expresso na Equação 7 (MARTINHO, 1994).

$$I_t(\lambda) = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)bc} \quad (7)$$

Em que I_t é a intensidade do feixe transmitido, I_0 é a intensidade do feixe incidente sobre a superfície (feixe de luz refratada), $\varepsilon(M^{-1}.cm^{-1})$ é o coeficiente de absorção molar da espécie, $b (cm)$ é o comprimento do meio absorvente e $c (M \text{ ou } mol.l^{-1})$ é a concentração da espécie no meio.

A transmitância T , expressa na Equação 8, representa a fração da energia luminosa que consegue atravessar o material sem ser absorvida:

$$T(\lambda) = \frac{I_t}{I_0} \quad (8)$$

E a lei de Lambert-Beer, expressa na Equação 9, relaciona a absorbância, com as propriedades de opacidade da concentração (LENZ, 1997):

$$Abs(\lambda) = \varepsilon(\lambda).b.c = -\log_{10}T(\lambda) \quad (9)$$

Dessa forma, se a amostra for composta por fluoróforos, torna-se excitada absorvendo fótons de um feixe de comprimento de onda específico. Quando a amostra é desativada, pode emitir luz em forma de fluorescência, que poderá ser detectada em todas as direções. A Figura 2 exemplifica os principais processos que ocorrem na interação da luz com um meio.

Figura 2 – Processos de interação entre o feixe de luz incidente e o meio.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

2.2 O fenômeno da fluorescência

A teoria quântica mostra que a energia das moléculas é quantizada em certos valores, e eles dependem da diferença de energia entre os níveis eletrônicos envolvidos na transição.

Quando ocorre uma transição eletrônica, a molécula deve, portanto, absorver ou emitir a diferença de energia, de acordo com a relação expressa na Equação 10:

$$\Delta E = E_1 - E_2 \quad (10)$$

Sendo que E_1 e E_2 correspondem respectivamente as energias dos estados eletrônicos final e inicial.

Quando os fótons são absorvidos pela estrutura eletrônica da molécula, a mesma é levada a estados quânticos excitados e menos estáveis. Após um determinado tempo, há o retorno da molécula ao estado fundamental. Para a molécula excitada atingir sua estabilidade eletrônica, ela deve dissipar a energia absorvida por processos de decaimentos radioativos e ou não radioativos (WILLARD, 1988).

Os processos de decaimento não radioativos envolvem vibrações, rotações e translações da molécula ou transferência de energia às moléculas vizinhas por colisões intermoleculares. A energia dissipada nesses processos está distribuída no espectro eletromagnético, desde radiações no infravermelho próximo até o infravermelho distante (LAKOWICZ, 2006).

Os processos radioativos envolvem a emissão de fótons e são conhecidos como luminescência. Quando a fotoemissão ocorre entre dois estados quânticos de diferentes multiplicidades da molécula (entre singlete e tripleto), ela é chamada fosforescência. Quando só depende dos estados de mesma multiplicidade (entre singletos ou entre tripletos), ela é chamada fluorescência. Em geral, a fluorescência ocorre com maior probabilidade que a fosforescência, por isso é mais comum de ser observada. Algumas características distinguem os dois fenômenos, como o tempo de vida, por exemplo. A emissão da fluorescência evanesce na ordem de nanossegundos, enquanto que a da fosforescência pode durar até alguns segundos (ATKINS; DE PAULA, 2004). O tempo de vida (τ) de um fluoróforo é o tempo médio entre a sua excitação e retorno ao estado fundamental.

O processo que ocorre entre a absorção e a emissão da luz durante a fluorescência é representado pelo Diagrama de Jablonski simplificado e pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 – Diagrama de Jablonski simplificado explicando o mecanismo da fluorescência

Fonte: Lakowicz (2006), editado pelo autor.

A luz com um determinado comprimento de onda da região espectral, entre 400 nm a 700 nm, é absorvida pela amostra, com transições tipicamente da ordem de femtossegundos ($10^{-15}s$), elevando os elétrons da molécula para o estado excitado S_2 , em seguida a molécula tende a se estabilizar dissipando energia, por meio de cruzamento interno. Todo esse processo ocorre em picossegundos ($10^{-12}s$). Quando a diferença energética entre o mais baixo nível vibracional do estado excitado S_1 for relativamente grande em relação ao estado fundamental S_0 , a desativação da molécula ocorre através de radiação em um comprimento de onda maior, com menor energia, esse processo ocorre na ordem de dezenas de nanossegundos ($10^{-9}s$).

Deste modo, pode-se afirmar que a fluorescência ocorre em energias menores ou comprimentos de onda maiores. Este fenômeno foi primeiramente observado por G. G. Stokes em 1852 (LAKOWICZ, 2006). A Figura 4 ilustra o deslocamento de Stokes (*Stokes Shift*), essa característica óptica é importante para diferenciar os espectros de absorção e emissão para cada molécula estudada.

Figura 4 – Ilustração demonstrando o deslocamento de Stokes

Fonte: Pavoni (2014), editado pelo autor.

Uma propriedade importante da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão é geralmente observado, independente do comprimento de onda de excitação. Os tempos de excitação e relaxamento da molécula são extremamente rápidos e a molécula só emite radiação a partir do estado de mais baixa energia. Por outro lado, ao selecionar comprimentos de onda mais próximos aos picos de absorção das moléculas, durante a excitação, significa que mais fótons poderão ser absorvidos, isso resulta numa maior intensidade durante a emissão da fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

2.3 Sistema para medida de fluorescência

Na configuração de um sistema para medidas de fluorescência são necessários uma fonte de radiação externa, seletores de comprimento de onda e um elemento fotodetector. Na Figura 5 é possível, verificar o diagrama para a instrumentação utilizada durante a espectroscopia de fluorescência.

Figura 5 – Diagrama de um sistema de espectroscopia de fluorescência

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

No arranjo, a radiação de comprimento de onda selecionado atravessa e excita a amostra que produz a emissão de radiação característica, a qual é normalmente medida a um ângulo de

90°, evitando a saturação do fotodetector. Entretanto, a fluorescência também pode ser detectada em outras direções, por exemplo durante a caracterização de amostras turvas ou opacas. (RENDELL; MOWTHORPE, 1987; KURACHI, 2004).

Na detecção de fluorescência, é comum o emprego de fibras ópticas, tanto na excitação como na coleta dos sinais emitidos. Os espectros de absorção e emissão estão localizados em comprimentos de onda distintos no espectro eletromagnético. A análise espectral permite uma análise detalhada da luz, com a obtenção da intensidade para cada comprimento de onda, adquiridos nesse caso para cada ponto analisado.

O espectrômetro, assim como espectrofluorímetro é um instrumento espectroscópico que utiliza um elemento de dispersão (monocromador), juntamente com um transdutor para converter as intensidades radiantes em sinais elétricos. Diferente dos espectrofotômetros, equipamentos direcionados para medidas de absorbância e transmitância em função do comprimentos de onda, os espectrômetros são instrumentos que operam sobre uma ampla faixa de comprimentos de onda, medindo de forma quase contínua a intensidade de cada λ (MARTINHO, 1994; SKOOG et al., 2006; RANGEL; MERCON, 2012). Filtros ópticos do tipo passa-alta são utilizados para atenuar a luz que é retroespalhada pela amostra avaliada, permitindo uma melhor visualização dos sinais de interesse.

A radiação que passa através de fenda de entrada retangular, é colimada pelo espelho côncavo e atinge a superfície do monocromador. No monocromador, ocorre uma dispersão angular que promove a separação das radiações de diferentes comprimentos de onda no qual são focalizados no elemento detector. No detector os sinais analógicos são convertidos em sinais elétricos, que representam os níveis de intensidade para cada comprimento de onda. Finalizada a conversão, o espectro obtido é transmitido para um computador com programa dedicado que normalmente é utilizado para a visualização dos espectros.

2.3.1 A luz de excitação

No sistema de espectroscopia de fluorescência a fonte de luz deve ser estável para originar um feixe de radiação com potência suficiente para induzir a excitação das moléculas sem oscilação de intensidade ou deslocamentos no comprimentos de onda.

Usualmente, na excitação das moléculas são empregadas fontes de luz com banda de emissão bastante estreita, como lâmpadas de linhas, lasers ou LEDs. As lâmpadas de espectro contínuo, também podem ser utilizadas, desde que sejam aplicadas em conjunto com um filtro óptico ou um monocromador que permita isolar o comprimento de onda desejado

(LAKOWICZ, 2006). A monocromaticidade dos emissores possibilita uma maior seletividade de excitação dos fluoróforos tornando a medida mais eficiente, portanto, mais evidente a sua identificação (BAGNATO; KURACHI; VOLLET-FILHO, 2008). Este método de excitação é conhecido como *Light Induced Fluorescence Spectroscopy* (LIFS).

As lâmpadas de linhas, como as de arco de mercúrio, geram luz através da descarga de uma corrente elétrica através de um gás ionizado, produzem espectros discretos e emitem a maior parte de sua radiação em comprimentos de onda específicos, que correspondem às características de emissão espectral dos átomos ou dos íons excitados. Podem ser aplicadas na excitação dos fluoróforos ou na calibração dos espectrômetros (SKOOG et al., 2006).

As lâmpadas de espectro contínuo, emitem radiação em uma ampla faixa espectral, embora a intensidade radiante varie com o comprimento de onda. A lâmpada de tungstênio, emite radiação devido ao aquecimento do filamento. A sublimação do tungstênio em altas temperaturas (2500 ~3000 °C) permite a emissão de alta intensidade desde IR até a região do UV. Na lâmpada de deutério, a corrente de descarga entre um filamento e um eletrodo metálico excita as moléculas de deutério, que se dissociam liberando energia na forma de um espectro contínuo na região UV (SKOOG et al., 2006). Na lâmpada de xenônio a descarga ocorre em eletrodos de ânodo e cátodo voltados um para o outro. Quando a eletricidade passa pelo gás ionizado de xenônio, a lâmpada emite radiação na região do UV, VIS e IR (LAKOWICZ, 2006).

Lâmpadas como as de xenônio oferecem um espectro de emissão entre 185 a 2000 nm (ZHANG; BOYD, 2000). As lâmpadas de deutério e tungstênio fornecem radiação compreendida entre 160 e 380nm e 320 a 2500 nm, respectivamente e são as mais empregadas nas espectrofotometria do UV e VIS (VITOLO, 2015).

No acionamento das lâmpadas de deutério ou de xênon, é necessário que a fonte de alimentação produza picos de alta tensão que permitam a ionização do gás dentro da lâmpada. Nas lâmpadas de deutério a tensão de partida alcança pulsos de 300 a 500 V, enquanto que na lâmpada de xênon os pulsos podem alcançar de 20 a 40 kV. Estas tensões são perigosas e letais, podem interferir e até danificar os sensíveis componentes eletrônicos próximos a lâmpada (LAKOWICZ, 2006).

O tempo de vida da fonte de luz é alcançado quando a intensidade da radiação diminui em 50% do valor nominal. Os emissores de estado sólido possuem um tempo de vida maior, alcançando até 100.000 horas (RATIVA et al., 2007; CHAWLA, 1999). As lâmpadas de deutério possuem o tempo de vida curto em torno de 1000 horas (ZHANG; BOYD, 2000) em

relação as lâmpadas de xênon ou as lâmpadas halógenas de tungstênio que possuem um tempo de vida em torno de 2000 horas (LAKOWICZ, 2006; KARWOWSKI, 2006).

As lâmpadas de filamento de tungstênio, são as mais susceptíveis a flutuações de intensidade, e tendem a mudar sua emissão (ocorre o deslocamento do espectro) com a temperatura (SKOOG et al., 2006). Quando utilizadas, para evitar as flutuações de emissão da fonte, é necessário que o filamento atinja uma temperatura constante, desta forma, recomenda-se ligar a lâmpada no mínimo 10 minutos antes de efetuar as medidas (BERGAMIN FILHO et al., 2010).

Os diodos emissores de luz (do inglês *Light Emitting Diode* - LED), são diodos formados por uma junção do tipo p-n. A polarização direta faz com que a região de depleção se estreite, possibilitando o transporte de carga. Esta mobilidade cria a possibilidade de recombinação entre os elétrons e as lacunas (antes separados pela barreira da junção), liberando a energia na forma de fótons. O efeito é chamado de eletroluminescência e a cor da luz (correspondente à energia do fóton) é determinado pela diferença no *gap* de energia do semicondutor. (CHUNG et al., 2012). O mecanismo de interação de elétrons com fótons nesse dispositivo é denominado como emissão espontânea. Na emissão espontânea, o retorno do átomo ao estado de repouso acontece em um intervalo de tempo aleatório, e o fóton resultante tem fase também aleatória. Embora os LEDs apresentem uma largura de banda bastante estreita, sua banda de emissão espectral é bem maior quando comparado com a do laser.

O laser é dispositivo cujo a luz é amplificada pela emissão estimulada de radiação, produzindo um feixe colimado coerente, monocromático e direcional. Inicialmente, para que ocorra a ação do laser é necessária a inversão de população dos átomos no meio ativo. No laser de diodo o meio ativo consiste de um material semicondutor e a técnica mais comum, emprega uma corrente de injeção através de uma junção p-n (CATALANI, 1997). Com baixa corrente, o laser de diodo emite luz fraca, incoerente e espacialmente ampla (banda larga), nessa região ocorre a emissão espontânea, semelhante ao LED (CHAWLA, 1999). Uma cavidade ressonante constituída por um espelho e um semi espelho nas extremidades do diodo confina os fótons (produzidos a princípio por emissão espontânea) em uma pequena região, no qual é possível selecionar um comprimento de onda (TUBOY, 1990). Se o estado excitado do átomo é perturbado pelo campo elétrico de um fóton durante sua desativação, ele pode libertar um “segundo” fóton com a mesma frequência, fase, amplitude e polarização do fóton que o perturbou. Quando a corrente de polarização atinge um determinado limiar, conhecido como corrente de *threshold*, a saída de luz aumenta rapidamente com a corrente. Este processo é conhecido como emissão estimulada.

Os LEDs e os lasers, geralmente emitem radiação em um único comprimento de onda, portanto não necessitam de filtros ou monocromadores durante a excitação, mas devem ser escolhidos considerando a banda de absorção das moléculas que serão investigadas. Assim como os LEDs, os lasers de diodo são bastante eficientes, oferecendo a vantagem de emitirem em uma banda de emissão bem mais estreita, dessa forma é possível assegurar que o espectro de emissão da fonte de luz refletido na amostra, não sobreponha o espectro de fluorescência apresentado por ela. Outra importante consideração em relação aos lasers é que o feixe é colimado e direcional, esta característica facilita o acoplamento com as fibras ópticas. Ao propagar por um guia de onda, a potência da luz pode sofrer atenuação, principalmente causadas por flutuações microscópicas nos índices de refração ao longo da fibra, que ocasionam espalhamentos do tipo Rayleigh (YOUNG, 1998). A potência óptica gerada pelos lasers é suficiente para contrabalançar as perdas intrínsecas da fibra e as perdas dos acoplamentos e ainda fornecer a radiação necessária para a excitação das moléculas.

Na Figura 6, podem ser comparados diferentes espectros de fontes de luz utilizados na indução da fluorescência.

Figura 6 – Diferentes espectros de fontes de luz utilizados na indução da fluorescência: A) lâmpada de arco de mercúrio, B) lâmpada halógena com filamento de tungstênio, C) lâmpada de arco de deutério, D) lâmpada de arco de xênon, E) LED de 520 nm e F) laser de diodo de 532 nm

Fontes: A) Peters (1979), B) Thoms; Girwidz (2013), C) Wong (1985), D) Presciutti, et al. (2014), editado pelo autor, E) e F) elaborado pelo autor (2020).

2.3.2 Seletores de comprimentos de onda

Os seletores de comprimentos de onda são empregados em muitos instrumentos para isolar a banda de comprimento de onda desejada de forma que somente essa banda de interesse é detectada e medida. Os principais seletores de comprimentos de onda utilizados em espectroscopia são os filtros ópticos e monocromadores.

2.3.2.1 Filtros ópticos

Os filtros ópticos operam pela absorção de toda a radiação de uma fonte contínua com exceção de uma banda estreita. A radiação transmitida, tem largura de banda efetiva geralmente de 10-50 nm, podem ser aplicados tanto para selecionar a luz excitação, quanto para a análise da luz de fluorescência (SKOOG et al., 2006).

Dois tipos de filtro são empregados em espectroscopia: filtros de interferência e filtros de absorção. Os filtros de interferência, apresentam como vantagens bandas passantes mais estreitas e melhor transmissão de radiação e são tipicamente utilizados para medidas de absorção, sendo que eles geralmente transmitem uma fração muito maior de radiação nos seus comprimentos de onda nominais do que fazem os filtros de absorção.

A Figura 7, mostra a diferença na largura de banda para os filtros de interferência e de absorção.

Figura 7 – Largura de banda para os filtros de interferência e de absorção

Fonte: Skoog et al. (2006), editado pelo autor.

2.3.2.2 Monocromador

Os monocromadores são dispositivos ópticos compostos por duas fendas estreitas para entrada e saída de radiação. Internamente um elemento de dispersão composto de um prisma ou uma rede de difração, desvia o feixe de um ângulo que depende de um comprimento de onda.

Girando-se a rede, os comprimentos de onda diferentes podem ser dirigidos para a fenda de saída (SKOOG et al., 2006).

O comprimento de onda de saída de um monocromador pode ser variado continuamente sobre uma faixa espectral considerável. A faixa de comprimento de onda selecionada por um monocromador é denominada banda de passagem espectral ou largura de banda efetiva, apresentam resolução óptica na faixa de 1 a 20 nm dependendo do custo do instrumento.

Os monocromadores mais utilizados nos espectrômetros são o Czerny-Turner (ou de rede) e Bunsen (de prisma), muito utilizados em equipamentos antigos (SKOOG et al., 2006).

No monocromador prismático a radiação policromática que passa pela fenda de entrada incide sobre a face de um prisma, sofrendo refração. No violeta, a sílica e alumina são os únicos materiais sólidos com transparência e dispersão adequados. A sílica pode ser usada tanto como quartzo como em forma vítrea. A alumina é usada em forma de safira artificial. Na região do visível, os vidros ópticos tem desempenho superior a sílica e a safira, quando comparados em relação a dispersão (EWING, 1972).

No monocromador reticular o principal elemento de dispersão é a rede de difração. Uma rede aplicada para as regiões do ultravioleta e visível é composto por 300 a 2.000 ranhuras/mm, com 1.200 a 1.400 sendo os números mais comuns. A construção de uma rede de difração de boa qualidade tem um elevado custo, é demorada de fabricar devido as ranhuras apresentarem tamanhos idênticos, serem exatamente paralelas e igualmente espaçadas ao longo da rede. A partir de uma rede mestra, são produzidas redes de réplicas a base de resina, nas quais preservam-se perfeitamente sua exatidão óptica. A superfície da resina torna-se refletora pelo recobrimento com alumínio, ouro ou platina (SKOOG et al., 2006).

Um dos tipos mais comuns de rede refletora é a do tipo echellette que é construída de forma que as ranhuras apresentem faces relativamente largas a partir das quais a reflexão ocorre. Essa geometria fornece uma difração muito eficiente da radiação. Na Figura 8, um feixe paralelo de radiação monocromática incide sobre a superfície com um ângulo i em relação à normal da rede. O feixe incidente é constituído por três feixes paralelos que criam uma frente de onda denominados 1, 2 e 3.

Figura 8 – Mecanismo de difração de uma rede tipo ecchelette

Fonte: Skoog et al. (2006), editado pelo autor.

O ângulo i a partir da normal à rede é aquele do feixe incidente; a distância entre as ranhuras sucessivas é indicada pela letra d . O feixe difratado é refletido com um ângulo r , o qual depende do comprimento de onda da radiação é expresso pela Equação 11.

$$n\lambda = d(\text{sen}i + \text{sen}r) \quad (11)$$

A linha de primeira ordem ($n = 1$), é a mais intensa, sendo possível construir-se redes que concentrem cerca de 90% da intensidade incidente nessa ordem. As linhas de ordens superiores podem ser removidas com a ajuda de filtros ópticos (SKOOG et al., 2006).

2.3.3 Detectores de luz

Na detecção de fluorescência, um sensor deve ser capaz de medir a radiação luminosa fornecida pela amostra.

Os elementos detectores nos espectrômetros são transdutores que tem a função de converter a radiação luminosa em sinais eletrônicos. Um detector ideal deve apresentar a resposta para uma faixa considerável de comprimentos de onda, baixa sensibilidade a variações térmicas e alta sensibilidade ao sinal desejado (BERGAMIN FILHO et al., 2010). O sinal elétrico produzido pelo detector deve ser proporcional à intensidade de radiação I conforme expresso na Equação 12.

$$G = KI \quad (12)$$

Assim, G é a resposta elétrica em termos de corrente, voltagem ou resistência e k é uma constante de calibração.

2.3.3.1 Resposta espectral de um detector

A resposta espectral é a faixa de comprimentos de onda recebido de um feixe de luz que um determinado detector pode converter em energia elétrica. A resposta espectral em um detector depende diretamente de suas propriedades (BASS, 2009). A Tabela 1 mostra diferentes materiais utilizados como detectores e sua resposta espectral.

Tabela 1 – Diferentes respostas espectrais para detectores de fótons.

Material	Intervalo de comprimentos de Onda (nm)
Fototubos	150-1000
Tubos Multiplicadores	150-1000
Fotodiodos de Silício	450-1100
Células Fotocondutivas	1000-50000

Fonte: Skoog (2006), editado pelo autor.

2.3.3.2 A razão sinal-ruído

Geralmente, a saída de um instrumento analítico flutua de forma aleatória em consequência da ação de um grande número de variáveis incontroláveis. Essas flutuações, que limitam a sensibilidade de um instrumento, são denominadas ruído (SKOOG et al., 2006). A razão sinal-ruído (do inglês *signal-to-noise ratio* - *SNR*) geralmente é definida como a razão entre o valor médio da saída do detector e o valor do desvio padrão do sinal apresentado por ele. Na Figura 9 é possível observar diferentes níveis de SNRs para os espectros de absorção da hemoglobina. Na imagem as curvas possuem níveis de sinais idênticos e foram deslocadas no eixo das absorbâncias, para permitir melhor clareza.

Figura 9 – Espectros de absorção da hemoglobina com níveis de sinal idênticos, composto por diferentes SNRs

Fonte: Skoog et al. (2006), editado pelo autor.

2.3.3.3 O tempo de resposta de um detector

A velocidade de resposta de um detector é relacionada ao tempo de subida e ao tempo de descida do sinal de saída. O tempo de subida é o intervalo que o sinal de saída leva para subir de 10% a 90% do seu valor de pico, quando a luz incidente é ligada instantaneamente. Do mesmo modo, o tempo de descida é medido quando o feixe de luz é interrompido e o sinal de saída decai de 90% a 10% do seu valor de pico (BASS, 2009).

Quando um detector recebe luz modulada em certa frequência, emitida a partir de um laser ou qualquer outra fonte de luz, a frequência de corte deste fotodetector é definida como a frequência na qual seu sinal de saída cai 3dB em relação ao nível máximo. O intervalo de 0Hz até a frequência de corte com que o detector responde é chamado largura de banda (do inglês

Bandwidth- BW) e o nível máximo de sinal é definido quando a luz incidida sobre o detector permanece ligada ininterruptamente (BASS, 2009).

O tempo de resposta do detector é muito importante em medidas de fluorescência resolvida no tempo, nas quais deseja-se medir o tempo de vida dos fluoróforos (LAKOWICZ, 2006).

Entre os detectores constantemente usados na detecção de fluorescência estão o fotodiodo, o fototransistor, a fotomultiplicadora (do inglês PMT - *photomultiplier tube*), o LDR (do inglês *Light Dependent Resistor*), o PDA (do inglês *Photodiode Array*) e a CCD (do inglês *Charge Coupled Device*)(WILLIAMS,2000; LAKOWICZ, 2006, SKOOG et al., 2006).

Os sensores do tipo PDA e a CCD, são bastante utilizados nos espectrômetros do tipo multicanais, disponíveis atualmente no mercado (LAKOWICZ, 2006, SKOOG et al., 2006). Possuem como principal característica a captação simultânea da luz que é dispersa pela rede de difração. Assim, a radiação transmitida pela amostra é uma curva ou um espectro de múltiplos pontos, dentro de um intervalo de comprimentos de ondas.

No sensor CCD *ITR-511* (*Imagica Technology Inc.*, 2020), mostrado na figura 10 o tempo de integração é definido como a duração do período para coleta dos fótons que são captados por cada *pixel* da CCD. Quanto maior o tempo de integração, mais intenso é o sinal na saída da CCD e conseqüentemente o componente demora mais tempo para entregar sua resposta.

Figura 10 – Sensor CCD de linha *ITR-511*, 2048 pixels, 14 X 196 micrômetros

Fonte: *Imagica Technology Inc.* (2020).

2.4 O computador embarcado

Um computador com um programa dedicado permite a aquisição, a visualização a análise e o armazenamento dos dados transmitidos pelo espectrômetro. Na miniaturização do sistema, computadores de pequeno porte como notebooks e *tablets*, poderiam ser usados nessa tarefa, porém algumas dificuldades com relação ao seu tamanho, o peso, o consumo de energia

e o custo, inviabilizaram o uso desses equipamentos. Estes computadores embora sejam pequenos, possuem especificações e recursos para aplicações genéricas e muitas das funções incorporadas por eles não são necessárias no projeto do sistema.

Um sistema embarcado, também conhecido como sistema embutido é um sistema microprocessado no qual o computador é completamente encapsulado ou dedicado e especializado no dispositivo ou sistema que ele controla (BORRIELLO; CHOU; ORTEGA, 1995), possui dimensões físicas bastante reduzidas quando comparadas com um computador comum, operam com baixo consumo energético e possuem custo bastante inferior.

O desenvolvimento da indústria eletrônica vem permitindo a evolução e a miniaturização dos computadores para atender as mais diversas necessidades da pesquisa e da tecnologia.

Na década de 80, os projetistas contavam com duas arquiteturas para processadores, CISC (do inglês *Complex Instruction Set Computer*) e RISC (do inglês *Reduced Instruction Set Computer*) (TANENBAUM; AUSTIN, 2013). Os processadores com arquitetura CISC possuem um conjunto grande de instruções reconhecidas pelo processador, e com isso é possível uma minimização de complexidade no desenvolvimento de compiladores para linguagem de máquina, os programas possuem códigos fonte reduzidos. Na arquitetura RISC, o objetivo é fazer com o que o processador trabalhe com um conjunto reduzido de instruções, operando mais rapidamente e com uma pequena quantidade nos modos de endereçamento, a maior parte das instruções pode ser executada em um único ciclo de *clock*, os compiladores criam códigos de máquinas maiores porém mais otimizados para trabalhar com as instruções existentes (PATTERSON; DITZEL, 1980; EL-AAWAR, 2006; TANENBAUM; AUSTIN, 2013). Essas arquiteturas se mantêm atualmente e muitos fabricantes tem misturado as características delas para obterem melhores desempenhos, principalmente em aplicações de baixo custo (TANENBAUM; AUSTIN, 2013).

Devido a sua versatilidade, os processadores com arquitetura RISC obtiveram inúmeras vantagens no desenvolvimento de sistemas embarcados de pequeno e médio porte como *handheld PC*, telefones celulares, *Smart tvs*, *tablets*, calculadoras, videogames *consoles*, etc. (COHEN, 2014). Processadores como *Advanced RISC Machine* (ARM), *Microprocessor without Interlocked Pipeline Stages* (MIPS) e *Scalable Processor ARChitecture* (SPARK) de 32 e 64 bits, estão entre as principais famílias de processadores RISC utilizadas atualmente. Cada arquitetura pode ser comparada e classificada de acordo com o conjunto de registradores

e instruções, modo de endereçamento e modo de operação e consumo de energia (EL-KADY; KHATER; ALHAFNAWI, 2014).

Sistemas embarcados constituídos de componentes integrados do tipo *System On Chip* (SoC), são oferecidos em placas de desenvolvimento do tipo *Single Board Computer* (SBC) ou em *Computer on Module* (CoM), podem encapsular em um único circuito integrado o núcleo do processador em conjunto com memória, aceleradores de funções por *hardware* e funções de periféricos, como portas de entrada e saída digital, leitores de cartão SD, protocolos de comunicação UART/I2C/SPI/USB/*Ethernet* e funções para conversores analógico digitais (AD) e digitais analógicos (DA).

2. 4.1 O programa embarcado

Como o *hardware* embarcado, a arquitetura do *software* embarcado é altamente flexível. Um programa simples embarcado é adequado para o *hardware* com o *chip* de baixo desempenho, possui funcionalidade muito limitada (como brinquedos eletrônicos, calculadoras etc.), pode ter apenas alguns milhares de linhas de código e executar funções simples de entrada e saída. Por outro lado, sistemas embarcados complexos (como smartphones, robôs etc.) precisam de uma arquitetura de *software* mais complexa, semelhante aos computadores e servidores de mesa, precisam de interfaces mais convenientes para os usuários e exigem o suporte de *hardware* mais poderoso (COHEN, 2014).

Tipicamente a arquitetura de um programa rodando em um sistema embarcado é mostrada na Figura 11.

Figura 11 – Arquitetura de *software* de um sistema embarcado

Fonte: Cohen (2014), editado pelo autor.

Um sistema de *software* embarcado é composto de quatro camadas: camada de aplicação, camada de serviço, camada do sistema operacional e a camada de abstração de hardware. No nível mais baixo dessa estrutura de camadas de *software* existe um conjunto de programas que são executados pelo processador quando o computador é ligado. Estes programas inicializam outros subsistemas de hardware para um estado conhecido e configuram o computador para o seu correto funcionamento (CATSOULIS, 2009).

A camada de abstração de hardware HAL (do inglês *hardware abstraction layer*), é uma camada de abstração de *software* entre o *hardware* e o sistema operacional. Na camada de HAL é incluída o gerenciador de inicialização (do inglês *bootloader*), o pacote de suporte da placa (BSP), os drivers de dispositivo e outros componentes.

O BSP (do inglês *board support package*) alcança a abstração da operação de *hardware*, permitindo que o SO seja independente, executado em diferentes arquiteturas de *hardware*, cada arquitetura portanto devem possuir o seu conjunto de arquivos BSP. O BSP fornece uma estrutura de arquivos e inicializa vários sistemas, incluindo o processador, quaisquer barramentos de comunicação, relógios e memória, além de iniciar o *bootloader*.

Semelhante ao BIOS nos PCs, o gerenciador de inicialização é um programa que é executado antes da execução do *kernel* do sistema operacional (SO). Finalizado a inicialização do hardware, a imagem do espaço na memória é estabelecida, permitindo que o ambiente de *hardware* e *software* alcancem um estado apropriado para o agendamento final do *kernel*.

Na camada do sistema operacional o *kernel* faz a inicialização para os *drivers* dos dispositivos embutidos na placa, permite gerenciar a memória e os recursos de entrada / saída, no *hardware* de bordo e os periféricos externos (DUTTA et al., 2014).

O sistema operacional é um sistema de *software* que gerencia os recursos do *hardware*, abstrai e habilita muitas funções de *hardware* e as fornece aos aplicativos na forma de serviços (COHEN, 2014).

Os sistemas operacionais são amplamente utilizados na maioria dos computadores e sistemas embarcados. Quando aplicados nos sistemas embarcados, o sistema operacional possui características próprias: estabilidade, customização, modularidade e processamento em tempo real. Entre os sistemas operacionais comumente utilizados nos sistemas embarcados, estão o *Linux*, *Windows CE*, *VxWorks*, *MeeGo*, *Tizen* o *Android*, etc.

A camada de serviço é a interface que o sistema operacional fornece ao aplicativo. Usando essa interface, os aplicativos podem acessar vários serviços fornecidos pelo sistema operacional. Até certo ponto, ele desempenha o papel de um *link* entre o SO e os aplicativos

(COHEN, 2014). Essa camada geralmente inclui o sistema de arquivos, a interface gráfica do usuário GUI (do inglês *graphical user interface*), o gerenciador de tarefas e assim por diante.

A camada do aplicativo é a camada superior na hierarquia de *software*. De uma perspectiva funcional, todos os níveis de módulos no aplicativo visam executar as funções sobre o sistema operacional.

Cada aplicativo é um processo separado do sistema operacional, e normalmente são executados em modos menos privilegiados usando um sistema de APIs (do inglês *Application Programming Interface*) para interagir com os recursos do sistema operacional (COHEN, 2014).

3 O SISTEMA DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PORTÁTIL

No sistema de espectroscopia de fluorescência portátil é necessário garantir a correta medição durante a indução e detecção da fluorescência, mesmo após o transporte até o local da medida. O sistema deve ser configurado de tal maneira que possa ser facilmente utilizável e protegido contra vibrações, sem causar danos ou desalinhamentos ópticos no caminho da luz de excitação bem como no caminho óptico da detecção.

Na integração do sistema, foram escolhidos componentes leves e robustos, providos de conectores que permitem o encaixe das fibras ópticas. Os componentes ópticos são de alta confiabilidade, possuem resposta espectral dentro do visível, entre 400 nm e 700 nm. No sistema foram utilizados duas fontes de luz na excitação em 405 nm e 532 nm, permitindo melhor seletividade para diferentes grupos de moléculas. Um espectrômetro comercial foi selecionado devido a sua robustez e tamanho e por permitir detectar sinais de fluorescência de baixa intensidade com nível baixo de ruído.

Os circuitos eletrônicos foram confeccionados e medidos para garantir a correta alimentação e a baixa flutuação na fonte de luz de excitação e um computador embarcado com um programa de controle foi avaliado, durante a comunicação com o espectrômetro e a operação do sistema.

3.1 A Luz de excitação do sistema de espectroscopia de fluorescência

Na fonte de luz de excitação, foram utilizados emissores de estado sólido devido as vantagens que esses componentes trazem em relação as lâmpadas de linha e de espectro contínuo, considerando o tempo de vida de operação, o acionamento elétrico e a resistência física dos componentes já que choques e vibrações podem quebrar facilmente o filamento ou o frágil tubo de vidro das lâmpadas.

Os lasers de diodo possuem baixa voltagem e baixo consumo de energia, o que os tornam bastante adequados para uso em pequenos equipamentos. No sistema, foram utilizados dois lasers, um verde e outro violeta. A excitação com os dois comprimentos de onda, permite excitar um grande número de moléculas orgânicas, com fluorescência mensurável dentro do espectro visível (LAKOWICZ, 2006).

O sistema permite realizar a medida com um laser de cada vez e posteriormente as medidas dos espectros coletados podem ser comparadas durante as análises.

3.1.1 Laser violeta

O laser de diodo *NDV4313E* (*NICHIA CORPORATION*, Japão) é mostrado na Figura 12, possui o pico de emissão no violeta próximo a 405 nm, sendo conferido em 403 nm, com potência óptica de até 120 mW, operando em modo contínuo. Esse laser possui o encapsulamento no formato CAN 5.6 mm.

Figura 12 – Laser de diodo violeta *NDV4313E*

Fonte: *Nichia*, (2020).

O laser de diodo é um componente óptico eletrônico cuja a potência luminosa e o pico de emissão são muito sensíveis as variações de corrente ou temperatura. O controle dessas duas grandezas definem a sua estabilização primária (TUBOY, 1990).

3.1.1.1 Estabilização térmica do laser violeta

A potência luminosa na saída do laser é proporcional a corrente que circula através da junção p-n. Quanto mais corrente é injetada no emissor mais a temperatura da junção aumenta e caso não seja estabilizada, a potência óptica tende a diminuir com o aumento da temperatura (CHAWLA, 1999).

O aumento da temperatura, também ocasiona alteração no pico de emissão (nm) do laser de diodo. Essas flutuações de potência óptica e do pico de emissão podem alterar a forma como as moléculas reagem durante absorção, ocasionando respostas diferentes nos espectros de fluorescências apresentado pela amostra (LAKOWICZ, 2006). Na figura 13 é possível observar como a potência óptica e o pico de emissão na saída do laser são alterados em função da temperatura.

Figura 13 – Variações potência óptica e do pico de emissão em função da temperatura

Fonte: Nichia, (2020), editado pelo autor.

No laser de diodo a estabilização de temperatura é realizada controlando a temperatura no encapsulamento. A estabilização térmica da temperatura mantém a potência fixa com o pico de emissão constante para uma mesma corrente de polarização, além de prevenir que o componente trabalhe em temperatura excessiva, o que pode degradar a vida útil do laser em curto prazo de operação, normalmente considera-se aproximadamente o fator de 5 para um aumento de uma década (10°C) na temperatura (WIEMANN; HOLLBERG, 1991).

No sistema de espectroscopia de fluorescência um dissipador foi usinado no *software SolidWorks* (Dassault Systemes S.A., França), para o condicionamento térmico do laser de diodo violeta, garantindo sua operação dentro das condições térmicas permitidas pelo fabricante. O desenho mecânico do dissipador é mostrado na Figura 14. A troca de calor com o dissipador permite ao laser manter a temperatura estável em torno de 28°C , operando com sua corrente nominal direta (I_d) de aproximadamente $\sim 120\text{ mA}$. Na parte superior, uma rosca é torneada para entrada dos conectores SMA utilizados pela fibra óptica.

Figura 14 – Dissipador projetado para condicionar o laser de diodo violeta

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

3.1.1.2 A polarização do laser violeta

O controle de corrente que passa através da junção p-n no laser de diodo é feito com um regulador de corrente. No acionamento do laser é preferível utilizar reguladores de corrente ao invés de reguladores de tensão (CHANG, 2005). Os lasers de diodo possuem resistência dinâmica muito pequena. Se ocorre uma pequena alteração na tensão aplicada, há muito maior mudança no nível de corrente. Por esse motivo, a polarização do laser depende principalmente da corrente flutuante, enquanto que a tensão do diodo é praticamente constante. Na figura 15 é possível observar a relação da tensão direta e corrente direta no laser de diodo para diferentes temperaturas.

Figura 15 – Relação da tensão direta e corrente direta no laser violeta para diferentes temperaturas

Fonte: Nichia, (2020), editado pelo autor.

Para operar o laser em segurança, uma fonte de corrente deve manter a corrente constante circulando pelo emissor, mesmo quando ocorra alterações na tensão direta do diodo (V_d), que pode flutuar em função do aumento de temperatura.

Uma fonte de corrente foi desenvolvida no laboratório de instrumentação eletrônica, LIEPO, do Grupo de Óptica localizado no Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP).

O projeto de fonte de corrente consistiu em utilizar uma fonte de tensão comercial de baixo ruído com um regulador de corrente de alta estabilidade.

A fonte de tensão selecionada foi o modelo comercial PD25-12 da (*MEANWELL*, EUA), com alimentação do tipo *full-range* de 85 VAC a 264 VAC, não é necessário selecionar tapes do transformador para alterar a tensão na entrada. A fonte possui boa eficiência, com menor dissipação de calor, menor peso e tamanho bastante reduzido (de 6,1 x 12,7 cm), quando comparado as fontes lineares, disponíveis no mercado. Essa fonte é simétrica com saídas configuradas em +12 V / 1 A e -12 V / 1 A, aplicadas na alimentação dos amplificadores operacionais utilizados no regulador de corrente. Com essas características a fonte de tensão se tornou ideal para ser utilizada no projeto.

A fonte de tensão foi testada em laboratório usando um analisador de sinais FFT 3561A (*Agilent HP*, EUA). O equipamento permite analisar o sinal da tensão de saída da fonte com a Transformada Rápida de Fourier (FFT). Nas medidas de FFT foi possível observar se o ruído de chaveamento, em torno de 100 kHz, produzido pela fonte, poderia alcançar amplitude para influenciar na polarização direta ou reversa do laser.

As saídas de + V e - V da fonte foram testadas, com a fonte sendo alimentada em ambas as tensões de entrada, em 127 VAC e 220 VAC, os gráficos referentes a sua análise espectral podem ser conferidos nos gráficos *A* e *B* na Figura 16. Na medida foi verificado que o nível de ruído da fonte ficou abaixo de -40 dBV, equivalente em 5 mV, para frequências de 10 KHz a 100 KHz.

Figura 16 – Nível de ruído apresentado na saída da fonte: A) tensão positiva e B) tensão negativa

Fonte: elaborado pelo autor, (2020).

O regulador de corrente foi projetado para que o laser não seja polarizado indevidamente, evitando que o componente seja danificado por eletricidade estática ou por corrente de fuga, durante o manuseamento do sistema. O circuito garante que o encapsulamento do laser, esteja conectado a referência da fonte, aterrado a carcaça da estrutura do sistema. Na

sua montagem foram selecionados componentes de precisão e alta confiabilidade térmica, com coeficiente de temperatura em $10 \text{ ppm}/^{\circ}\text{C}$. Entre os componentes foram utilizados reguladores de tensão, resistores, capacitores, transistores e amplificadores operacionais.

O circuito eletrônico para o regulador de corrente foi desenhado no *software Eagle* (Autodesk, EUA), permite a regulação de corrente entre 1 a 150 mA, com flutuação máxima de $\pm 1 \text{ mA}$. O seu esquemático pode ser visto no apêndice A.

3.1.1.3 Circuito de proteção do laser violeta

Como proteção adicional, um circuito evita que o laser possa ser danificado eletricamente contra transientes de tensão nos sentidos diretos e reverso.

O circuito de proteção, mostrado na Figura 17, é inserido entre a fonte de corrente e o laser de diodo, sendo fixado bem próximo ao laser. O circuito limita a tensão sobre o diodo laser com 7 diodos de sinal 1n914, a polarização direta dos diodos equivale a queda de tensão do laser que nesse caso é de 4,8 V, enquanto que um diodo de recuperação rápida do tipo *schottky* polarizado em antiparalelo ao laser limita a tensão reversa no laser em torno de 0,7 V.

Figura 17 - Esquema do circuito de proteção impedindo possíveis transientes de tensão no laser de diodo

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

3.1.2 Laser verde

O laser de diodo *A-D532-50TAC863434* (AixiZ, EUA) com emissão no verde é construído com um cristal de ortovanadato de ítrio dopado com neodímio ($Nd:YVO_4$). Neste laser o cristal de $Nd:YVO_4$ emite luz em 1064 nm, quando é bombeado em 808 nm. A emissão de 808 nm é gerada por um laser semiconductor. Um segundo cristal do tipo não linear formato por potássio titanil fosfato (do inglês *potassium titanyl phosphate*, KTP), é utilizado como dobrador de frequência, transformando 1064 nm em 532 nm (GEORGE et al, 1998; ZHANG et al. 2013). A Figura 18 mostra a configuração para a emissão de um laser verde formado por $Nd:YVO_4$.

Figura 18 – Configuração interna para emissão de um laser verde formado por $Nd:YVO_4$

Fonte: George et al, (1998), editado pelo autor.

No sistema, o laser comercial mostrado na Figura 19 é configurado em um dissipador, já pronto para uso. O laser é acompanhado de uma fonte chaveada com alimentação entre 90 e 240 Vac, a saída da fonte permite que a corrente seja regulada de 100 mA a 300 mA, com consumo máximo de 0,9 W. A emissão do *laser* em 532 nm, pode alcançar até 50 mW quando operando modo contínuo. Assim, para colocá-lo em operação, é necessário apenas alimentá-lo e ajustar a potência através de um potenciômetro na placa da fonte de alimentação.

Figura 19 – Laser verde A-D532-50TAC863434

Fonte: Aixiz, (2020).

A única adaptação realizada no laser verde foi inserir junto ao dissipador um suporte adicional para a conexão com a fibra óptica, como mostra a Figura 20. O suporte foi usinado e fixado no dissipador, permitindo o acoplamento da luz do laser na fibra. Na parte superior, uma rosca é torneada para entrada dos conectores SMA utilizados pela fibra óptica.

Figura 20 – Suporte SMA para acoplamento óptico entre laser verde e a fibra óptica

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

Na parte inferior, uma lente convergente é condicionada para refratar luz do laser dentro do ângulo máximo de aceitação permitido pela fibra óptica, determinado na Equação 13.

$$\theta_{max} = \arcsen\left(\frac{Na}{n_0}\right) \quad (13)$$

As fibras ópticas que foram utilizadas no projeto possuem abertura numérica, $Na = 0,22$ e o índice de refração do ar equivale a $n_0 = 1,00$. Assim, para a luz propagar pela fibra, o feixe deve ser direcionado dentro do cone de abertura de $\pm 12,7^\circ$.

3.2 O espectrômetro

No sistema de espectroscopia de fluorescência, a medida de fluorescência é realizada com um espectrômetro comercial. No mercado é possível encontrar pequenos espectrômetros (espectrofluorímetros) do tipo multicanal, no tamanho reduzido, integrados com rede difração e um sensor CCD, sem partes móveis, o que os tornam bastante convenientes para serem transportados até o local do experimento.

Na medida de fluorescência, a luz é coletada e transmitida para o espectrômetro por uma fibra óptica. A luz recebida, passa por uma fenda e é colimada por um espelho esférico, que direciona o feixe até a rede de difração. A luz dispersa na rede atinge um detector de múltiplos comprimentos de onda do tipo CCD, que permite a conversão de luz em um sinal digital, mostrando os máximos e mínimos de intensidade do sinal que deve ser transferido para o computador.

O espectrômetro usado no projeto foi o modelo em miniatura *STS-VIS* (*Ocean Optics*, EUA) mostrado na Figura 21. Esse espectrômetro possui dimensões muito reduzidas, comparadas aos outros modelos do mercado, mede 40 x 42 x 24 mm e pesa 68 g, com resposta espectral na faixa de 350 a 800 nm e resolução óptica de até 1,5 nm (com a fenda ajustada em 25 μm).

Figura 21 – Espectrômetro *STS VIS*

Fonte: *Ocean Optics*, (2020).

A resolução óptica (δ_λ), do espectrômetro depende diretamente da sua fenda de entrada e pode ser calculada em (nm) como mostra a Equação 14 (PINI, 2003; MOHAMMADI; ESLAMI, 2014; SCHEELINE, 2017).

$$\delta_\lambda \cong \frac{R_f \Delta_\lambda W_e}{n W_p} \quad (14)$$

Em que, W_e é a largura da fenda (mm), W_p é a largura do pixel (mm), R_f é o fator de resolução ($\sim 1,07$ para $W_e > 3W_p$), Δ_λ é a banda da faixa espectral em (nm) distribuído no sensor (considerando o limite superior e inferior) e n é o número de pixels no qual serão distribuídos a banda da faixa espectral.

Em análises qualitativas, as fendas estreitas e bandas efetivas mínimas são necessárias se o espectro for constituído por picos estreitos. Uma fenda estreita diminui a largura de banda efetiva, como também reduz a potência do feixe emergente (SKOOG et al., 2006). Assim, a largura de banda mínima pode vir a ser limitada pela sensibilidade do detector. A perda de resolução a princípio não interfere na detecção de fluorescência de moléculas biológicas, já que as bandas de absorção e de fluorescência destas moléculas ocupam faixas de vários nanômetros (LAKOWICZ, 2006).

No trabalho quantitativo, as fendas mais largas permitem a operação do sistema de detecção com baixa amplificação, o que, por sua vez, leva a uma maior reprodutibilidade de resposta (SKOOG et al., 2006).

O espectrômetro *STS-VIS* possui um sensor CCD com 1024 pixels de $7,8 \times 125 \mu\text{m}$, banda espectral de 450 nm com a fenda de abertura em $200 \mu\text{m}$, a resolução óptica do espectrômetro diminui para aproximadamente 12 nm, mas traz a vantagem de realizar medidas sem a necessidade de incrementar muito o tempo de integração. Essa característica é importante, pois diminui o tempo de experimentos nos quais muitos pontos de leitura são coletados.

O controlador do espectrômetro utiliza um conversor ADC (do inglês *Analogic to Digital Conversor*) de 14 bits, o que permite a realização de contagens até 16384 níveis.

Uma grande vantagem do espectrômetro *STS-VIS* é que o ruído da linha de base é muito baixo. Com a razão sinal-ruído de 1500:1, em medidas realizadas para sinais de baixa intensidade, é possível aumentar bastante o tempo de integração. No espectrômetro o tempo de integração pode ser ajustado de $10 \mu\text{s}$ até 10 s.

Um controlador interno ao espectrômetro *STS-VIS* permite a comunicação com o computador por meio de duas interfaces, uma porta USB 2.0 (do inglês *Universal Serial Bus*), em *full ppeed* em 12 Mbps, com um conector tipo micro USB e uma porta serial do tipo UART (do inglês *Universal Asynchronous Receiver/Transmitter*) RS232 com *baud rate* em 460 Kbps, disposta em um conector do tipo Mini HDMI de 19 pinos.

O espectrômetro é alimentado com tensão de 5 V e tem consumo máximo de 2,5 W, permite ser alimentado através dos pinos 18 (VCC) e pino 1 (GND) do conector Mini HDMI ou através dos pinos 1 (VCC) e 5 (GND) do conector micro USB. No projeto, uma fonte de tensão de 5 W, modelo PS-05-5, 5 V/ 1 A foi utilizada na alimentação do espectrômetro.

3.3 As fibras ópticas e o suporte para os filtros ópticos

No sistema de espectroscopia de fluorescência, a detecção de fluorescência é realizada por uma sonda constituída por fibras ópticas. A sonda de investigação guia a luz de excitação e de coleta até a amostra, sendo essa é uma importante vantagem para análises realizadas em *in-situ*.

Durante a medição, o sinal de excitação é geralmente mais intenso do que o sinal de fluorescência, portanto é necessário a utilização de filtros ópticos para atenuar a luz retroespalhada na amostra.

O caminho óptico do sistema é mostrado na Figura 22. As setas em azul, representam a luz de excitação enquanto que as setas em vermelho representam a luz de fluorescência emitida pela amostra.

Figura 22- Ilustração destacando o caminho de luz, bem como a forma como se distribuem as fibras de excitação e coleta na extremidade de investigação da sonda

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

No sistema foram utilizadas duas fibras óptica do tipo multimodo com um suporte mecânico para filtros ópticos. O diâmetro da fibra determina a resolução da área de interesse na amostra estudada.

A fibra óptica, modelo *BIF400-VIS-NIR* de 400 μm (*Ocean Optics*, EUA) é bifurcada em formato de “Y” e foi escolhida para a sonda de investigação. No lado da sonda, foi usinado uma ponteira de alumínio, que serve como suporte para as duas fibras que foram configuradas juntas (uma em paralelo a outra), em um mesmo conector. Do outro lado, as fibras se separam, sendo que uma das pontas deve ser conectada na fonte de luz de excitação e a outra ponta é conectada no suporte de filtros ópticos.

O suporte dos filtros ópticos modelo *FHS-LVF* (*Ocean Optics*, EUA) possui dois conectores do tipo SMA, para conexão das fibra de coleta e a fibra de retorno. O suporte contém colimadores que deixam as fibras opticamente alinhadas. Na sua lateral uma fenda permite a entrada dos filtros na faixa de 200 nm a 2000 nm. Os filtros ópticos, devem ser selecionados conforme o comprimento de onda utilizados na excitação.

A fibra de retorno escolhida foi o modelo *P400-025-SR* de 400 μm (*Ocean Optics*, EUA), com o comprimento de 25 cm, transmite o sinal de fluorescência, até o espectrômetro.

Os componentes ópticos escolhidos para o projeto do sistema são mostrados na Figura 23.

Figura 23- Acessórios utilizados no caminho óptico do sistema de espectroscopia de fluorescência

Fonte: *Ocean Optics*, (2020).

3.4 Os filtros ópticos

Os filtros ópticos atenuam a luz de excitação, que tem comprimentos de onda menores que a sua frequência de corte, e transmitem o sinal de fluorescência que tem comprimentos de onda superiores aos da frequência de corte.

Dois filtros ópticos do tipo passa-alta (em relação ao comprimento de ondas) foram utilizados para atenuar a luz do laser retroespalhada na amostra. Durante a medição, o filtro selecionado deve ser inserido no suporte de filtros.

O Filtro Óptico passa-alta com resposta em 420 nm, *GG420* (*Schott*, EUA) foi aplicado para o laser de 405 nm, enquanto o filtro passa-alta com resposta em 570 nm *OG570* (*Schott*, EUA) foi aplicado para o laser de 532 nm. Na Figura 24 é possível verificar os filtros ópticos sustentados por suportes de alumínio, que permitem a sua utilização.

Figura 24 – Filtros ópticos utilizados para atenuação da luz dos lasers verde e violeta

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

Os filtros ópticos foram caracterizados em laboratório, usando o espectrofotômetro comercial *CARY 50 UV-VIS* (Varian, Austrália). A transmitância dos filtros ópticos podem ser observadas nas curvas apresentadas pelo gráfico da Figura 25.

Figura 25 – Curvas de transmitância para os filtros ópticos GG 420 e OG570

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

As frequências de corte, medidas em 420 e 570 nm delimitam o ponto no qual a transmitância é superior a 50 % do valor de intensidade.

3.5 O Computador embarcado no sistema de espectroscopia de fluorescência

Na escolha do computador embarcado no sistema de espectroscopia de fluorescência foram levantados os requisitos de *hardware* necessários para o desenvolvimento do projeto. Entre os principais requisitos foram considerados os seguintes fatores:

- Suporte de conexão com um display gráfico do tipo *touchscreen*. Essa é a principal interface que permite ao usuário operar o sistema;
- Robustez e segurança contra choques e vibrações, que possibilita o sistema ser transportado até os locais dos experimentos;
- A disposição de interfaces de comunicação serial do tipo USB, para escrita e leitura de dispositivos como cartões SD e *pen drives* e do tipo RS232 para a comunicação serial com o espectrômetro;

- Capacidade de processamento e memória para execução do programa embarcado com bom desempenho e boa performance;
- Memória local para armazenamento dos arquivos dos espectros adquiridos;
- Capacidade de atualização do sistema operacional e do computador embarcado;
- Acesso livre a documentação das bibliotecas, dos *drivers* e das imagens de sistemas operacionais disponíveis para o computador embarcado;
- Suporte técnico oferecido pelo fabricante;
- Período do ciclo de vida do CoM e da placa de desenvolvimento;
- Período para a garantia do produto;

3.5.1 O computador em módulo e a placa de desenvolvimento

O computador em módulo modelo *Colibri T20 256MB | V1.2A* (TORADEX AG ®, Suíça), mostrado na Figura 26, é comercializado com a imagem do sistema operacional *Windows CE 6.0* de 32 *bits* já instalada e oferece suporte a outros sistemas operacionais como o *Embedded Linux* ou o *Android* (TORADEX, 2020). Este computador foi selecionado por atender os requisitos necessários ao projeto e em conjunto com a placa de suporte *IRIS Board*, permitiu fácil implementação no desenvolvimento do sistema. O CoM possui um *chip* SoC da *NVIDIA TEGRA, T20*, com processador *Arm Cortex™-A9* operando em 1 GHz, possui 256MB de memória RAM do tipo DDR2 e 512MB de memória *flash* do tipo SLC NAND *Flash* com 60000 ciclos de gravações. A placa do computador permite acesso a um *display touch screen* do tipo RGB LCD de até 24 *bits* e possui acesso aos módulos de comunicação serial e USB. O sistema operacional *Windows Ce 6.0* que é instalado no computador, possibilita leitura e escrita de cartões SD e *pen drives* com o sistema de arquivos formatado em modo TFAT (do inglês *Transaction-Safe FAT File System*). A memória *Flash* no computador permite que os arquivos dos espectros sejam armazenados no próprio dispositivo, mesmo que o sistema seja desligado.

O computador *Colibri T20* possui certificação *EN 60068-2-6/50g 20ms*, contra choques e vibração. O ensaio de choques mecânicos é realizado nas 3 direções (x, y e z) e o ensaio de vibração é do tipo senoidal em diferentes frequências harmônicas. A conformidade dos testes contra choques e vibrações é uma medida importante para garantir o correto funcionamento do computador durante o seu transporte.

A garantia contra mau funcionamento é disponibilizada pelo fabricante no período de 2 anos e o ciclo de vida é programado para 10 anos, o que permite assegurar a reprodutibilidade

e manutenção do sistema durante um longo período de duração. O fabricante mantém o compromisso mínimo do produto (do inglês *Minimum Product Commitment*) para o *Colibri T20* até o ano de 2025 (TORADEX, 2020).

Uma vantagem importante em selecionar placas de desenvolvimento que permitam a troca do computador em módulo, é que os dispositivos de periféricos encontrados no *hardware*, podem ser reaproveitados por outros computadores mais atualizados. A *Toradex* disponibiliza diferentes CoMs configurados com diferentes processadores, mantendo a pinagem compatível com a *Iris-Board* (TORADEX, 2020).

Figura 26 – Computador em módulo *Colibri T20 256MB* | *VI.2A*

Fonte: *Toradex AG* ® (2020).

3.5.2 A placa de desenvolvimento *Iris Board*

A placa de desenvolvimento *Iris Board* (TORADEX AG ®, Suíça) mostrada na Figura 27 tem dimensão de 72 x 100 mm e possibilita o acesso aos pinos do computador embarcado por meio de filtros analógicos, *drivers* e conversores que permitem amplificar e condicionar o sinal durante a comunicação. A placa também é composta por componentes integrados que possuem funções especiais durante o funcionamento do computador embarcado.

Entre os periféricos da placa, um conversor do tipo TTL/RS232, *SN65C3243* (*Texas Instruments*, USA), permite a conversão dos níveis de tensão do computador em módulo, padrão TTL de 0 V e 3 V nos níveis de tensão compatíveis com o padrão RS232, com tensões de entrada/saída de -5 V e 5 V durante a comunicação serial. Duas portas seriais no padrão RS232 estão disponíveis por conectores de 10 pinos (2 fileiras x 10 pinos) do tipo *Pin Header* macho.

Os conectores USB, permitem a comunicação com dispositivos como o *dongle* de WIFI e *pen drives* para salvar os arquivos das medidas dos espectros, além de um conector USB

adicional *On the Go* (OTG) que possibilita a gravação e depuração do programa que será carregado no computador. O acesso a rede cabeada pode ser implementado através do conector *ethernet* RJ45 e a memória do computador pode ser ampliada com um cartão micro SD.

Um circuito integrado do tipo RTC (do inglês *Real Time Clock*), *M41T0M6* (*STMicroelectronics*, Suíça), alimentado com bateria externa, pode gerenciar a data e a hora do sistema operacional mesmo quando o sistema é desligado.

O conector *XF2M-4015-1A* de 40 pinos é utilizado na conexão com o *display* RGB *touchscreen* e um conector de 20 pinos (2 fileiras x 20 pinos) do tipo *Pin Header* macho, permite acesso as portas de entrada/saída, aos canais PWM, ao canal I2C, as portas seriais (com nível TTL) e aos conversores analógicos digitais.

Na alimentação da placa *IRIS BOARD* foi usada uma fonte de 12 V/1 A , modelo comercial *RS25-12* da (*MEANWELL*, EUA). Na placa um conversor DC/DC, *TPS51120* (*Texas Instruments*, USA), operando com tensão de entrada de 6 V a 27 V contínuos converte e regula duas saídas nas tensões de 3,3 V e 5 V, provendo a alimentação do computador embarcado e do *display touchscreen*.

Figura 27 – Computador em módulo na placa de suporte *Iris Board*

Fonte: *Toradex AG* ® (2020).

3.5.3 A tela de visualização

A tela e visualização, permite a interface entre o usuário e o sistema. Através do *display*, é possível fazer a configuração e o controle do programa de aquisição.

O display *EDT Display (TORADEX AG ®, Suíça)*, mostrado na Figura 28 é colorido (18bits RGB) do tipo é do tipo *touchscreen*, com *Thin Film Transistor Liquid Crystal Display (TFT-LCD)*, resistivo (*4-wires*) e possui resolução de 640x480 *pixels*, tem consumo máximo de 2,3 W. O tamanho de 100 x 124,7 mm o torna bastante conveniente para o desenvolvimento do sistema.

Figura 28 – *Display LCD touchscreen EDT display*

Fonte: *Toradex AG ®, (2020)*.

O consumo do computador em módulo com a placa de desenvolvimento e o display ficou em 7W.

3.6 A interface de comunicação entre o computador embarcado e o espectrômetro

No *Windows CE*, os dispositivos seriais como a UART e a USB utilizam *drivers* do tipo *Stream Drive Interfaces*. Quando um dispositivo USB é detectado pelo sistema, o controlador USB verifica a informação do *vendor_id* do dispositivo, fazendo a chamada do *driver*, que corresponde a uma biblioteca DLL (do inglês *dynamic-link library*) carregada no registro, durante a inicialização do sistema (HARSHITHA et al., 2012). Os *Drivers* para dispositivos genéricos como *pen drive*, mouse, teclado, *dongle de wifi*, câmeras, etc, foram previamente inseridos durante a compilação da imagem do sistema. A porta de comunicação serial UART é carregada pelo *serial port device driver* sendo nomeadas no registro através de um prefixo de três letras acompanhados da numeração do dispositivo COM1, COM2, COM3. etc.

No projeto do sistema, a comunicação entre o computador embarcado e o espectrômetro foi implementada através da porta UART, RS232 com *baud rate* configurado em 460 kbps (*Kilobits* por segundo). A possibilidade de comunicar com o espectrômetro via UART RS232, elimina a necessidade de desenvolvimento de um *driver* USB. As portas seriais do tipo UART

são genéricas e são carregadas pelos sistemas operacionais em qualquer plataforma embarcada cujo o *hardware* esteja disponível, isto elimina a necessidade de recompilar um *driver* em uma possível atualização do sistema.

Os pinos do conector mini HDMI (conector com 19 pinos) para comunicação do espectrômetro STS-VIS e o conector *Pitch Header* de 10 pinos (2 linhas x 5 colunas) da IRIS board utilizados durante a comunicação serial UART RS232 são destacados na Figura 29.

Figura 29 – Pinagem para interface de comunicação serial entre o STS-VIS e a IRIS Board

Pin#	Signal Name	Description
1	GND	Ground
2	Rx	RS-232 Data In
3	Tx	RS-232 Data Out
4	CTS	Clear To Send*
5	ExtTrgIn	(3.3v Logic)
6	Lamp_Enable	(3.3v Logic)
7	RTS	Request To Send*
8	Continuous Strobe	(3.3v Logic)
9	Single Strobe	(3.3v Logic)
10	Ext_Reset	External Reset
11	N/A	N/A
12	N/A	N/A
13	N/A	N/A
14	N/A	N/A
15	GPIO-4	(3.3v Logic)
16	GPIO-3	(3.3v Logic)
17	GPIO-2	(3.3v Logic)
18	5V In	External 5V power
19	GPIO-1	(3.3v Logic)

*Only available on boards at revision F or later.

2.2.8 FF RS-232 header (X13)

The Full Function (FF) RS-232 connector is a 10 way (2 rows x 5 way) 2.54mm pitch header capable of being connected to an industry standard DTK/INTEL 10 way IDC to 9 way D-type male connector.

Pin	Signal Name
1	RS232_A_DCD
2	RS232_A_DSR
3	RS232_A_RXD
4	RS232_A_RTS
5	RS232_A_TXD
6	RS232_A_CTS
7	RS232_A_DTR
8	RS232_A_RI
9	GND
10	NC

Fonte: *Ocean Optics*, (2020), *Toradex AG*®, (2020).

3.7 A integração do sistema de espectroscopia de fluorescência

No sistema de espectroscopia de fluorescência, os componentes ópticos e eletrônicos foram configurados e condicionados em uma maleta, que tem como finalidade oferecer a resistência necessária durante o transporte do sistema até os locais de análise.

Uma maleta comercial modelo 06502001 (*Loyal Ferramentas*, Brasil) fabricada em alumínio, foi selecionada de acordo com sua dimensão, peso e robustez.

A estrutura mecânica do sistema, mostrada na Figura 30, foi desenhada no *software SolidWorks (Dassault Systemes S.A., França)* e construída na oficina mecânica do IFSC. Os desenhos para o leiaute da estrutura são divididos em duas partes, a parte superior da estrutura representa o lado acessível ao usuário, e uma parte inferior serve da base para os componentes que compõe o sistema.

Figura 30 – Estrutura mecânica do sistema de espectroscopia de fluorescência, destacando a posição para os componentes: A) parte superior e B) parte inferior

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

A estrutura mecânica foi desenhada para que o sistema fosse facilmente operado quando a maleta estivesse aberta. A parte superior é acessível ao usuário, a tela do *display* foi condicionada em um suporte com uma angulação de 25° e na base do suporte do display duas entradas para conexão USB foram usinadas, uma de cada lado do suporte.

Os botões permitem ligar o sistema e ligar os lasers de excitação que podem ser utilizados durante o experimento.

Um segundo suporte também inclinado em ângulo de 25° permite o acesso aos conectores SMAs, que possibilitam a conexão com a fibra óptica, com a fonte de luz laser e o com o suporte de filtros que é conectado internamente até o espectrômetro. Na base deste suporte uma fenda permite inserir o filtro óptico que é escolhido durante a medida.

Na parte inferior da estrutura, um ventilador permite o fluxo de ar circulando no interior da maleta (a maleta também é vasada na região do ventilador), mantendo a temperatura dos dissipadores em condições estáveis. Nesta parte da estrutura foram fixados os lasers, a placa de desenvolvimento, as fontes de tensão e de corrente necessárias para a alimentação dos dispositivos do sistema.

A Figura 31, mostra o desenho mecânico do sistema permitindo a visualização da parte superior, acessível ao usuário.

Figura 31 – Desenho mecânico para o sistema de espectroscopia de fluorescência

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

Com os componentes instalados e integrados na maleta, o peso do sistema ficou em 5,2 kg.

A potência óptica de cada laser foi ajustada na ponta da fibra de excitação. O laser verde foi regulado em 30 mW, enquanto o laser violeta foi regulado em 10 mW. Os lasers foram calibrados com o medidor de potência modelo *FieldMaster* (Coherent, USA) com o sensor de potência térmico modelo *LM-10 HTD* (Coherent, USA).

A alimentação do sistema de espectroscopia de fluorescência é feita por uma entrada de energia através de um conector do tipo C14 (2P+T), na parte traseira da maleta. A alimentação é *full range* de 90 VAC a 265 VAC consumindo no máximo 12 W de potência. A Figura 32 mostra o sistema finalizado.

Figura 32 – Sistema de espectroscopia de fluorescência finalizado

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

O custo aproximado para o sistema de espectroscopia de fluorescência ficou em US\$ 5461,00. E o valor para os principais componentes utilizados no sistema podem ser conferidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Custo para os principais componentes do sistema de espectroscopia de fluorescência

ItêM	Descrição	Fabricante	Preço US\$
A-D532-50TAC863434	Laser Verde	<i>AixiZ</i>	55,00
NDV4316	Laser Violeta	<i>Nichia</i>	2800,00
Fibra Bifurcada 400 nm	Fibra Utilizada como Sonda	<i>Ocean Optics</i>	419,00
Fibra 400 um 25 cm	Fibra para retorno da luz até o espectrômetro.	<i>Ocean Optics</i>	121,00
FHS-LVF	Suporte de Filtros Ópticos	<i>Ocean Optics</i>	485,00
STS VIS	Espectrômetro do Sistema	<i>Ocean Optics</i>	1175,00
Colibri T20 512MB	Computador em Módulo	<i>Toradex</i>	139,00

continua

conclusão

Itém	Descrição	Fabricante	Preço US\$
Placa de Suporte Iris Board	Placa de Desenvolvimento	<i>Toradex</i>	79,00
Display EDT 5.7" TFT VGA	Display RGB Touch Screen	<i>Toradex</i>	125,00
Maleta	Maleta de Suporte	<i>Loyal</i>	37,00
RS 25-12	Fonte Simples 12V/1A	<i>MeanWell</i>	10,00
PD 25-12	Fonte Simétrica +12V/- 12V	<i>MeanWell</i>	16,00

Fonte: Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

3.8 O programa desenvolvido para o sistema de espectroscopia de fluorescência

O programa que opera o sistema de espectroscopia, deve possibilitar ao usuário adquirir, visualizar e salvar pontos recebidos pelo espectrômetro em memória.

Os programas que acompanham os espectrômetros são comerciais, exigem configurações de *hardware* e sistemas operacionais específicos, exigem bibliotecas e *drivers* próprios e fechados para se comunicarem com o espectrômetro, algumas vezes deixam de funcionar na atualizações do sistema operacional, o que deixa o uso do equipamento limitado.

A criação e o desenvolvimento de um programa de aquisição, possibilita ao usuário flexibilizar a sua utilização em diferentes plataformas ou sistemas operacionais. O programa pode ser escrito e configurado com os pré-requisitos que atendam às necessidades do usuário durante o protocolo de cada experimento.

3.8.1 O Desenvolvimento do programa embarcado

O programa de base que opera o sistema de espectroscopia de fluorescência foi escrito em linguagem orientada a objetos C++ utilizando o ambiente de desenvolvimento *Embedded Visual C++* (*Microsoft*, EUA), que permite compilar programas para o *Windows CE 6.0* em 32 bits.

No compilador o programa de controle foi escrito usando a biblioteca MFC (do inglês *Microsoft Foundation Classes*), que contém diversas APIs para manipular a camada de

abstração gráfica GDI (do inglês *Graphics Device Interface*) do *windows*. A GDI é uma interface com um conjunto de classes, funções, variáveis e constantes que permite que o aplicativo seja construído por meio de janelas, menus, caixas de diálogo, botões e outras formas gráficas. Na linguagem orientada a objetos, as classes definem os estados dos objetos através de atributos, permitindo alterar seu comportamento através de métodos.

Classes e funções também foram implementadas no programa para acessar os dispositivos de entrada e saída. Esses dispositivos, podem ser configurados e utilizados pelo uso de *handles* que permitem lidar com descritores de arquivos (do inglês *File Descriptor*), que mapeiam os objetos do *kernel* carregados em memória.

A Figura 33, exemplifica as chamadas de acesso do programa através do sistema operacional durante o controle e a comunicação com os dispositivos do sistema embarcado.

Figura 33 – Chamadas de acesso do programa embarcado através do sistema operacional

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

No *Windows CE*, o programa de aquisição *EspectroVIS* é carregado automaticamente na memória durante a etapa de inicialização do sistema e pode ser acessado pelo caminho do *Menu Iniciar > Programas > EspectroVIS* como mostrado na Figura 34.

Figura 34 – Acesso ao programa *EspectroVIS*

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

No programa é possível inicializar o Espectrômetro, através da aba do Menu, *Ocean Optics* > *STS*, mostrado na Figura 35.

Figura 35 – Inicializando o espectrômetro *STS-VIS*

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

3.8.2 A comunicação com espectrômetro

O protocolo de comunicação utilizado no espectrômetro *STS-VIS* utiliza mensagens de comandos escrita em formato binário. Os comandos podem ser divididos em dois tipos, comandos de configuração e comandos de consulta.

Os comandos de configuração alteram o modo de operação do espectrômetro e não retornam mensagens de dados, enquanto que os comandos de consultas, geram respostas referente a informação requisitada. A resposta referente ao comando pode vir acompanhada com uma carga de dados (do inglês *payload*).

Os dados transmitidos pelo espectrômetro são transferidos como *bytes* enviados em formato *little-endian*, sendo o LSB (do inglês *Less Significant Bit*) encaminhado na frente do MSB (do inglês *Most Significant Bit*).

Pedidos de confirmação ou recebimento para as mensagens transmitidas podem ser requisitadas pelo computador para o espectrômetro, que responde através de um *flag* ACK (do inglês *acknowledgement*) quando a mensagem é bem recebida ou através de um *flag* de confirmação negativa NACK (do inglês *negative-acknowledgement*) indicando que a mensagem recebida anteriormente foi rejeitada. A *flag* NACK também pode indicar que houve um erro interno no espectrômetro na tentativa de atender ao comando do computador.

Os detalhes de implementação do protocolo foram retirados da documentação disponibilizada pelo fabricante (*Ocean Optics*, 2020).

No protocolo as mensagens transmitidas entre o computador e o espectrômetro constituem a seguinte sequência de *bytes*:

- 1- Um cabeçalho de 44 *bytes*.
- 2- Um conjunto opcional de *bytes* (*até 1024 bytes*) referente a carga de dados (do inglês *payload*) transmitida na mensagem.
- 3- Um conjunto de 16 *bytes* são utilizados na soma de verificação (do inglês *checksum*).
- 4- Um Rodapé (do inglês *footer*) com 4 *bytes* adicionais, finalizam a mensagem.

As mensagens e comandos enviadas pelo computador possuem a seguinte configuração:

Tabela 3 – Configuração da mensagem do protocolo utilizado na transmissão com o espectrômetro *STS - VIS*

Posição de início do byte na mensagem	Campo	Tamanho (Bytes)	Valores Validos	Descrição
0	<i>Start_Byte</i>	2	0xC1C0	Constantes Iniciais definidas pelo fabricante
2	Versão do Protocolo	2	0x0000 – 0xFFFF	0x1000
4	<i>Flags</i>	2	0x0000 – 0xFFFF	Os bits são usadas para requisitos de <i>ACK</i> e envios de <i>NACK</i> . Além de informar se a mensagem é aceita ou não pode informar se houve algum tipo de erro durante a execução do comando.
6	Número do Erro	2	0x0000 – 0xFFFF	Traz informações referentes ao tipo de erro indicada nas <i>flags</i> . Sinalizando através de um número. Se diferente de “0” existe erro. A lista de erros pode ser conferida no <i>datasheet</i> do espectrômetro.
8	Mensagem de Comando	4	0x00000000 – 0xFFFFFFFF	Comandos de configuração ou consulta.
12	Resposta Relativa	4	0x00000000 – 0xFFFFFFFF	Informação definida pelo <i>host</i> . Se o comando for uma consulta pedindo dados, o dispositivo retornara uma mensagem, com a mesma informação neste campo.
16	Reservado	6		Reservado. Campo Não Utilizado nesta versão.
22	Habilita <i>Checksum</i>	1	0x00 – 0x01	Caso seja utilizado o dispositivo utiliza o padrão <i>MD5</i>
23	Quantidade de Dados Imediatos	1	0x00 – 0x10	Número total de <i>bytes</i> usados nos dados imediatos (Até 16 bytes disponíveis).
24	Dados Imediatos	16		Mensagens curtas podem ser transmitidas ocupando o espaço de 16 <i>bytes</i> .

continua

conclusão

Posição de início do byte na mensagem	Campo	Tamanho (Bytes)	Valores Validos	Descrição
40	<i>Bytes Remanescentes</i>	4	0x00000000 – 0xFFFFFFFF	Esse espaço é disponível para informar a quantidade de <i>bytes</i> referentes ao <i>payload</i> que serão transmitidos na mensagem, somando a esse valor os 16 <i>bytes</i> do <i>checksum</i> e mais 4 <i>bytes</i> do <i>footer</i> .
44	<i>Checksum</i>	16		Quando habilitado o algoritmo MD5 implementado no controlador do espectrômetro utiliza funções de <i>hash</i> de 128 <i>bits</i> . O MD5 permite verificar a integridade dos dados durante a transmissão das mensagens (caso ocorra algum tipo de <i>bit flip</i>). Quando não utilizado, o campo é preenchidos com valores nulos.
60	<i>footer</i>	4	0xC2C3C4C5	Constantes finais adicionadas ao rodapé da mensagem

Fonte: Ocean Optics (2020), editado pelo autor.

Nas mensagens de respostas entregue pelo espectrômetro, a mesma estrutura de configuração é utilizada. Mensagens simples, incluindo o *header*, *checksum* e o *footer*, sem o *payload* possuem um total de 64 *bytes*.

Caso as mensagens carreguem os dados durante a transmissão, são adicionados até 2048 *bytes* na mensagem, considerando os valores referentes a contagem recebida para os 1024 *pixels* adquiridos pela CCD, convertidos em números inteiros de 16 *bits* (equivalente a 2 *bytes*).

O *payload* é inserido na mensagem antes do *checksum* e do *footer*. Assim a transmissão de toda informação ocorre em uma única mensagem de resposta encaminhada pelo espectrômetro.

A estrutura do cabeçalho da mensagem utilizada durante a comunicação com o espectrômetro foi construída em linguagem C++ utilizando variáveis de memória como: caracteres, do tipo *char* com tamanho de 1 *byte* (8 *bits*), inteiros do tipo *unsigned short* com tamanho de 2 *bytes* (16 *bits*) e inteiros do tipo *unsigned int* com o tamanho de 4 *bytes* (32 *bits*).

No código fonte do programa, a estrutura *STS_Config*, mostrada na Figura 36, permite o preenchimento dos valores na construção das mensagens, sem os bytes referentes ao *checksum* e o *footer*.

Figura 36 – Trecho de código definindo a estrutura de um comando durante a comunicação com o espectrômetro

```

76     typedef struct
77     {
78         unsigned char start_bytes[2]; /* = 0xC1, 0xC0 */
79         unsigned short protocol_version; /* = 0x1000 */
80         unsigned short flags; // 16 bits number
81         unsigned short errno;
82         unsigned int message_type; // Comando de 32 bits.
83         unsigned int regarding;
84         unsigned char reserved[6];
85         unsigned char checksum_type;
86         unsigned char immediate_data_length;
87         unsigned char immediate_data[16];
88         unsigned int bytes_remaining;
89         unsigned char payload[1];
90     } STS_binary_protocol_header STS_Config;

```

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

A estrutura *STS_Config* foi implementada na classe *espectrômetro* que é chamada no programa durante a comunicação com o espectrômetro. A construção da mensagem com o preenchimento de um comando é realizado como a sequência de comandos mostrados na Figura 37.

Figura 37 – Trecho de código enviando o comando para ajuste do tempo de integração no espectrômetro

```

723     STS_Config.start_bytes[0] = 0xC1; //C1C0 Manter sequencia padrao.
724     STS_Config.start_bytes[1] = 0xC0;
725     STS_Config.start_bytes[2] = '\0';
726     STS_Config.protocol_version = 0x1000; //0x0001 // Padrão.
727     STS_Config.flags = 0x0000; //0000
728     STS_Config.errno = 0x0000; //0000
729     STS_Config.message_type = 0x00110010; //Comando: "Set Integration Time".
730     STS_Config.regarding = 0x00000000; // Eu que defino o que eu quero por. A resposta tera o mesmo.
731     STS_Config.checksum_type = 0x00; // Checksum = 0 . sem checksum.
732     STS_Config.immediate_data_length = 0x04; // Quando tem valor ocupa de 1 a 16 posições, sem Payload.
733     recebestring = NBitsToArrayLE(0x030D40,4); // 0x030D40 equivale a 200000us ou 200ms
734     STS_Config.immediate_data[0] = recebestring[0]; //LSB
735     STS_Config.immediate_data[1] = recebestring[1];
736     STS_Config.immediate_data[2] = recebestring[2];
737     STS_Config.immediate_data[3] = recebestring[3]; //MSB
738     STS_Config.bytes_remaining = 0x00000014; // 0x14 -> 20 bytes equivalentes ao Checksum + footer.

```

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

A função *NBitsToArrayLE()* permite que variáveis inteiras de 16 e 32 bits sejam separadas e transformadas em uma *string* binária. A função retorna *bytes* em forma de caracteres, em formato *little-endian*. O *checksum* e o *footer*, são adicionados ao final da *string* para fechar a mensagem que será transmitida para o espectrômetro.

Finalizado a configuração da mensagem os dados são serializados em uma *string* binária, através da função *WriteReadComPort()*, sendo em seguida transmitidos pela porta serial. Essa função também aguarda o retorno de dados, caso exista resposta do espectrômetro.

No projeto não foi necessário habilitar a soma de verificação de dados (*checksum*). O espaço reservado para esta finalidade é ocupado com zeros. A distância entre a placa de desenvolvimento e o espectrômetro é bastante curta e a blindagem natural da estrutura metálica tornaram a comunicação protegida contra ruídos. Além disso a comunicação serial de 460 *kbps* em RS232 com 2 níveis de tensão positivo e negativo (± 5 V), é baixa quando comparado aos 12Mbps em tensão TTL (0 e 5 V) durante a comunicação da porta USB.

Os principais comandos implementados no *EspectroVIS* durante a comunicação com o espectrômetro são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Comandos utilizados na comunicação com o espectrômetro *STS - VIS*

Comando	Finalidade	Dados de Entrada	Dados de Saída
0x00000001	Reiniciar o dispositivo	-	-
0x00101000	Adquirir o Espectro - <i>Get and send Spectrum</i> (Corrigidos)	-	Retorna os <i>pixels</i> em inteiros de 16 <i>bits</i> . O pontos são corrigidos em função do nível de ruído e dos desvios de temperatura.
0x00000810	Altera a velocidade de comunicação. <i>Set RS-232 baud rate</i> (Inicialmente a velocidade de comunicação é configurada em 9600 <i>bps</i>).	O Valor do <i>BaudRate</i> , é enviado em 32 <i>bits</i> . O espectrômetro, alcança até 460000 <i>bps</i> .	-
0x00110010	Ajustar o Tempo de Integração <i>Set integration time</i> (μ s)	O Valor do Tempo de Integração, é enviado em 32 <i>bits</i> . O tempo de integração deve ser passado em μ s.	-
0x00000100	Consultar o Número Serial		<i>Bytes</i> contendo caracteres, formando uma <i>string</i> .

Fonte: Ocean Optics (2020), editado pelo autor.

A comunicação com o espectrômetro foi implementada no programa através da porta serial COM1. A porta serial UART é manipulada através de um *handle*, que permite configurar o dispositivo serial e realizar a transmissão de informação.

Durante a inicialização do espectrômetro, os comandos são enviados em 9600 bps e a velocidade então é alterada para 460Kbps através do comando *Set RS-232 baud rate*. A seguir é ajustado o tempo de integração com o comando *Set integration time* e uma vez que o tempo de integração é ajustado os espectros podem ser obtidos através do comando *Get and send Spectrum*. Esses e outros comandos foram implementados na classe do *espectrômetro*.

3.8.3 O gráfico apresentado pelo *EspectroVIS*

O programa *EspectroVIS* possibilita que os espectros transmitidos pelo espectrômetro possam ser visualizados em um gráfico 2D. Na classe do gráfico foram criadas métodos como a *Range_Config()*, *Grid_Config()* e *Plotar_XY()* que permitem a construção, manipulação e preenchimento do gráfico. As funções utilizaram classes definidas pela biblioteca MFC como as classes *CRect*, *CPen* e *Cpoint*, estas classes permitem desenhar, retângulos, linhas e pontos dentro da camada da GDI.

O gráfico é atualizado automaticamente de forma contínua, cada vez que recebe um novo espectro. No eixo das ordenadas, são plotados as contagens referente ao nível de intensidade para cada ponto do espectro adquirido. Enquanto que no eixo das abscissas são distribuídos os pontos referente aos *pixels* transmitidos pelo espectrômetro convertidos em comprimento de onda.

A conversão dos comprimentos para cada ponto λ_p (nm) em função do pixel P, é realizada durante a calibração do instrumento em uma medida de espectro de uma fonte de luz conhecida (lâmpada de linha). Durante a medida são anotadas todos os pontos que representam os picos de comprimentos de ondas conhecidos e o seu respectivos *pixels* (numerados de 1 a 1024), assim é possível aproximar uma curva representada por um polinômio de terceiro grau, conforme expresso na Equação 15 (*Ocean Optics*, 2020).

$$\lambda_p = I + C_1P + C_2P^2 + C_3P^3 \quad (15)$$

Sendo que λ_p é o valor do comprimento de onda em (nm) do enésimo *pixel* P. O ponto que intercepta o eixo de comprimento de ondas λ quando $P = 0$ é dado por I, enquanto que C_1 , C_2 e C_3 são os coeficientes para cálculo do polinômio.

Os valores dos coeficientes apresentados na Equação 15 podem ser obtidos por interpolação polinomial usando métodos de resolução como os de Newton e de Lagrange

(FREITAS, 2000). Os valores de I e os coeficientes C_1 , C_2 e C_3 são disponibilizados pelo fabricante e são utilizados no programa durante a conversão dos 1024 pontos, transmitidos pelo espectrômetro, transformados em comprimentos de onda.

Na Figura 38 é mostrado um espectro típico de emissão de um laser violeta, com pico de emissão encontrado em 403,69 nm e um segundo pico (segunda ordem difratada) encontrado em 801,96 nm. No gráfico exibido pelo programa *EspectroVIS* foram condicionados 1024 pontos distribuídos entre 322 a 822 nm, com os valores de contagem para a intensidade variando de 0 a 16383 (contagem de 14 *bits*).

Figura 38 – Gráfico em 2D mostrado exibindo um espectro típico de emissão para o laser violeta

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

3.8.4 O armazenamento dos espectros coletados

No programa *EspectroVIS* o usuário determinam quando os espectros exibidos na tela serão salvos. Uma vez que esteja habilitado a opção de salvar no programa, o usuário pode pressionar a tela do sistema para salvar o arquivo com os pontos. O usuário determina se os espectros serão salvos em memória (na memória *flash*) para serem posteriormente copiados, ou diretamente no dispositivo de armazenamento de arquivos conectado na entrada USB.

Os arquivos dos espectros foram criados em formato de arquivo de textos (TXT) e contém o valor de contagem para a intensidade para cada comprimentos de onda coletado pelo

espectrômetro. A Figura 39 mostra o conteúdo de arquivo com os pontos adquiridos diretamente do espectrômetro. O nome do arquivo é escolhido pelo usuário e contém a informação do tempo de integração usado na medida, seguido da data e a hora em que o espectro foi obtido.

Figura 39 – Conteúdo de arquivo texto, com a intensidade e comprimento de onda de cada ponto coletado pelo espectrômetro

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

No programa o usuário também pode salvar o gráfico exibido na tela através de uma imagem em *ScreenShot* em formato *bitmap* (BMP), utilizando o comando do botão direito de um mouse conectado na entrada USB.

3.8.5 A configuração do *EspectroVIS*

A configuração do *EspectroVIS* é realizada através de uma interface exibida em uma caixa de diálogo (do inglês *dialog box*). Na caixa de diálogo, diversos elementos da biblioteca *Win32* como *edits*, *radio buttons*, *combo box* e *push buttons*, foram inseridos, para permitir alterar os parâmetros de funcionamento do programa. Na Figura 40 é mostrado a caixa de diálogo com as opções de configuração do programa.

Figura 40 – Configurações implementadas no programa para operação do sistema

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

3.8.5.1 A seleção de janelas

A tela de visualização no sistema de espectroscopia de fluorescência é reduzida e consequentemente a área de visualização do gráfico também. Para possibilitar ao usuário identificar melhor a região do espectros durante as medidas do experimento, foi proposto a opção para selecionar janelas com intervalos de comprimentos de onda reduzidos. Esta opção é útil para poder visualizar melhor o espectro, permitindo aumentar o *zoom* durante sua visualização.

Outra consideração importante é que os picos de excitação embora sejam reduzidos através dos filtros ópticos, podem em determinados situações apresentar intensidade maior que os picos de fluorescência. Caso o usuário deseje fazer uma normalização dos pontos dentro gráfico, com o interesse de intensificar a região de fluorescência, as janelas podem ajudar a selecionar apenas a região de interesse.

No programa foram implementadas três opções com janelas em intervalos de comprimento de onda para visualização dos pontos recebidos pelo espectrômetro, a primeira janela é composta por toda a faixa de comprimentos de onda entre 332 nm a 822 nm, a segunda janela partindo de 410 nm até 822 nm, eliminando a região de excitação do laser violeta e a

terceira janela mostrando a região de 540 nm a 822 nm eliminando a região de excitação do laser verde.

3.8.5.2 O ajuste do tempo de integração

O tempo de integração permite ser configurado no espectrômetro, através de um comando enviado pelo programa. Quanto maior o tempo de integração maior será a contagem para o sinal apresentado. Isto significa que podemos obter um sinal de amplitude maior durante a detecção de sinais de baixa intensidade.

No programa *EspectroVIS* o usuário pode definir valores para o tempo de integração entre 10 μ s a 2 s.

3.8.5.3 A normalização usando o método Máximo-Mínimo

Os valores de intensidade mostrados no gráfico podem ser normalizados pelo método Máximo-Mínimo equalizados, conforme expresso através da Equação 16, desconsiderando o valor mínimo do sinal, que é obtido através do cálculo das médias dos pontos apresentados pelo ruído da linha de base do espectrômetro.

$$novox = \frac{x - \min(x)}{\max(x) - \min(x)} \quad (16)$$

3.8.5.4 A detecção de picos

A detecção de picos é uma ferramenta que permite ao usuário identificar através do gráfico quais são os comprimentos de onda em que o picos são apresentados. O algoritmo de detecção varre o espectro de forma contínua, buscando pelos pontos de máxima local. No programa, até quatro picos podem ser identificados simultaneamente e são exibidos em cima do gráfico em forma decrescente. O número de janelas de buscas escolhido pelo usuário, determina a resolução durante a execução do algoritmo.

3.8.5.5 O filtro de suavização Savitzky-Golay

Um filtro digital do tipo Savitzky-Golay (SG) foi implementado para filtrar e suavizar o espectro apresentado eliminando os ruídos aleatórios da medida. Uma importante vantagem durante a aplicação do filtro SG é que os picos apresentados pelo espectro continuam preservados, sua aplicação também possibilita aumentar a precisão durante a detecção dos picos. O filtro SG expresso pela Equação 17 é utilizado como um filtro de convolução, os coeficientes desse filtro são provenientes da realização de um ajuste linear de mínimos quadrados realizados de forma ponderada, utilizando um polinômio de determinada ordem no ponto central da janela (SAVITZKY; GOLAY, 1964).

$$Xi = \sum_{j=\frac{1-m}{2}}^{\frac{m-1}{2}} C_i x_{(i+j)} \quad (17)$$

Na aplicação do filtro, Xi recebe os valores de contribuição do ponto central xi e dos m pontos em torno dele, sendo que cada ponto é multiplicado pelo seu respectivo coeficiente de convolução C_i .

No programa *EspectroVIS* um polinômio de ordem três, permite ao usuário escolher entre cinco, sete ou nove coeficientes de convolução para o uso do filtro. Na Figura 41 é mostrado o espectro típico de uma lâmpada fluorescente com o filtro SG habilitado. A linha verde mostra o espectro original enquanto que a linha vermelha mostra o espectro com aplicação do filtro utilizando cinco coeficientes de convolução.

Figura 41 – Espectro de lâmpada fluorescente com a filtragem SG habilitada

Fonte: Elaborado pelo autor, (2020).

3.8.6 Considerações adicionais sobre o programa embarcado

O programa que controla o sistema de espectroscopia de fluorescência foi desenvolvido e compilado no *Embedded Visual C++* e testado no *Windows CE 6.0*. Esse sistema operacional perdeu o suporte técnico oferecido pela *Microsoft* em 2018 e o suporte estendido será finalizado em 2022 (*Microsoft*, 2020). Com o ciclo de vida chegando ao fim, o projeto do programa fonte pode ser facilmente recompilado em outros ambientes de desenvolvimento como o *Visual Studio* (*Microsoft*, EUA), que permite a execução do programa em outros sistemas operacionais mais recentes da *Microsoft*. A *Toradex* disponibiliza para *download* a imagem com a versão mais atualizada do sistema operacional, o *Windows Embedded Compact 2013* (*Microsoft*, EUA), compilado para o computador em módulo *Colibri T20* (*Toradex*, 2020) e a *Microsoft* oferece a data de término do suporte base (do inglês *Mainstream Support End Date*) do *Windows Embedded Compact 2013* até o ano 2023 e a data de término do suporte estendido até 2028 (*Microsoft*, 2020).

Além dos ambientes em *windows*, é possível adaptar o programa com algumas modificações nas APIs, para ser compilado em ambientes com sistema operacional *linux*. As funções implementadas para o programa utilizaram estruturas e classes em linguagem *C++*, o que facilita a migração para outros sistemas e linguagens de programação.

4 Resultados

A avaliação do sistema de espectroscopia de fluorescência foi realizada verificando sua capacidade e sua performance durante o levantamento de espectros em amostras conhecidas.

Nos experimentos foram analisadas fontes de luz artificial e de substâncias compostas por moléculas que emitem fluorescência ao absorverem os fótons dos comprimentos de onda selecionados pelo sistema. Os espectros foram visualizados, coletados e salvos em arquivos de dados, posteriormente os pontos foram plotados para análise em um computador utilizando o *Software Origin Pro 8 (OriginLAB, EUA)*.

4.1 Espectros em fontes de luz artificial conhecidas

Na medida dos espectros de fontes de luz artificial, foram escolhidos lâmpadas fluorescentes e diodos emissores de luz (LEDs), facilmente encontrados no mercado. Os espectros foram analisados e interpretados de acordo com a luminescência produzida por cada amostra.

4.1.1 Espectro em lâmpadas fluorescentes

A lâmpada fluorescente é uma lâmpada de descarga elétrica, no qual a luz é produzida através do fenômeno da fluorescência. Na lâmpada, um campo elétrico acelera elétrons que colidem com átomos gasosos ou moléculas, excitando-os para níveis de energia acima do estado fundamental. Quando os estados excitados decaem para estados de menor energia ocorre a radiação da luz (MASSEY; McDaniel; BEDERSON, 1982).

Duas lâmpadas fluorescentes com diferentes características de emissão foram analisadas. As lâmpadas foram alimentadas na tensão nominal do reator e posicionadas a distância de 1,5 m da sonda do sistema e o tempo de integração foi ajustado em 200 ms.

Na primeira amostra, foi selecionado uma lâmpada fluorescente do tipo tubular, modelo *T8 TL-D 4100K - NEUTRA - 32W/64 - PHILIPS (Phillips, Holanda)*. O espectro da lâmpada mostrado na Figura 42 é característico da emissão de uma lâmpada fluorescente que é revestida internamente por uma camada de cálcio-fósforo halofosfato, $(Ca_5(PO_4)_3(Cl, F): Sb^{3+}, Mn^{2+})$ sendo preenchida por vapor de mercúrio (*Hg*) (COATON; MARSDEN, 1997). Os picos de emissão da lâmpadas foram marcados e comparados com os valores dos picos conhecidos,

exibidos pelo banco de dados de transição atômica do *National Institute of Standards and Technology (NIST, USA)*.

Figura 42 – Espectro de emissão apresentado pela lâmpada *T8 TL-D 4100K – NEUTRA – 32W/64*

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

Os picos apresentados correspondem a possíveis transições eletrônicas no átomo de mercúrio (*Hg*). A emissão de luz na região do azul, entre 440 a 485 nm e do laranja, entre 520 e 590 nm, é proporcional a quantidade dos elementos dopantes, correspondentes aos íons de antimônio (Sb^{3+}) e de manganês (Mn^{2+}) (BLASSE, 1984). A região entre 520 nm e 680 nm corresponde a fluorescência emitida pelo cálcio-fósforo halofosfato (COATON; MARSDEN, 1997). A Tabela 5 mostra a localização dos principais picos de emissão do mercúrio encontrados no gráfico junto com a localização correspondente, retirada do banco de dados do NIST.

Tabela 5 – Picos de emissão apresentados pela lâmpada *T8 TL-D 4100K – NEUTRA – 32W/64*

Comprimento de onda encontrado (nm)	Localização dos Picos no NIST (nm)
365 ± 2	365,48
405 ± 2	404,65
436 ± 2	435,86
548 ± 2	546,07
579 ± 2	579,06
589 ± 2	587,20

Fonte: Banco de dados do NIST (2020), Elaborado pelo Autor.

Na segunda amostra, uma lâmpada fluorescente tubular modelo *T8 MASTER TL-D ECO 32W/840 - PHILIPS* (Phillips, Holanda), apresenta o espectro característico de uma lâmpada que é revestida por uma camada usando pós trifósforos misturados com componentes extraídos de terras raras. Seu espectro de emissão é mostrado na Figura 43. Compostos como óxido de ítrio $Y_2O_3:Eu^{3+}$, tungstato de cálcio $((Ce,Tb)MgAl_{11}O_{19})$ e aluminado de bário $BaMgAl_{10}O_{17}:Eu^{2+}$ misturados com fosfato formam os chamados fósforo vermelhos, verdes e azuis (KANE; SELL, 2001).

Figura 43 – Espectro de emissão apresentado pela lâmpada *T8 MASTER TL-D ECO 32W/840*

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

A localização encontrada para os principais picos de emissão dos átomos de mercúrio (*Hg*), de térbio (*Tb*) e de európio (*Eu*), exibidos no gráfico da Figura 35 é apresentada na Tabela 6 junto com a localização dos respectivos picos retirados do banco de dados do NIST. A emissão do pico de 490 nm é atribuído à transição característica do íon de Tb^{3+} (CHEN et al., 2015) e as emissões dos picos de 614 nm e 715 nm são transições encontradas do íon európio no Eu^{3+} . Para essa emissão, o európio absorve fótons com $\lambda = 254$ nm (do mercúrio) através de uma transição de transferência de carga envolvendo o íon Eu^{3+} e um íon O^{2-} vizinho (SRIVASTAVA; SOMMERER, 1998).

Tabela 6 – Picos de emissão da lâmpada fluorescente revestida por camada de pós trifósforos

Comprimento de onda encontrado (nm)	Localização dos Picos no NIST (nm)	Espécie (Átomo)
365 ± 2	365,15	Mercúrio
405 ± 2	404,65	Mercúrio
436 ± 2	435,86	Mercúrio
490 ± 2	491,59	Térbio
545 ± 2	546,07	Mercúrio
587 ± 2	587,20	Mercúrio
614 ± 2	612,46	Európio
709 ± 2	710,65	Európio

Fonte: Banco de dados do NIST (2020), Elaborado pelo Autor.

As curvas apresentadas pelos espectros das lâmpadas apresentaram-se bem definidas e distintas todavia, determinados picos de emissão não podem ser observadas devido à baixa resolução óptica apresentada pelo sistema de detecção. Os quatro picos mais intensos são identificados diretamente no *EspectroVIS* e o restante dos picos foram conferidos após a aquisição, plotando o arquivo de pontos salvos no programa. Os valores identificados pelo espectrômetro demonstraram amplitude de incerteza de até ± 2 nm em relação aos picos de emissão atômica.

4.1.2 Espectro de diodos emissores de luz

As aplicações de LEDs em lâmpadas de estado sólido (do inglês *Solid State Lamps*), tem crescido exponencialmente nos últimos anos desde a descoberta do processo de fabricação do InGaN realizado por Nakamura et al (1994). Atualmente estas lâmpadas são encontradas no mercado, como opção mais eficiente e de maior durabilidade em relação as lâmpadas fluorescentes. Um único emissor pode gerar até 90 lm/W (*LUMILEDS*, EUA).

Durante as medidas foram analisados os espectros de diodos emissores de luz (LEDs) da série *Rebel 1W* (*LUMILEDS*, EUA). Os picos de emissão e a largura de banda de meia altura (do inglês *full width at half maximum*, *FWHM*) exibidos foram comparados com os dados técnicos apresentados pelo fabricante.

As cores branco, verde, ciano, azul são produzidas a partir do substrato de nitreto de índio-gálio (InGaN) enquanto que as cores vermelha, laranja e ambar são produzidas com substrato de fosforeto de alumínio-índio-gálio (AlInGaP) (SCHUBERT, 2006).

Os LEDs foram alimentados em corrente nominal de 350 mA e posicionados a distância de 1 m da sonda, o tempo de integração foi ajustado em 200 ms.

O espectro apresentado pelo LED branco, mostrado na Figura 44, tem emissão praticamente em todo espectro visível e é característico de um LED branco neutro (do inglês *Neutral-white*) com temperatura de cor na ordem de 4100 K e um pico de emissão na cor azul em 462 nm, originado da estrutura Gan ou InGaN. Este comprimento de onda é responsável por excitar a camada fosfórica depositada sobre as camadas do semicondutor (LUMILEDS, EUA).

Figura 44 – Espectro coletado do LED *Rebel 1W* de cor branco

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

A emissão do fósforo é característica de uma estrutura construída a partir de materiais à base de granada de alumínio itrio, dopados com cério (Ce), $Y_3Al_5O_{12}:Ce$ (YAG:Ce) conhecida como fósforo amarelo (CHUNG et al., 2014). Quando submetido a excitação da luz azul, o fosforo à base de YAG:Ce emite em uma ampla faixa de espectro, com intervalo de 500 a 650 nm, devido à transição do íon de Ce^{3+} , sendo sua máxima emissão em 570 nm (JANG; JEON, 2007).

Nos espectros dos LEDs monocromáticos cada pico corresponde a cor de um emissor, os picos de emissão estão localizados dentro do espectro de luz visível. Os espectros das cores azul, 461 nm, ciano, 500 nm, e verde, 524 nm são exibidos na Figura 45, enquanto que os espectros para as cores âmbar, 595 nm, laranja, 625 nm e vermelho, 638 nm podem ser conferidos na Figura 46.

Figura 45 – Espectro coletados a partir dos LEDs *Rebel 1W* nas cores: A) azul, B) ciano e C) verde

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

Figura 46 – Espectro coletados a partir dos LEDs *Rebel IW* nas cores: A) âmbar, B) laranja e C) vermelho

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

Na Tabela 7 é mostrado a localização para a máxima emissão e o FWHM encontrados para as diferentes cores em comparação com as informações encontradas no *datasheet* do fabricante.

Tabela 7 – Máxima Emissão e FWHM encontrada para os espectros dos LEDs monocromáticos

Máxima Emissão (nm)	FWHM (nm)	Máxima Emissão informada pelo Fabricante (Min - MAX) (nm)	FWHM informado pelo Fabricante (nm)
461	23	460 - 490	33
500	30	490 - 520	30
524	30	520 - 550	30
595	20	584 - 597	20
625	20	613 - 620	20
638	20	620 - 645	20

Fonte: *Lumileds* (2020), Elaborado pelo Autor.

A emissão apresentada pelos espectros dos LEDs monocromáticos apresentaram valores em conformidade com os dados disponibilizados pelo fabricante, com exceção ao valor de FWHM apresentado pelo LED de cor azul. Embora o comprimento de onda de máxima emissão, localizado em 461 nm, esteja dentro da faixa do valor apresentado pelo fabricante, o espectro coletado apresenta um FWHM de 23 nm, valor bem abaixo dos 33 nm informado no *datasheet*, é mais provável que este LED tenha características de emissão mais próximas a de emissão de um LED azul *royal*, também produzido pelo fabricante, cujo pico de máxima emissão está localizado na faixa de 440 a 460 nm e o FWHM é de 24 nm (*LUMILEDS*, 2020).

4.2 Medidas de fluorescência em fármacos e substâncias fluorescentes

Nas medidas de fluorescência, foram selecionados soluções compostas por fármacos e substâncias fluorescentes que absorvessem os comprimentos de onda selecionados para o sistema. As amostras de Acriflavina, *Photogem*®, Curcumina e Rodamina 6G foram disponibilizadas pelo laboratório de biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos.

Na medida, as amostras foram posicionadas de frente a sonda, sendo excitadas em 403 nm e 532 nm. Os espectros apresentados foram armazenados em arquivos de dados em formato de texto, sendo posteriormente analisados.

Durante a medida, a janela de visualização foi ajustada entre 410 nm e 822 nm, os pontos foram normalizados e o tempo de integração foi escolhido entre 100 ms a 200 ms, permitindo uma melhor exibição dos sinais fluorescência.

4.2.1 Acriflavina

A acriflavina, denominada quimicamente de *diaminoacridina* pertence a família das acridinas, que são derivadas do composto antraceno. Trata-se de um corante usado como antibactericida, antisséptico e inibidor (PONS et al., 2001) e também usado como agente anticâncer, sendo que possui efeito contra a proliferação de células tumorais (CHOI et al., 2000). Encontra-se disponibilizada comercialmente com o nome de acriflavina (ACF) em uma mistura 1:1 de acriflavina e proflavina (3,6-diamino acridina).

Quando dissolvida em água destilada, sua excitação encontra-se entre 400 nm a 480 nm, com máxima absorção em 436 nm (D'ALPINO et. al, 2006).

Na concentração de 5 mg/ml, a amostra de acriflavina, cujo espectro de fluorescência é mostrado na Figura 47, foi diluída em água destilada, com excitação em 403 nm, a máxima emissão foi observada em 521 nm. Em 532 nm, a acriflavina praticamente não absorveu energia, e consequentemente, não apresentou um nível de fluorescência considerável para ser apresentado neste trabalho.

Figura 47 – Espectro visualizado em acriflavina com excitação em 403 nm

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

A máxima emissão de fluorescência apresentada pela acriflavina dissolvida em água, encontra-se bastante próximo ao valor de máxima emissão de 520 nm, quando excitado em 436 nm apresentado por D'Alpino et al. (2006), demonstrando que as condições do ambiente químico nas amostras estavam bem próximas durante a realização das medidas.

4.2.2 Photogen®

O *Photogen*® é um medicamento produzido a partir da hematoporfirina, uma substância presente no sangue de animais e humanos. O *Photogen*® (de origem russa) também conhecido por seus análogos *Photofrin*® (de origem americana) e *Photosan*® (de origem alemã) foi aprovado pelo “*Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation*” sob autorização 42-3199-98 e também pela ANVISA (data 08/04/2003; processo 25351.189638/02-00; exp 132851/02-4). É uma das primeiras drogas aprovadas para o tratamento de determinadas neoplasias (MALDONADO, 2000).

Apresenta-se na forma de um pó violeta escuro, comercializado em frascos esterilizados que contém 200 mg do pó. A distribuição é realizada somente sob prescrição para instituições especializadas.

A absorção do *Photogen*® encontra-se na região do ultravioleta e do visível, resultando em uma banda mais intensa designada como Banda de Soret, 320 nm a 430 nm, com intensidade máxima em 369 nm, seguida de quatro bandas, com picos em 507 nm, 540 nm, 570 nm e 620nm, nomeadas de bandas Q, ocupando a região entre 500 nm e 635 nm (MENEZES, 2006).

Na medida dos espectros, foram selecionadas duas amostras do *Photogen*®, uma diluída em água destilada e a outra em etanol, ambas em concentrações de 5 mg/ml. As amostras, responderam as excitações de 403 nm e 532 nm.

Os espectros de emissão do *Photogen*® podem ser visualizados na Figura 48, diluído em etanol A), ou em água B). Devido aos dois solventes apresentarem polaridades diferentes, observou-se um pequeno deslocamento na emissão dos picos entre as duas amostras.

A amostra do *Photogen*® dissolvida em álcool etílico apresentou bandas de emissão com picos de 616 nm e 674 nm, porém quando dissolvida em água destilada, a emissão foi apresentada em um comprimento de onda maior e de menor energia, exibindo picos em 627 nm e 690 nm resultando assim em um deslocamento para o vermelho (do inglês *Red Shift*).

Figura 48 – Espectro de emissão do *Photogem*®, utilizando diferentes tipos de solventes: A) etanol e B) água

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

A polaridade do solvente pode influenciar o meio onde os fluoróforos estão conectados. Se o fluoróforo é excitado para o segundo estado singleto S_2 , há rapidamente o decaimento para o estado excitado S_1 devido à conversão interna e a relaxação vibracional. Tipicamente, o fluoróforo tem um momento de dipolo grande no estado excitado S_1 em comparação com o do estado fundamental S_0 . Os dipolos apresentados pelas moléculas do solvente porém, podem orientar os elétrons das moléculas excitadas em torno do estado excitado S_1 , diminuindo ou aumentando sua energia ao retornar ao estado fundamental S_0 (LAKOWICZ, 2006).

4.2.3 Curcumina

A curcumina é o principal polifenol biologicamente ativo extraído do rizoma da *Curcuma Longa Linn (Zingiberaceae)*. É uma planta herbácea da família do gengibre, originária da Ásia e popularmente conhecida na culinária indiana como açafrão. A curcumina, de coloração amarela, é disponível comercialmente e é composta pela mistura de 77% de curcumina, 17% de desmetoxicurcumina e 6% de bisdesmetoxicurcumina, e é praticamente insolúvel em água. A excitação da curcumina pode ser promovida pela luz azul, na faixa de 440 nm a 485 nm, (ALEXIADES-ARMENAKAS, et. al., 2006), sendo que a absorção máxima ocorre por volta dos 420 nm.

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido apresentados sobre a curcumina comprovado a eficácia desse corante como potencial terapêutico, considerando seu efeito anti-inflamatório (AGGARWAL, HARIKUMAR, 2009), anti-oxidante (PIZZO et al., 2010), anti-microbiano (WANG et al., 2009), anti-fúngico (SILVA, 2012) e anti-tumoral (MILAC et al., 2008; LEE et al., 2009).

Na concentração de 10 mg/ml a curcumina foi dissolvida em etanol. Com excitação em 403 nm, seu pico de emissão foi observado em 546 nm, conforme mostrado na Figura 49. Em 532 nm, a curcumina não absorveu energia e consequentemente não emitiu sinal de fluorescência.

Figura 49 – Espectro de emissão da curcumina com excitação em 403 nm

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

4.2.3 Rodamina 6G

As rodaminas e seus derivados são corantes pertencente à família dos compostos orgânicos xantenos, muito utilizados como marcadores e meio ativo em lasers de corante, sendo a fórmula molecular ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$). Quando dissolvido em etanol, a absorção de Rodamina 6G varia entre 440nm a 570 nm, com o pico em 530 nm (BRACKMAN, 2012).

Essa tecnologia é considerada universalmente como um dos métodos efetivos na marcação de células tumorais, pois apresentam aspectos muito positivos, tais como rapidez de detecção, boa reprodutibilidade, baixa dosagem e ausência de radiatividade (FEI; GU, 2009).

O uso da técnica baseia-se na ligação do componente fluorescente a molécula que se deseja marcar, por uma ação física ou química, formando um complexo fluorescente.

Na concentração de 5 mg/ml a amostra de rodamina foi dissolvida em etanol. Em 403 nm, a Rodamina 6G não absorveu energia como esperado e não houve fluorescência. Com excitação em 532 nm, sua máxima emissão foi observada em 565 nm, conforme visualizado na Figura 50.

Figura 50 – Espectro de emissão típico da Rodamina 6G com excitação em 532 nm

Fonte: Elaborado pelo Autor, (2020).

Durante as medidas dos espectros de fluorescência, foram observadas bandas de emissão próximas a região de 800 nm que não estão relacionados com a radiação emitida pelas amostras.

Na emissão do laser verde o pico apresentado na região de 808 nm possui intensidade bastante baixa, este pico é produzido junto com a emissão de 532 nm e tem origem no diodo utilizado como bombeamento do cristal formado pelo $Nd:YVO_4$ que emite 1064 nm, esta frequência é então dobrada em 532 nm passando por um cristal dobrador de frequências tipo KTP. Embora a saída do cristal KTP possua um *coating* de alta reflexão para os comprimentos de onda de 808 nm e 1064 nm, parte desta emissão pode ser transmitida junto com o 532 nm (GEORGE et al., 1998). Entretanto, o pico na região de 802 nm que aparece nas amostras excitadas com o laser violeta não surge diretamente da emissão do laser, mas tem origem na dispersão da segunda ordem difratada. Ao excitar a amostra em 403 nm, parte da luz pode se espalhar sobre a amostra que é detectado pelo espectrômetro, esta radiação, se sobrepõe ao espectro de difração de primeira ordem, aparecendo no detector na região de 802 nm (LAKOWICZ, 2006).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, um sistema foi desenvolvido para permitir a realização de estudos através da espectroscopia de fluorescência.

Pelo nível de complexidade, o sistema de investigação pode ser considerado de baixo custo. A configuração do sistema é apresentada de uma forma bastante leve e compacta, permitindo ser facilmente transportado para análises realizadas em campo. O sistema foi desenvolvido e condicionado em uma maleta, integrado com uma plataforma micro-controlada embarcada e com os aparatos ópticos já fixados, pronto para tirar as medidas. O desenho mecânico permite o manuseio dos filtros e da fibra óptica durante a medida, sem apresentar dificuldades.

O programa responsável pelo controle do sistema opera com boa performance na plataforma embarcada, permitindo processar, apresentar e salvar os espectros em tempo real, conforme a necessidade do investigador.

Com baixo consumo, operando em torno de 12 W, o sistema pode ser alimentado através de baterias (com um sistema de nobreak), essa é uma importante vantagem em aplicações de medidas em campo.

O sistema de espectroscopia de fluorescência é bastante eficaz para coletar a emissão de sinais de fluorescência de forma pontual, o alcance do feixe de excitação é facilitado e guiado pela sonda de investigação. Essa versatilidade permite que o sistema possa ser empregado em diversas áreas de pesquisa, como odontologia, química, zootecnia, etc.

A resolução óptica do sistema gera incerteza na ordem de 2 nm, pode ser limitante para visualizar linhas de emissão de determinados átomos como foi demonstrado através de medidas dos espectros de lâmpadas fluorescentes, entretanto se torna adequado em medidas de fluorescência em moléculas biológicas, sejam em fármacos ou marcadores do tipo fotossensibilizadores.

5.1 Trabalhos futuros

Possíveis melhorias a serem implementadas nesse trabalho seguem abaixo:

- Ajuste de potência óptica, dos lasers feitos pelo programa de controle: Atualmente a potência dos lasers é feito manualmente e internamente na maleta. A potência foi previamente ajustado em 10mW para o laser violeta e 30mW para o laser verde. A medida relativa a potência regulada, também pode ser monitorada. Esse parâmetro é bastante importante pois garante que as medidas sejam padronizadas.
- Melhorias no manuseamento do programa: Implementar funções no programa de controle para melhorar a análise do espectro adquirido, inserindo opções para pausar o espectro coletado, medir a largura de banda de meia altura FWHM, medir ou indicar o comprimento de onda manualmente com a intensão de varrer todo espectro amostrado.
- Habilitar comandos para filtros de suavização no espectrômetro: O fabricante do espectrômetro, disponibiliza duas opções de filtros de suavização, ao habilitar esses dois comandos na medida, conseguimos suavizar o sinal do espectro coletado, isso permite que os algoritmos de busca de picos, tenham resultados com uma melhor precisão. Enquanto o comando *average*, permite obter uma média durante os espectros (de 1 até 5000 valores) antes de disponibiliza-los para o computador em módulo, o comando *boxcard* faz uma média entre os pixels vizinhos (de 1 a 15 *pixels*, considerando 7 *pixels* vizinhos de cada lado).
- Implementar opções para ligar e desligar os lasers, sincronizando com a obtenção do espectro: Em determinadas medidas durante a detecção da fluorescência a eficiência entre a indução de luz e a conversão de fluorescência pode diminuir, ocorre uma supressão (do inglês *quenching*) ou degradação da molécula por excesso de luz, dessa forma, uma sincronização entre a emissão da luz e obtenção do espectro podem ser configuradas para serem temporizadas.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n.1, p.40-59, Jan. 2009.

ALEXIADES-ARMENAKAS, M. **Laser-mediated photodynamic therapy**, Clin Dermatol. v.24, p.16-25, 2006.

ATKINS, P. W.; DE PAULA, J. **Físico-química. 7. Ed.** Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, v.2, 2004.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BASS, M. **Handbook of Optics**, 3rd ed. McGraw-Hill. v.1, 2009.

BERGAMIN FILHO, H.; JOSE, K.; ZAGATTO, E. A. G.; ROCHA, F. R. P. **Espectroscopia no Ultravioleta e no Visível**. Centro de Energia Nuclear Na Agricultura. Universidade de São Paulo. 2010.

BLASSE G. Luminescence of calcium halophosphate-Sb³⁺,Mn²⁺ at low temperatures. **Chemical Physics Letters**, v. 104, pp. 160-162, 1984.

BLITZ, J. P. Diffuse reflectance spectroscopy. In: Mirabella, F. M.(Org.). **Modern Techniques in Applied Molecular Spectroscopy**. New York: John Wiley & Sons. p.185–220, 1998.

BORISOVA, E. et al. Using spectroscopy to diagnose skin cancer. **SPIE Newsroom**, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/275390041_Using_spectroscopy_to_diagnose_skin_cancer>. Acesso em: 13 ago. 2018. doi:10.1117/2.1201405.005509.

BORRIELLO, G.; CHOU, P.; ORTEGA, R. Embedded System Co-design: Towards Portability and Rapid Integration. In: M. Sami, and G. DeMicheli (eds.) **Hardware/Software Co-design**. Kluwer Academic Publishers, p. 243-264, 1995.

BRACKMANN, U. **Lambdachrome Laser Dyes**. third ed., Lambda Physik AG, Goettingen, 2000.

CATALANI, F. **Caracterização de laser de diodo para espectroscopia de alta resolução.** Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin", Campinas, 69f, 1997.

CATSOULIS, J. **Designing Embedded Hardware.** Sebastopol, CA, USA: O'Reilly Media, 2009.

CHOI, H. S.; CHO, J. Y.; CHUNG, Y. S.; HONG, Y. B. H.; KIM, S. G. Inhibition of lipopolysaccharide-induced I κ B degradation and tumor necrosis factor- α expression by acriflavine, an antimicrobial agent. **International Journal of Immunopharmacology**, v.22, p.775-787, 2000.

COATON, J. R.; MARSDEN, A. M. **Lamps and Lighting.** 4 ed. Londres. Arnold, 1997.

COURROL, L. C.; SAMAD, R.E. Determination of chicken meat contamination by porphyrin fluorescence. **Journal of Luminescence**, v. 199, p. 67-70, 2018.

CHANG, W. S. C. **Principles of lasers and optics**, Cambridge University Press, pp. 212-245, 2005.

CHAWLA, S. **Current Science.** v. 76, n. 2, pp. 190-199, 1999.

CHEN, H., XIE, Y. J., KIRILLOV, A. M., LIU, L. L., YU, M. H., LIU, W. S., TANG, Y. A ratiometric fluorescent nanoprobe based on terbium functionalized carbon dots for highly sensitive detection of an anthrax biomarker. **Chem. Commun** v.51, n.24, pp. 5036–5039, 2015.

CHUNG, D.N.; HIEU, D.N.; THAO, T.T.; TRUONG, V.-V.; DINH, N.N.: Synthesis and characterization of Ce-doped Y₃Al₅O₁₂ (YAG:Ce) nanopowders used for solid-state lighting. **J. Nanomater.** p.1–7, 2014.

CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y.; CARROL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. **BMES - Biomedical Engineering Society**, 40(2), p516-533. 2012.

COHEN R., WANG T. Overview of Embedded Application Development for Intel Architecture. In: **Android Application Development for the Intel® Platform.** Apress, Berkeley, CA 2014.

D'ALPINO, P. H. et al. Use of fluorescent compounds in assessing bonded resinbased restorations: a literature review. **J Dent**, v.34, n. 9, p.623-34, Oct. 2006.

DUREK, J.; FROHLING, A.; BOLLING, J.; THOMASIUS, R.; DUREK, P.; SCHLUTER, O. K. Non-destructive mobile monitoring of microbial contaminations on meat surfaces using porphyrin fluorescence intensities. **Meat Science**, v.115, p.1–8, 2016.

DUTTA, P.; UPENDRA, G.; GIRIBABU, E.; SRIDHARAN B.; VIPIN, T. A Comprehensive Review of Embedded System Design Aspects for Rural Application Platform. **International Journal of Computer Applications**, v. 106, n.11, pp.0975 – 8887, 2014.

EL-KADY, S.; KHATER, M.; ALHAFNAWI, M. MIPS, ARM and SPARC-an architecture comparison. In: **Proceedings of the World Congress on Engineering**. v., 2014.

EL-HUSSEIN, M. A.; MARZOUK, A. Characterization of Petroleum Crude Oils using Laser Induced Fluorescence. **J. Pet. Environ. Biotechnol.**, v. 6, n. 240, p. 2, 2015.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. Editora Blucher, volume 1, 1972.

FEI, X.; GU, Y. Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe, **Progress in Natural Science**, v. 19, n. 1, pp. 1-8, 2009.

FREITAS, S. R. **Métodos numéricos**. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, p.224, 2000.

GEORGE, J.; MUKHOPADHYAY, P. K.;SHARMA S. K.; KAPOOR, R. High Efficiency Nd: YVO4/KTP Green Laser pumped by Laser Diode, **Proceedings of National Laser Symposium**, pp. 3-4, 1998.

GUILBAULT, G. et al. **Practical Fluorescence: theory, methods, and techniques**. p.664, 1973.

HARSHITHA, K.R.; SUJATHA, S. R.; SIDDAPPA M.;SATISH, P. K. Windows CE 6.0 Stream Driver. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v.1, n.6, pp.55-58, 2012.

JANG, H. S.; JEON, D. Y., “Yellow-emitting $\text{Sr}_3\text{SiO}_5\text{:Ce}^{3+}, \text{Li}$ phosphor for white-light-emitting diodes and yellow-light-emitting diodes,” **Applied Physics Letters**, v.90, n. 4, 2006.

KANE, R.; SELL, H. **Revolution in lamps: a chronicle of 50 years of progress**. The Fairmont Press, Inc., 2001.

KARWOWSKI, W. **International Encyclopedia of Ergonomics and Human Factors**, Second Edition - 3 Volume Set. CRC Press. 2006.

KURACHI, C.; FONTANA, C.R.; MELO, C.A.S.; ROSA, L.E.B.; BAGNATO V.S. Optical biopsy of chemical-induced tongue lesions in Golden Syrian hamsters: an *in vivo* study. **Laser Physics**, v. 14(4), p. 502-06, 2004.

KURACHI, C.; VOLLET-FILHO, J. D.; BAGNATO, V. S. Detecção óptica no diagnóstico. In: BAGNATO, V.S. (Org.). **Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde**. 1 ed. São Paulo: Livraria da Física, v., p. 81-95, 2008.

KRAHENBUHL, F. M.; TERAMOTO, E. H. ; KIANG, C. H. Aplicação do método de fluorescência induzida por laser na caracterização de áreas contaminadas com resíduos oleosos. **Águas Subterrâneas**, v. 32, p. 79-90, 2018.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd ed. New York: Springer, 2006.

LEE, Y.K.; LEE, W.S.; HWANG, J.T.; KWON, D.Y.; SURH, Y.J.; PARK, O.J. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPK α -PPAR- γ in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPK α -COX-2 in cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57 n.1 p.3053-10, 2009.

LENZ, G. **Métodos fotométricos**. Porto Alegre: UFRGS, 1997.

LIU, X.; METZGER, L.E. Application of Fluorescence Spectroscopy for Monitoring Changes in Nonfat Dry Milk During Storage, **Journal of Dairy Science**, v. 90 , n. 1, p. 24–37, 2007.

MALDONADO, E. P. **Mecanismos de interação laser-tecido** [apostila do curso de mestrado profissionalizante de lasers em odontologia do Ipen]. São Paulo, SP: Ipen, 2000.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence--a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

LUMILEDS. **DS56 Luxeon® Rebel**. Disponível em: <<https://datasheet.octopart.com/LXML-PWC1-0100-Lumileds-datasheet-5322713.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2020.

MARTINHO, J. M. G. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. **Bol. da Soc. Port. Química**, v. 52, p. 44–46, 1994.

MASSEY, H. S. W.; McDANIEL, E. W.; BEDERSON, B. **Applied Atomic Collision Physics** Academic Press, New York, 1982.

MENEZES, P. F. C. de. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MILAC, V.; BANERJEE, S.; LANDIS-PIWOWAR, K.R.; SARKAR, F.H.; MAJUMDAR, A.P.N.; DOU, Q.P. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Research**, v.68, n.18, p.7283-7292, 2008.

MOHAMMADI, H., ESLAMI, E. Investigation of spectral resolution in a Czerny Turner spectrograph. **Instrum Exp Tech**, v.53, p.549–552, 2010.

MORIYAMA, L. T. **Métodos simplificados para obtenção de distribuição de luz em tecidos biológicos: aplicação para terapia fotodinâmica**. 2011. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

PINI, R. **Resolving resolution oemagazine**. The International Society for Optics and Photonics, 2003 Disponível em: <https://spie.org/news/resolving-resolution?SSO=1> Acesso: 28/04/2020.

NAKAMURA, S.; MUKAI, T.; SENOH M.; Candela-class highbrightness InGaN/AlGaN double-heterostructure blue-lightemitting diodes, **Applied Physics Letters**, v. 64, n. 13, pp. 1687–1689, 1994.

PAVONI, J.F. et al . Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, São Paulo , v. 36, n. 4, p. 01-09, Dec. 2014.

PETERS, D. C. A comparison of mercury arc lamp and laser illumination for flow cytometers. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.27, n.1, p.241–245, 1979.

PINA, F. Espectrofluorimetria. **Bol. da Soc. Port. Química**, v. 54, p. 88–91, 1994.

PIZZO, P.; SCAPIN, C.; VITADELLO, M.; FLOREAN, C.; GORZA, L. Grp94 acts as a mediator of curcumin-induced antioxidant defence in myogenic cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.14, n.4, p.970-981, 2010.

PONS, O. R.; GREGORIO, D. M.; MATEO, J. V. G.; CALATAYUD, J. M. Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine. **Analytica Chimica Acta**, v.438, p.149-156, 2001.

PRESCIUTTI, A.; ASDRUBALI, F.; MARROCHI, A.; BROGGI, A.; PIZZOLI, G.; DAMIANI, A. Sun Simulators: Development of an Innovative Low Cost Film Filter. **Sustainability**, v.6, p.6830-6846, 2014.

RAYMOND, C. **Princípios Básicos de Espectroscopia**. Editorial AC, Libros Científicos y Técnicos, Madrid, 1 ed., 1983.

RANGEL, H. A.; MERCON, F. Estudo da emissão por fluorescência de ultravioleta na quantificação de um inibidor de corrosão do tipo sal de amônio quaternário em água. **Quím. Nova**, São Paulo, v.35, n.7, p.1287-1293, 2012.

RATIVA, D. J.; BARBALHO, J. P. B.; FIGUEIREDO, J. M. L. ; DeARAUJO R.E.; GOMES, A. S. L.; SOUZA FILHO, L. G. C. ; MARSDEN, A. Perspectives on in vitro fungal diagnosis with UV light. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. v. 23, p. 25-30, 2007.

RAZAVI, F. et al. Chlorophyll fluorescence as a tool for evaluation of drought stress in strawberry. **Photosynthetica**, v.46, n.04, p.631-633, 2008.

RENDELL, D.; MOWTHORPE, D. J. **Fluorescence and phosphorescence spectroscopy**. Published on behalf of ACOL, London by Wiley, 1987.

RONAN, P. Electromagnetic spectrum **Wikimedia**. Disponível em < https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_spectrum.svg > Acesso em: 14 de outubro de 2020.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures". **Analytical Chemistry**. v.36, n.8, p.1627–39, 1964.

SCHEELINE, A. How to Design a Spectrometer. **Applied Spectroscopy**, v.71, n.10, p.2237-2252. 2017.

SCHUBERT, E. F. **Light-Emitting Diodes**. Cabridge, New York, 2006.

SHARMA, V. K.; SAHARE, P. D.; RASTOGI, R. C.; GHOSHAL, S. K.; MOHAN, D. Excited state characteristics of acridine dyes: acriflavine and acridine orange, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, v.59, p. 1799–1804, 2003.

SILVA, A. P. **Inativação fotodinâmica dos micro-organismos causadores da onicomiose – estudo in vitro e clínico**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

SKOOG, D. A; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.

SORSTROM S.E. A note on in-situ fluorescence for detection of oil in water. **Oil and Petrochemical Pollution**, n.2, v. 2, p.125-132, 1985.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1755-1774, 2008.

SOUZA, C. V. et al. Medições de refletância luminosa total, direta e difusa em amostras planas. In: **6 Congr. Bras. Metrol.** 2011.

SRIVASTAVA, A.M.; SOMMERER T.J., **Electrochemical Society Interface**, v.7, n.28, 1998.

TANENBAUM, A. S.; AUSTIN, T. **Organização estruturada de computadores**. 6. ed.: PEARSON, 2013.

THOMS, L.J.; GIRWIDZ, R. Experimenting from a distance: optical spectrometry via the Internet. **Conference: MPTLat**. Madrid, v.18, 2013.

TUBOY, A. M. **Estabilização de lasers de diodo para utilização em espectroscopia atômica**. 1990. Dissertação (Mestrado em Física Básica) - Instituto de Física e Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1990. doi:10.11606/D.54.1990.tde-15052009-101617. Acesso em: 2020-03-06.

VITOLO, M.; PESSOA JUNIOR, A. **Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial**. Editora Blucher, 2015.

VO-DIHN, T. **Biomedical Photonics Handbook**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

WANG, Y; LU, Z; WU, H; LV, F. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n.1, p.71-74, 2009.

WIEMANN, C. E.; HOLLBERG, L. Using diode lasers for atomic physics. **Rev. Sci. Instrum.**, v.62, p.1–20, 1991.

WILLARD, H.H.; MERRIT Jr., L.L.; DEAN, J. A; SETTLE Jr., F. A. **Instrumental Methods of Analysis**, 7. Edn. Belmont: Wadsworth, (1988).

WILLIAMS, A. R. **An Introduction to Fluorescence spectroscopy**, v. 65, p. 353, 2000.

WONG, S.H.Y. **Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology by Liquid Chromatography**. CRC Press, p.512, 1985.

XIN-HUA, H.; JU-QUIN, L. **Optical Detection of Cancers**. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**. Ed. Taylor & Francis, 2005.

YOUNG, M. **Óptica e Lasers**, 1ª edição, p.448. EDUSP, 1998.

ZHANG, J.Y.; BOYD, I.W. Lifetime investigation of excimer UV sources. **Applied Surface Science** v.168, n.1, p.296-299. 2000.

ZHANG, H.; ZHAO, S.;YANG,K.; LI, G.; LI,D.; ZHAO, J.,WANG, Y., Solid-state YVO4/Nd:YVO4/KTP green laser system for the generation of subnanosecond pulses with adjustable kilohertz repetition rate, **Appl. Opt.**, v.52, pp. 6776-6781, 2013.

Apêndice A – Esquemático da fonte de corrente do laser violeta