



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA POLITÉCNICA E INSTITUTO DE MATEMÁTICA
PPGM-PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MECATRÔNICA

VITOR LEÃO FILARDI

ESPECTROTOPÓGRAFO DE FLUORESCÊNCIA UV-VIS
PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS
FLUORESCENTES HOMOGÊNEOS OU NÃO -
SPECTRATOMUS-UVIS

Salvador, BA

2016

VITOR LEÃO FILARDI

**ESPECTROTOPÓGRAFO DE FLUORESCÊNCIA UV-VIS PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS FLUORESCENTES
HOMOGÊNEOS OU NÃO - SPECTRATOMUS-UVIS**

Projeto de Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Mecatrônica, programa conjunto entre o Departamento de Engenharia Mecânica e o Departamento de Ciência da Computação, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em mecatrônica.

Orientador: Prof. Dr. Iuri Muniz Pepe

Salvador, BA

2016

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor.

Filardi, Vitor Leão

Espectrotopógrafo de fluorescência UV-VIS para caracterização de substâncias e meios fluorescentes homogêneos ou não - Spectratomus-UVIS / Vitor Leão Filardi. – Salvador, BA, 2016.

179 f. : il

Orientador: Iuri Muniz Pepe.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Mecatrônica) – Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica e Instituto de Matemática, 2016.

1. Espectrofluorímetro. 2. Espectrotopógrafia de fluorescência. 3. Fluorescência. I. Pepe, Iuri Muniz. II. Título.

VITOR LEÃO FILARDI

**ESPECTROTOPÓGRAFO DE FLUORESCÊNCIA UV-VIS PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS FLUORESCENTES
HOMOGÊNEOS OU NÃO - SPECTRATOMUS-UVIS**

Projeto de Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Mecatrônica, programa conjunto entre o Departamento de Engenharia Mecânica e o Departamento de Ciência da Computação, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em mecatrônica.

Aprovada em 3 de outubro de 2016.

Iuri Muniz Pepe - Orientador

Doutor em Física Nuclear, Universite Catholique de Louvain, U.C.L., Bélgica.
Universidade Federal da Bahia

Germano Pinto Guedes

Doutor em Física Nuclear Aplicada, COPPE/UFRJ
Universidade Estadual de Feira de Santana

Marcus Vinicius Santos da Silva

Doutor em Física, UFBA
Universidade Federal da Bahia

Mauro Korn

Doutor em Química Analítica, USP
Universidade de São Paulo

Paul Denis Etienne Regnier

Doutor em Ciências da Computação, DMCC-UFBA
Universidade Federal da Bahia

Salvador, BA
2016

Dedico à minha esposa Rebeca, aos meus pais e à minha filha Catarina.

AGRADECIMENTOS

Antes de entrar no mérito daqueles que conviveram comigo durante todos os anos de pesquisa, quero agradecer a Deus por todos os caminhos e riscos em que me colocou, e sei das dificuldades que encontrei para concluir esse trabalho.

Quero agradecer a Rebeca, aos meus pais, irmãos e por me terem me incentivado e ajudado em todo o meu processo de formação.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, o Prof. Dr. Iuri Muniz Pepe pelo seu bom humor, suas perturbações e as suas broncas para concluir esse trabalho e acima de tudo, pelo seu exemplo de ser um professor por excelência. Muito obrigado por ser meu orientador e me ajudar a realizar este sonho.

Aos amigos e irmãos do LaPO, pelo alto astral que é trabalhar com vocês no LaPO. Alguns me ajudaram, outros nem tanto, mas tudo isso faz parte, valeu pessoal.

RESUMO

FILARDI, Vitor Leão. Espectrotopógrafo de fluorescência UV-VIS para caracterização de substâncias e meios fluorescentes homogêneos ou não - Spectratomus-UVIS. 179 f. il. 2016. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Mecatrônica, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Os espectrofluorímetros são usados para identificar diferentes tipos de componentes químicos através de sua fluorescência. Muitos grupos de pesquisa utilizam espectrofluorimetria para investigar adulterações de óleos, determinar a concentração e a qualidade de substâncias, identificar a natureza do material, determinar a taxa de concentração de uma mistura etc. Neste trabalho é apresentado um equipamento que permite determinar a fluorescência em varredura espacial (eixo Z e ângulo azimutal θ), possibilitando a análise de espécies químicas distribuídas na geometria de amostras de tamanhos e formas variáveis. Neste método de análise é possível utilizar a fluorescência natural ou por uso de aditivos químicos como marcadores fluorescentes, corantes ou traçadores óticos permitindo a caracterização de amostras preparadas por diferentes processos químicos, não estando limitado à amostras em solução. O espectrotopógrafo de fluorescência, Spectratomus-UVIS, proposto e desenvolvido aqui, varre a amostra ao longo do eixo Z (0 e $31,713 \pm 0,006$ mm) e em torno do eixo azimutal, entre 0 e $360^\circ \pm 0,9^\circ$ em θ , sendo assim é possível estabelecer a superfície de fluorescência da amostra ou uma espectrotopografia de fluorescência. Os espectrofluorímetros convencionais só são capazes de efetuar a medição de fluorescência em substância homogênea ou quase homogênea, determinando a média dos fótons produzidos em um spot (100 mm^2) da amostra. Foram realizados dois ensaios, sendo um deles com uma amostra dotada de uma descontinuidade ótica de 5,6 mm de espessura e conseguiu-se medir a espessura dessa descontinuidade com incerteza de 5 % e delimitar a região entre 15,4 até 20,8 mm onde se encontrava essa descontinuidade ótica com erro de 11 %. Já no segundo ensaio se utilizou amostras com QD com dois diâmetros diferentes e uma mistura deles num total de 5 amostras. Assim, foram adquiridas suas espectrotopografias quando novas e posteriormente passados 49 dias e comparado seus resultados. Uma série de técnicas de análise se fizeram necessárias para se caracterizar essas amostras. Ficou comprovado que as mesmas em sua síntese não eram tão homogêneas quanto se esperava e o seu envelhecimento não ocorreu de forma uniforme comprovando a versatilidade do equipamento desenvolvido. Com essa nova técnica de análise espera-se ser capaz de ampliar o processo de investigação de caracterização de amostras sejam elas homogêneas ou não. Este novo equipamento ainda se encontra na fase de protótipo, mas com patente requerida.

Palavras-Chaves: Espectrofluorímetro, Espectrotopografia de fluorescência, fluorescência, espectrofluorimetria, aquisição de dados, caracterização de substâncias.

ABSTRACT

FILARDI, Vitor Leão. The fluorescent spectrotopographer UV-VIS of characterization of substances, being them homogeneous or not, Spectratomus-UVIS. 179 f. il. 2016. Doctoral Thesis - Postgraduate Program in Mechatronics, Federal University of Bahia, Salvador.

The spectrofluorimeters are used to identify different types of chemical components through their fluorescence. Several research groups use spectrofluorimeters to investigate oil adulterations, determine concentration and quality of substances in a mixture, identify the nature of materials, etc. This work presents an equipment that allows one to determine fluorescence in spatial scans (Z axis and azimuthal angle θ) and therefore, the analysis of chemical specimens distributed in the geometry of samples of various shapes and sizes. This new equipment can be used to characterize liquid and solid samples and smears on glass slides. In this method of analysis, it is possible to use either natural fluorescence or chemical additives as fluorescent markers, pigments and optical tracers, characterizing samples prepared through different chemical processes, such as: drying, hydrogenation, derivatization, etc therefore it is not limited to soluble samples. The fluorescent spectrotopographer Spectratomus-UVIS, which is presented here, runs through the sample along the Z axis (0-31.713 mm) and around the azimuthal axis (between 0-360 °) with a resolution of 0.006 mm in Z and 0.9 ° in θ . Thus, it is possible to determine the surface of fluorescence of a sample or a spectrotopography of fluorescence. The conventional spectrofluorimeters are only capable of measuring the fluorescence of homogeneous substances, determining the average of photons produced in one spot (100 mm^2) of the sample. Two essays were made; one used a sample with an optical discontinuity of a thickness of 5.6 mm and a 5 % uncertainty, locating the discontinuity between 15.44 mm and 20.82 mm with 11 % uncertainty. The second essay used QD samples with two different diameters and a mixture of those, in a total of five samples. The spectrotopography of the samples was determined when they were new and 49 days later. The comparison between the two results proved that none of the samples were so homogeneous as expected and their aging did not occur evenly. This essay shows the versatility of the equipment. With this new technique of analysis, we expect to improve the process of characterization of samples, being them homogeneous or not. This new equipment is still in the prototype stage and its patent has already been applied.

Keywords: spectrofluorimeter, spectrotopography of fluorescence, fluorescence, spectrophotometry, data acquisition, characterization of substances.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação gráfica do Desvio de Stokes, em azul o espectro de absorção centrado em 440 nm e em vermelho o espectro de emissão em 543 nm	25
Figura 2 – Diagrama de Jablonski de excitação do fluoróforo, decaimento radioativo e decaimento não radioativo. S_n denota a escala de energia, S_{nm} representa os sub-níveis de energia; S_0 é o estado eletrônico singlete fundamental; S_1 e S_2 são sucessivos níveis de energia maiores dos estados excitados do estado singlete eletrônico; T_0 é o estado de menor energia do estado eletrônico tripleto.	26
Figura 3 – Representação gráfica de um diodo e junção $p - n$	30
Figura 4 – Representação de um led internamente. Versão Traduzida Fonte: HowStuffWorks	30
Figura 5 – Representação da Lei de Beer-Lambert, onde uma quantidade de luz I_0 chega a amostra, I_T a luz que consegue atravessar o comprimento L da amostra.	31
Figura 6 – Representação gráfica dos tipos de reflexão: reflexão especular e reflexão difusa. Versão traduzida. Fonte:(GIANNIG46, 2010)	33
Figura 7 – Representação gráfica das intensidades de luz envolvidas em diversos processos de interesse para a caracterização ótica de substâncias	34
Figura 8 – Representação de um espectrofotômetro de feixe simples de baixa complexidade onde a informação é mostrada diretamente em um display.	35
Figura 9 – Diagrama típico de um espectrofotômetro de duplo feixe, onde informação adquirida é a diferença entre a amostra e a referência que normalmente é a própria luz.	36
Figura 10 – Foto de uma matriz em linha de fotodiodos, fabricante:HAMAMATSU, modelo S3903-1024Q (HAMAMATSU, 2016).	37
Figura 11 – Diagrama do filtro fluorímetro, em destaque temos o filtro de seleção do comprimento luz I_0 e o filtro da fluorescência de interesse I'_F	38
Figura 12 – Representação de um espectrofluorímetro equipado com um CCD. Em detalhe, a visão interna do CCD com a luz decomposta em cada fotosensor.	39
Figura 13 – Componentes de um sistema mecatrônico complexo	41
Figura 14 – Modelo 3D do equipamento espectrotopógrafo desenvolvido.	42
Figura 15 – Diagrama do funcionamento mecânico e disposição dos módulos e das interfaces do espectrotopógrafo de fluorescência UV-VIS - Spectratomus-UVIS	43
Figura 16 – Guia de escorregamento em rabo de andorinha e motor de passo	44

Figura 17 – Diagrama interno do porta-LED, em detalhe a posição de corte dos terminais do LED.	45
Figura 18 – Foto do conjunto suporte da luz de fixação, fixador da fibra, porta-amostra e fibra de captação	46
Figura 19 – Diagrama do sistema de aquisição de dados de fluorescência, em detalhe para a disposição da luz de excitação e da captação da fluorescência do espectrotópografo de fluorescência UV-VIS - Spectratomus-UVIS . . .	47
Figura 20 – Foto do Spectratomus-UVIS finalizado	48
Figura 21 – Diagrama técnico da fonte de alimentação do módulo de controle & acionamento	49
Figura 22 – Diagrama técnico da unidade de processamento embarcado e da interface de comunicação serial e USB	50
Figura 23 – Diagrama do circuito de comutação da bobina do motor de passo. . . .	51
Figura 24 – Curva de corrente e tensão de saturação do TIP122, em destaque os valores utilizados para os cálculos. Eixos traduzidos da folha de dados .	51
Figura 25 – Diagrama interno do CI 74AC574	52
Figura 26 – Diagrama da interface entre o μC e o circuito de acionamento das bobinas	52
Figura 27 – Do lado esquerdo diagrama do conector de E/S para os botões do painel e das chaves de fim de curso. Do lado direito detalhe do conector do <i>display</i> de LCD	53
Figura 28 – Diagrama do circuito da chave ótica utilizada como chave de fim de curso dos eixos da máquina	54
Figura 29 – Diagrama do circuito regulador de tensão de 1,5V para a lâmpada de halógena de excitação e acionamento a relé.	54
Figura 30 – Diagrama do circuito de conversão DAC para controle da corrente no LED de excitação	55
Figura 31 – Gráfico dos pontos experimentais da Tabela 1 dos valores de corrente obtidos para os LEDs e a reta de aproximação $f(x)$	57
Figura 32 – Curva característica do CCD ILX511B extraído da folha de dados do fabricante Sony, os eixos foram traduzidos,(CORPORATION, 2008) . .	59
Figura 33 – Tela inicial do Spectratomus-UVIS	61
Figura 34 – Tela inicial com o informe da versão do <i>firmware da máquina</i>	61
Figura 35 – Informe de USB conectado no computador	62
Figura 36 – Informe de USB desconectado do computador	62
Figura 37 – Exemplo de uma tela em terminal emulado serial informando conectividade com o Spectratomus-UVIS	62
Figura 38 – Mensagem de conexão estabelecida entre o equipamento e o computador.	62
Figura 39 – Mensagem informando que a conexão não foi estabelecida entre o equipamento e o computador.	62

Figura 40 – Exemplo de uma tela em um terminal emulado serial listando o menu de comandos do Spectratomus-UVIS	63
Figura 41 – Tela informando a movimentação do eixo Z - descendo	63
Figura 42 – Tela informando a movimentação do eixo Z - subindo	63
Figura 43 – Tela informando a movimentação angular θ no sentido horário.	64
Figura 44 – Tela informando a movimentação angular θ no sentido anti-horário	64
Figura 45 – Tela informando o fim do deslocamento dos eixos.	64
Figura 46 – Exemplo de uma sequência de retorno do comando $\langle \mathbf{I} \rangle$ dado em terminal emulado serial.	64
Figura 47 – Exemplo de uma sequência de dados enviados pela serial quando o botão \uparrow foi pressionado 4 vezes pelo usuário.	64
Figura 48 – <i>Display</i> informando o valor inicial da contagem do DAC da corrente no LED.	65
Figura 49 – <i>Display</i> informando a intensidade de corrente no LED	65
Figura 50 – <i>Display</i> informando a intensidade máxima de corrente no LED	65
Figura 51 – Posicionando o eixo azimutal θ	65
Figura 52 – Posicionando o eixo Z.	65
Figura 53 – Posicionamento finalizado.	65
Figura 54 – Sequência completa do texto enviado pelo μC para a IHM em resposta ao comando $\langle \mathbf{P} \rangle$ para o posicionamento inicial do porta-amostra.	65
Figura 55 – <i>Display</i> informando que a lâmpada de <i>xenon</i> está ligada.	66
Figura 56 – <i>Display</i> informando que a lâmpada de <i>xenon</i> está desligada.	66
Figura 57 – sequência completa do texto enviado pelo μC para a IHM em resposta ao comando $\langle \mathbf{F} \rangle$, para acionamento da lâmpada de halogênio e desligamento automático.	66
Figura 58 – <i>Display</i> informando que os motores foram parados e desligados.	66
Figura 59 – Captura da tela da IHM do Spectratomus-UVIS	68
Figura 60 – Captura em detalhe dos botões de comando da IHM do Spectratomus-UVIS	68
Figura 61 – Captura em detalhe dos ajustes de deslocamento em Z, θ e do valor de corrente no LED.	69
Figura 62 – Captura da tela de parâmetros da varredura do espectrotopografia de fluorescência da amostra.	69
Figura 63 – Exemplo de uma aquisição de dados com uma amostra bifásica - água+azeite de oliva.	70

Figura 64 – Captura da tela que dá acesso aos dados individuais do Spectratomus-UVIS	71
Figura 65 – Captura da tela da navegação com os cursores nos dados adquiridos.	71
Figura 66 – Organização da saída de dados dos espectros adquiridos em formato txt.	72
Figura 67 – Fotos da amostra preparada para o teste de deslocamento	73
Figura 68 – Representação gráfica da amostra sólida na cubeta	74
Figura 69 – Ilustração das condições sob a qual a amostra foi submetida ao ensaio do defeito ótico na amostra sólida	74
Figura 70 – Espectrotopógrafia da cubeta vazia nas duas configurações A e B de ensaio.	75
Figura 71 – Ilustração do posicionamento da amostra em relação as condições de iluminação e coleta da luz de fluorescência.	76
Figura 72 – Espectro de emissão do LED utilizado no experimento adquirida pelo próprio Spectratomus-UVIS	76
Figura 73 – Espectrotopógrafia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 1	78
Figura 74 – Contornos na região de interesse na Posição 1. As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.	78
Figura 75 – Espectrotopógrafia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 2	79
Figura 76 – Contornos na região de interesse na Posição 2. As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.	80
Figura 77 – Espectrotopógrafia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 3	80
Figura 78 – Contornos na região de interesse da face rugosa para lisa , D→A (Posição 3). As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.	81
Figura 79 – Espectrotopógrafia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 4	82
Figura 80 – Contornos na região de interesse da face rugosa para lisa , B→C (Posição 4). As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.	82
Figura 81 – Superposição das gaussianas da luz de excitação e de fluorescência identificando o local do defeito ótico.	84
Figura 82 – Fotos do conjunto de amostras sintetizadas com QD	87
Figura 83 – Espectros de fluorescência dos QD de MPA-CdTe	87
Figura 84 – Espectro de emissão do LED utilizado no experimento de caracterização de pontos quânticos.	88
Figura 85 – Espectrotopógrafia de fluorescência da amostra QD1	89
Figura 86 – Espectrotopógrafia de fluorescência da amostra QD2	89
Figura 87 – Espectrotopógrafia de fluorescência da amostra QD3	90
Figura 88 – Espectrotopógrafia de fluorescência da amostra QD4	90

Figura 89 – Espectrotopografia de fluorescência da amostra QD5	91
Figura 90 – Espectro de fluorescência na base e no topo das amostras com QD=2,3nm	93
Figura 91 – Espectro de fluorescência na base e no topo das amostras com QD=3,6nm	93
Figura 92 – Curva D de aproximação de ordem 3 para o dimensionamento do tamanho do QD em função do λ de fluorescência para MPA-CdTe e os dados dos artigos utilizados.	95
Figura 93 – Espectros de fluorescência, (a), no início e no fim da amostra QD5 e (b), a superposição dos espectros de fluorescência das amostras QD1,QD3 e QD5 todos na altura de 1,8 mm da cubeta (b)	96
Figura 94 – Pontos de máximos de fluorescência ao longo das amostras de pontos quânticos com diâmetro de 2,3 nm	97
Figura 95 – Pontos de máximos da fluorescência ao longo das amostras de pontos quânticos com diâmetro de 3,6 nm	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Levantamento dos valores de corrente em função do comprimento de onda de emissão do LED.	57
Tabela 2 – Lista dos comandos e parâmetros para o módulo de controle & acionamento.	63
Tabela 3 – Descrição das funções da IHM	69
Tabela 4 – Tabela dos resultados do defeito ótico inserido na amostra na região da luz de excitação	83
Tabela 5 – Tabela dos resultados do defeito ótico inserido na amostra na região da luz de fluorescência	83
Tabela 6 – Diâmetros dos QD em função da luz de fluorescência para as amostras de MPA-CdTe pela curva de aproximação D.	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ C Microcontrolador.

ADC Analogic/digital converter - conversor analógico/digital.

CAD *Computer aided design* - desenho assistido por computador.

CCD *Charge coupled device* - dispositivo de carga acoplada.

CI Circuito integrado.

CLK *Clock* - relógio.

CNC Controle numérico computadorizado.

CNPq Conselho Nacional de Pesquisas.

DAC *Digital/analogic converter* - conversor digital/analógico.

DNA Ácido desoxirribonucléico, composto orgânico que contém as instruções genéticas de todos os seres vivos e alguns vírus..

E/S Dispositivo de entrada e saída.

EEPROM *Electrically-erasable programmable read-only memory* - memória de somente leitura apagável e programável eletronicamente.

FF *Flip-Flop*.

FWHM *Full width half maximum* - largura total na metade da máxima.

GND *Ground* - terra.

ICSP In-circuit serial programming - Programação serial em circuito.

IHM Interface homem-máquina.

IR Infravermelho.

LaPO Laboratório de Propriedades Óticas.

LCD *Display* de cristal líquido.

LED *Light emitting diode* - Diodo emissor de luz.

LS Ligante de superfície.

LSB *Least significant bit* - bit menos significativo.

MSB *Most significant bit* - bit mais significativo.

NA Normalmente aberta.

OEM *Original equipment manufacturer* - fabricante do equipamento original.

OP-AMP Amplificador operacional.

PC *Personal computer* - computador pessoal.

PMT *Photomultiplier tube* - fotomultiplicadora.

POR *Power-on reset* - reinicialização.

QD Quantum Dots - Ponto Quântico.

SO Sistema operacional.

TTL Transistor-transistor logic - lógica transistor-transistor.

USB *Universal serial bus* - Barramento universal serial.

UV Ultravioleta.

UV-VIS-IR Ultravioleta-visível-infravermelho.

WPF *Windows presentation foundation*.

LISTA DE SÍMBOLOS

α	coeficiente molar de absorbância
Γ	taxa de decaimento radiativo
μ	centro da curva de distribuição normal
σ	meia largura de uma distribuição normal
τ	tempo de vida de fluorescência
τ_0	tempo de vida de fluorescência intrínseco
$\varepsilon(\bar{\nu})$	representa o espectro de absorção
A	absorbância
c	concentração do analito na solução
F	fluorescência
$F(\bar{\nu})$	espectro de emissão na escala do número de ondas em (cm^{-1})
F_I	fluxo de radiação eletromagnética incidente
F_R	fluxo de radiação eletromagnética refletido
I_0	intensidade da luz incidente
I_T	intensidade da luz transmitida
I_A	intensidade da luz absorvida
I_{SCAT}	intensidade da luz espalhada
k_{nr}	taxa de decaimento não-radiativo
L	percurso ótico
N	fração do fluoróforo no estado excitado
Q	rendimento quântico de fluorescência
R	refletância
T	transmitância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	O PROBLEMA	20
1.1.1	A Hipótese	20
1.2	OBJETIVOS	20
1.2.1	Objetivo geral	20
1.2.2	Objetivos específicos	20
1.3	JUSTIFICATIVA	21
1.3.1	Topografia de superfície	22
1.4	ORGANIZAÇÃO DA TESE	23
2	CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1	LUMINESCÊNCIA	24
2.1.1	Fluorescência	27
2.1.2	Fosforescência	27
2.1.3	Tempo de vida de fluorescência e rendimento quântico	28
2.1.4	Eletroluminescência	29
2.2	MEDIDAS DE LUZ	30
2.3	CARACTERIZAÇÃO ÓTICA DE SUBSTÂNCIAS	34
2.3.1	Espectrofotômetro	35
2.3.1.1	Espectrofotômetro de feixe simples	35
2.3.1.2	Espectrofotômetro de duplo feixe	36
2.3.1.3	Espectrofotômetro multicanal	37
2.3.2	Filtro Fluorímetros ou Fluorímetros	37
2.3.3	Espectrofluorímetros	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS EM MECATRÔNICA	40
3.1	SISTEMAS MECATRÔNICOS COMPLEXOS	40
3.2	O ESPECTROTOPÓGRAFO DESENVOLVIDO	41
3.3	<i>HARDWARE</i> ELETRÔNICO DESENVOLVIDO	48
3.3.1	Módulo de controle & acionamento	48
3.3.1.1	Fonte de alimentação	48
3.3.1.2	Microcontrolador	49
3.3.1.3	Circuito de acionamento dos motores	51
3.3.1.4	Módulos de entrada/saída	52
3.3.2	Módulo de aquisição de dados de fluorescência	58
3.4	<i>SOFTWARE</i> DESENVOLVIDO	60
3.4.1	<i>Software</i> embarcado na máquina - <i>firmware</i>	60
3.4.2	Interface de controle no computador - IHM	68

4	TESTES DE VALIDAÇÃO E RESULTADOS	73
4.1	ENSAIO DO DESLOCAMENTO NO EIXO Z E ÂNGULO AZIMUTAL θ	73
4.1.1	Resultados	77
4.2	AMOSTRAS EM PONTOS QUÂNTICOS	86
4.2.1	Resultados	88
5	CONCLUSÕES	99
5.1	TRABALHOS FUTUROS	101
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICES	109
	APÊNDICE A – DEPÓSITO DA PATENTE	110
	APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS	131
	APÊNDICE C – DESENHOS MECÂNICOS	160
	APÊNDICE D – DIAGRAMAS ELETRÔNICOS	164
	APÊNDICE E – PROGRAMA EMBARCADO	170

1 INTRODUÇÃO

A química analítica se utiliza de vários processos físico-químicos para mensurar diferentes aspectos de uma espécie química. São equipamentos óticos de uso corrente na química analítica: os espectrômetros UV-VIS-IR, os espectrofotômetros, os espectrofluorímetros, os espectrômetros Raman, os espectrômetros de absorção atômica, espectrômetros de emissão atômica e espectrômetros de chama (BAEYENS, 1990) e (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). Os compostos fluorescentes se caracterizam por dois aspectos: (i) o espectro de excitação; ou o conjunto de comprimentos de onda e quantidades de luz absorvida, (ii) o espectro de emissão; ou o intervalo de comprimentos de onda e a intensidade de luz emitida durante a des-excitação. Estes aspectos são as assinaturas de fluorescências de um determinado composto, geralmente duas espécies químicas dificilmente têm a mesma assinatura de fluorescência (GUILBAULT, 1990). Este princípio faz com que a fluorescência seja uma técnica analítica robusta e precisa (SU; ASAFU-ADJAYE; Thomas Karnes, 1987) e (GUILBAULT et al., 1973).

Fluorimetria é a medida de fluorescência. O instrumento utilizado para medir a fluorescência é chamado de fluorômetro ou fluorímetro. Assim, um fluorímetro precisa ser munido de uma fonte de luz monocromática ou de amplo espectro, capaz de excitar o composto (analito), em seguida, este mesmo equipamento determina a intensidade da luz emitida pelo composto. Essa luz emitida será proporcional à concentração do analito no meio em que se encontra dissolvido. Desta forma a reação, ou resposta, ao estímulo pode ser mensurada por sensores óticos, tais como: fotodiodo, fototransistor, fotomultiplicadora (PMT - *photomultiplier tube*), câmeras de CCD (*charge coupled device*) etc. (WILLIAMS, 2000), (DASGUPTA et al., 2003), (SCHENK et al., 2000) e (UDT Sensors, 1982).

A utilização de métodos analíticos baseados em fluorescência cresceu consideravelmente nos últimos 25 anos, de forma que a espectroscopia de fluorescência e a fluorescência resolvida no tempo são consideradas, hoje, métodos de investigação de primeira linha. São exemplos de sua aplicação: biotecnologia, diagnósticos médicos, sequenciamento de DNA, análise forense, análise genética, adulteração de biodiesel, estudo da qualidade de produtos alimentícios, etc. Esses equipamentos se tornaram instrumentos analíticos valiosos, tanto para a análise quantitativa, quanto para a investigação qualitativa (HOEK; VERVOORT; VISSER, 1983), (SANTANA; KORN; SANTOS, 2013), (SANTANA et al., 2015) e (SAMPAIO; CAMACHO, 2006).

1.1 O PROBLEMA

Apesar da evolução tecnológica dos espectrofluorímetros atuais, estes equipamentos ainda ficam restritos aos analitos homogêneos, onde a fluorescência é medida em um pequeno ponto (*spot*) de sua área, ou seja, as amostras são caracterizadas, em geral, em um só ponto.

A proposta de um espectrotopógrafo de fluorescência é de tornar possível a análise da fluorescência na superfície de amostras homogêneas ou não, permitindo uma caracterização mais precisa e extensa. Essa forma de investigação cria uma nova metodologia de análise, com impacto sobre a síntese de novos compostos, sejam eles sólidos ou líquidos.

1.1.1 A Hipótese

Seguindo-se esta racional, assumi-se como hipótese de trabalho que é possível diminuir as incertezas na caracterização de amostras sólidas ou líquidas, não necessariamente homogêneas, fazendo a medição da fluorescência resolvida no espaço, entende-se por isso, sobre a área ativa da amostra.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Este trabalho se propõe a desenvolver um aparato mecatrônico de caracterização de substâncias homogêneas ou não, pela medida de sua fluorescência em função de sua geometria.

1.2.2 Objetivos específicos

Estudar o fenômeno de luminescência no que tange o equipamento proposto, bem como, os equipamentos correlatos que servem para a caracterização ótica de substâncias.

Fazer o levantamento da anterioridade do equipamento proposto, realizando a busca nas bases de patentes nacionais e internacionais e assim realizar o registro de pedido de patente.

Projetar, especificar, dimensionar e montar os circuitos eletrônicos e partes mecânicas que serão necessárias à montagem de um protótipo de engenharia do equipamento proposto.

Desenvolver um programa embarcado capaz de (i) controlar o acionamentos de motores de passo, (ii) controlar a intensidade da luz a ser emitida, (iii) ler os estados dos sensores de fim de curso e botões, (iv) enviar mensagens para um display e (v) realizar uma comunicação com o um computador pessoal (PC).

Desenvolver um programa aplicativo em um PC que possa (i) controlar o posicionamento da amostra, (ii) armazenar e salvar os espectros adquiridos, (iii) sincronizar a movimentação e a aquisição dos dados de forma automatizada, (iv) permitir a visualização dos dados em tempo real e (v) servir de interface homem-máquina do equipamento.

Realizar testes mecânicos, eletrônicos e do código de programação, de forma a garantir o bom funcionamento do conjunto mecatrônico, o dimensionamento adequado das partes eletrônicas e mecânicas e a sua precisão.

Agregar ao equipamento proposto (i) a capacidade de excitar a amostra por uma luz de amplo espectro ou de banda estreita, como por exemplo, um LED; (ii) deslocar a amostra ao longo da sua geometria espacial em pelo menos dois eixos; (iii) ser dotado de um sistema de captação da luz em uma determinada faixa do espectro do UV-VIS-IR; (iv) realizar o controle e acionamento de forma automática do sistema de deslocamento da amostra; (v) controlar a intensidade da fonte de luz; (vi) armazenar e salvar os espectros de luz em conjunto com a sua posição espacial.

Realizar ensaios capazes de caracterizar uma amostra não homogênea e compilar os dados de forma que seus aspectos espaciais caracterizados pelo protótipo tenham relevância científica (FILARDI et al., 2013b).

1.3 JUSTIFICATIVA

No ano de 2009 o Laboratório de Propriedades Óticas (LaPO) iniciou um projeto de desenvolvimento de um espectrofluorímetro, contando com financiamento do CNPq e tendo como parceiro do setor produtivo a empresa Quimis Aparelhos Científicos Ltda. Desse projeto nasceu o primeiro modelo nacional de um espectrofluorímetro analítico, comercializado hoje sob o nome de FILQUIMIS, modelo Q798FIL.

O desdobramento do referido projeto, durante os dois anos que se seguiram, deu lugar a muitas outras possibilidades de aplicações e aprimoramentos foram imaginados (ABREU et al., 2013; SILVA et al., 2015; FILARDI et al., 2012). Percebeu-se que os espectrofluorímetros comercializados não dispunham da possibilidade de resolver a amostra

de forma espacial, medindo a luz de fluorescência em um único ponto. Isso significa ter que assumir, a priori, que toda amostra estudada é homogênea, a consequência disso, é que, em sua grande maioria, as amostras precisam ser líquidas.

Para caracterizar amostras fluorescentes não homogêneas é indispensável conhecer a distribuição espacial da luminescência gerada nelas. Assim, ficou patente a necessidade de se desenvolver um tipo novo de espectrofluorímetro capaz de analisar amostras homogêneas ou não, líquidas ou sólidas, ou ainda na forma de esfregaço, resolvendo-as de forma espacial.

Como o equipamento proposto tem a capacidade de mapear a emissão de luz na superfície da amostra, este inaugura uma nova classe de equipamentos, com características de espectrofluorímetro e topógrafo de fluorescência UV-VIS. A partir da junção dessas duas funções, foi batizado de Spectratomus-UVIS. O Spectratomus-UVIS busca ampliar e diversificar as análises químicas que fazem uso da fluorescência de amostras.

Por se tratar de um equipamento novo, com o objetivo de verificar a antecedência de autoria da invenção do instrumento proposto neste trabalho, deu-se início a uma pesquisa de busca de patentes com objetivos e aparatos correlatos (PEPE; QUINTELLA, 2012; DOYLE, 1991; WELCH et al., 2000; PEPE et al., 2013), além de métodos que fossem capazes de caracterizar amostras não necessariamente homogêneas (BAH et al., 2013; ALVES; POPPI, 2009; RIBEIRO et al., 2008; NETO et al., 2000; LI; DASGUPTA, 2000; ZHENG; HU, 2009; SONBUL, 2004; JENSEN; CHRISTENSEN; ENGELSEN, 2004; GILBERT et al., 2011; ENGELSEN, 1997). A busca feita resultou na constatação da não existência de aparato similar, o que deu início à elaboração de um documento de pedido de patente em novembro de 2013.

Neste novo método de análise é possível utilizar a fluorescência natural ou por uso de aditivos químicos como marcadores fluorescentes, corantes ou traçadores óticos, permitindo a caracterização de amostras preparadas por diferentes processos químicos, como: secagem, hidrogenação, derivatização etc.; não estando limitado apenas às amostras em solução.

1.3.1 Topografia de superfície

Diferentemente dos espectrofluorímetros convencionais, o conjunto de espectros e dados de posição determinados com o Spectratomus-UVIS permite a geração de uma superfície de fluorescência, em outras palavras, a espectrotopografia de fluorescência. Tanto o equipamento, quanto a informação compendiada por ele são inéditos, com patente requerida BR1020130288519 (FILARDI et al., 2013a).

O protótipo de engenharia do equipamento permite determinar a fluorescência de uma amostra, em coordenada cilíndrica, com deslocamentos no eixo Z e θ , possibilitando a análise de espécies químicas distribuídas em sua geometria, com tamanhos e formas variáveis. O Spectratomus-UVIS conta com um porta-amostra capaz de acomodar uma cubeta padrão de 5 cc, que pode ser usado para a caracterização de amostras líquidas, sólidas, ou lâminas de microscópio, para trabalho com esfregaço. O Spectratomus-UVIS possibilita a varredura da amostra ao longo do eixo Z (0 e $31,713 \pm 0,006$) e ao redor do eixo azimutal θ , entre 0 e $360^\circ \pm 0,9^\circ$. Desta maneira é possível estabelecer a superfície de fluorescência da amostra.

1.4 ORGANIZAÇÃO DA TESE

Após a apresentação do tema neste capítulo, o segundo capítulo desta tese apresenta uma breve contextualização da física do problema, a revisão bibliográfica, bem como um panorama dos dispositivos comerciais existentes.

O terceiro capítulo se refere aos materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do equipamento proposto. Foram abordados: (i) os aspectos diferenciais de algumas partes mecânicas, (ii) o equacionamento, o dimensionamento e a descrição do funcionamento dos circuitos eletrônicos desenvolvidos, (iv) a descrição e funcionamento do programa embarcado na máquina, (v) e a descrição, o funcionamento e a metodologia de aquisição de dados pela IHM.

O quarto capítulo descreve os principais experimentos e os seus respectivos resultados e discussões.

O quinto capítulo apresenta as conclusões finais, bem como, as sugestões de trabalhos futuros baseados nos resultados e desempenho do equipamento desenvolvido.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LUMINESCÊNCIA

A luminescência é a emissão de luz por uma dada substância, quando submetida a algum tipo de estímulo: (i) luz, (ii) reação química, (iii) radiação ionizante. Este fenômeno envolve a absorção de energia e sua posterior re-emissão na forma de radiação visível ou não. A luminescência abrange fenômenos como a fluorescência, a fosforescência e a eletroluminescência. Essa classificação além de depender do mecanismo físico de excitação, também depende da natureza do estado excitado e de seu tempo de vida.

Em sistemas inorgânicos a classificação assumida acima é inadequada, pois a luminescência não resulta da excitação molecular e sim, da presença de impureza no material estudado, do estado de excitação de átomos isolados, da vibração de íons de uma rede cristalina ou de defeitos topológicos da estrutura do cristal. Sendo assim, no estado sólido se utiliza somente o termo luminescência (VIJ, 2012).

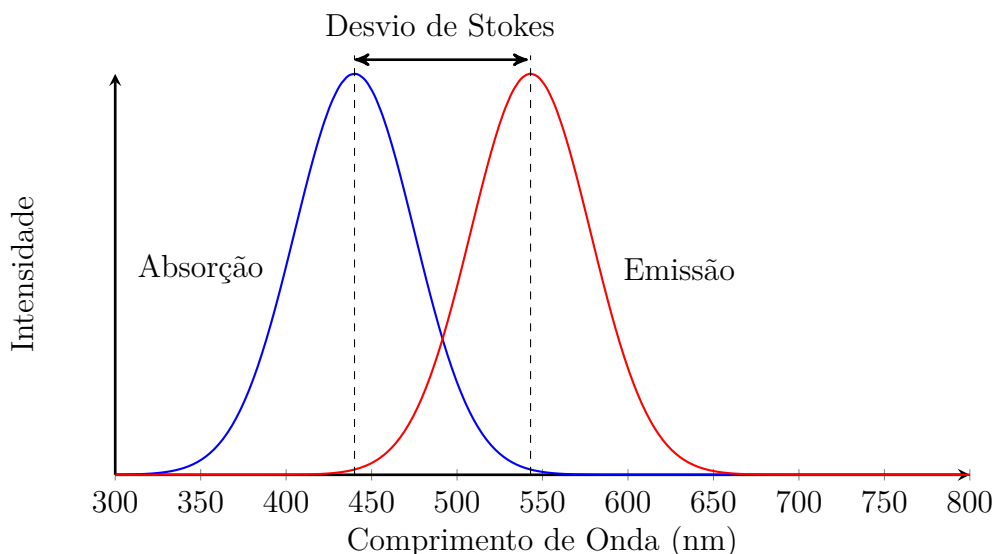
A luminescência de sólidos é de grande interesse tecnológico, sendo a base para a construção de diodos emissores de luz, diodos lasers, entre outras aplicações (GOLDBERG, 1966; DELUCA, 1980).

Em sistemas orgânicos, a luminescência ocorre, geralmente, pela transição dos estados vibracionais das moléculas, sendo que a luz de emissão sofre deslocamento de Stokes (*Stokes Shift*) (GUILBAULT, 1990). Neste fenômeno, a energia de emissão é menor que a energia de excitação da molécula, desta forma é comum que a luz emitida tenha um comprimento de onda maior que o da luz de excitação, conforme ilustrado na Figura 1

O que distingue a fluorescência da fosforescência não são os processos de excitação eletrônica ou de dêx-excitação. Em ambos os fenômenos, o processo fotônico envolve a transição entre os estados eletrônicos e vibracionais das moléculas fluorescentes poliatômicas chamadas fluoróforos. A diferença está no tempo de vida do estado excitado.

De maneira formal assume-se que a taxa de emissão da fluorescência é tipicamente da ordem de $10^8 s^{-1}$, assim, o tempo de vida do estado excitado é próximo a $10 ns$. Muitos fluoróforos, entretanto, apresentam tempos de vida menores que nanosegundos. Em função do curto intervalo de tempo de vida (τ) da fluorescência são necessários aparatos específicos, tanto no que concerne à ótica, quanto no que concerne a eletrônica de detecção. Apesar

Figura 1 – Representação gráfica do Desvio de Stokes, em azul o espectro de absorção centrado em 440 nm e em vermelho o espectro de emissão em 543 nm



dessa complexidade adicional, a técnica de fluorescência resolvida no tempo é amplamente utilizada, sendo capaz de prover informação sobre os mecanismos eletrônicos ligados à fluorescência (LAKOWICZ, 2007).

O diagrama de Jablonski (Figura 2) oferece uma representação gráfica dos estados excitados e suas transições. Os estados eletrônicos são separados por níveis de energia da ordem de 10.000 cm^{-1} . Cada estado eletrônico é dividido em múltiplos subníveis que representam um modo vibracional da molécula. Cada sub-nível de energia vibracional da molécula é da ordem de 100 cm^{-1} .

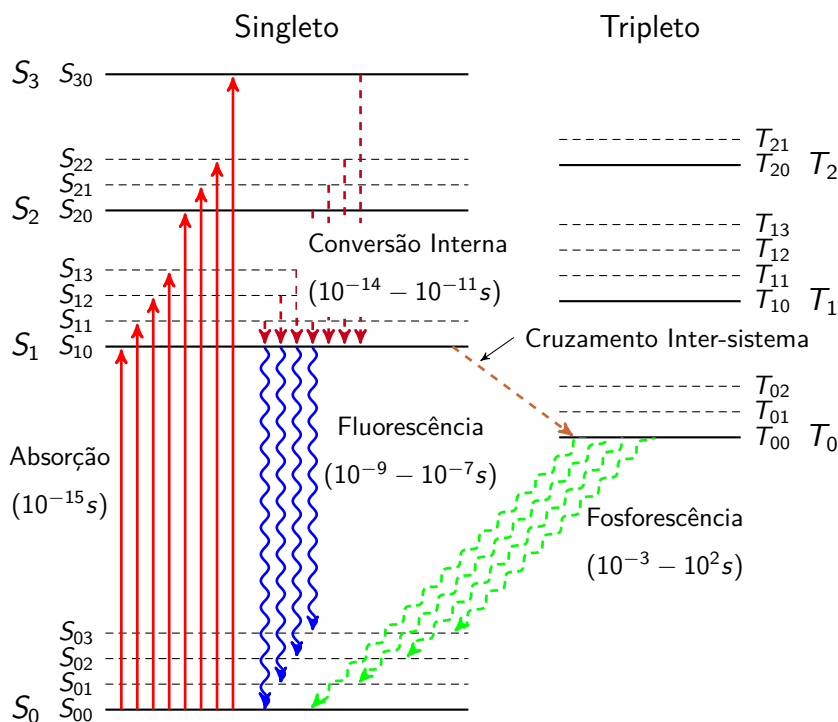
Os estados eletrônicos excitados de uma molécula poliatômica podem ser classificados com base na sua multiplicidade ou degenerescência. Assumindo a indistinguibilidade dos elétrons e aplicando o princípio da exclusão de Pauli, as funções de onda eletrônicas precisam incorporar certo número de estados de *spin* simétricos ou anti-simétricos, para que o sistema eletrônico possa ser representado a partir do modelo de camadas. A função de onda simétrica é chamada de estado tripleto e tem multiplicidade três. A função de onda anti-simétrica é chamada de estado singleto, multiplicidade um (SO; DONG, 2002).

A transição óptica acontece aos pares de mesma multiplicidade, sendo assim, de singleto para singleto e de tripleto para tripleto. A transição eletrônica por absorção de um fóton excita de um nível mais baixo de energia (ex: estado fundamental) para um nível vibracional de maior energia, levando assim a molécula para a um estado vibracional

excitado (CUNDALL; EVANS, 1968).

Na produção de estados excitados pela absorção de energia se obtém um elétron num orbital mais afastado do núcleo, mas com o sentido de seus *spins* preservados. Porém, é necessário que a maioria das moléculas tenha um número par de elétrons que, em geral, já estão dispostos aos pares em direção oposta. A absorção de energia pelo elétron não perturba essa paridade.

Figura 2 – Diagrama de Jablonski de excitação do fluoróforo, decaimento radioativo e decaimento não radioativo. S_n denota a escala de energia, S_{nm} representa os sub-níveis de energia; S_0 é o estado eletrônico singlete fundamental; S_1 e S_2 são sucessivos níveis de energia maiores dos estados excitados do estado singlete eletrônico; T_0 é o estado de menor energia do estado eletrônico tripleto.



Para entender melhor esse processo, será utilizada a Figura 2, assim, quando um elétron no estado **S0** ganha energia suficiente para ir ao estado **S1**, este pode se fixar em qualquer subnível desse novo estado excitado. Se o mesmo perder energia entre os subníveis do mesmo estado excitado, essa perda energética chama-se conversão interna, sem emissão de fótons. Agora, quando o mesmo perde energia suficiente para voltar ao estado fundamental anterior e há emissão de fótons tem-se fluorescência, uma vez que os estados S_n são singletos (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

Porém, quando além da perda de energia, ocorre também uma inversão de *spin*, formando assim um par simétrico, este irá para o estado excitado **T0** de menor energia. Esse processo é chamado de cruzamento intersistema. O cruzamento intersistema ocorre quando no nível de menor vibração do estado singleto, **S1**, tem o mesmo nível de energia que um nível de vibração superior do estado tripleto (WILLIAMS, 2000). Uma vez no estado excitado **T1** se o elétron tornar a sofrer uma inversão de *spin* e emitir fótons, no seu retorno o estado fundamental, ocorrerá então a fosforescência (SO; DONG, 2002).

2.1.1 Fluorescência

Na fluorescência, a radiação emitida cessa, quase que imediatamente, após a extinção da excitação. Em função dessa característica têm-se dois tipos de equipamentos capazes de realizar a medida dessa classe de luminescência: o espectrofluorímetro e espectrofluorímetro resolvido no tempo. De maneira resumida, em um deles, o espectrofluorímetro, a amostra é excitada durante todo o tempo de aquisição enquanto que no espectrofluorímetro resolvido no tempo a luz de excitação é pulsada por modulação, ou mudança de fase.

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência refletem o nível vibracional fundamental e os estados eletrônicos excitados. O princípio de Frank-Condon estabelece que os níveis vibracionais não se alteram durante as transições eletrônicas. As simetrias entre o nível vibracional fundamental e o estado excitado, muitas vezes, resulta em espectros de absorção e emissão simétricos, com aparência de dois picos espelhados (LAKOWICZ, 2007).

O estado eletrônico excitado possui propriedades específicas de polarização. Os fluoróforos são preferencialmente excitados por luz polarizada, alinhada ao longo de um eixo molecular específico, chamado de dipolo de excitação. Além disso, os fótons de fluorescência, emitidos subseqüentemente pela molécula, terão polarização ao longo de outro eixo molecular, dipolo de emissão. Em geral, os dipolos de excitação e emissão não coincidem. Por esse motivo as medidas de fluorescência são feitas à 90 ° em relação à direção da luz de excitação (SO; DONG, 2002).

2.1.2 Fosforescência

Na fosforescência a emissão espontânea persiste durante um tempo longo, entre segundos e horas. Isto sugere que a fluorescência é a conversão direta da radiação absorvida em energia emitida, enquanto a fosforescência envolve o armazenamento de energia e uma relaxação lenta da energia estocada na molécula (ATKINS; PAULA, 2010).

Antigamente a distinção entre os fenômenos de fluorescência e de fosforescência era feita só se observando o tempo de vida médio da emissão, ou melhor, o tempo para que o estado excitado se extinguisse. Para um tempo de vida do estado excitado de até $10 \eta s$, assumia-se fluorescência, para tempos mais longos, o fenômeno considerado era a fosforescência. Atualmente a distinção entre estes fenômenos é feita levando em consideração os estados de *spin* dos níveis envolvidos. Se durante o processo de relaxação não ocorre mudança de multiplicidade do *spin*, a emissão é fluorescente. Se há inversão de *spin* (exemplo: tripleto para singlete) a emissão é fosforescente (LAKOWICZ, 2007).

2.1.3 Tempo de vida de fluorescência e rendimento quântico

O tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico são as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é o número de fótons emitidos, em relação ao número de fótons absorvidos. O tempo de vida, por sua vez, caracteriza o intervalo necessário para a relaxação dos fluoróforos (IRVING; FREISER; WEST, 1987).

Considerando Γ e k_{nr} como sendo as taxas de decaimento radiativo e não-radiativos, respectivamente, e N a fração do fluoróforo no estado excitado. A evolução temporal do estado excitado pode ser descrita por:

$$\frac{dN}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})N \quad (2.1)$$

O tempo de vida de fluorescência (τ) é a média do tempo gasto para que as transições radiativa (Γ) e não radiativa (quando a energia do estado excitado é dissipada sem que haja emissão de um fóton) (k_{nr}) ocorram. Essa média aritmética reflete o fato de que a emissão de fluorescência é um processo aleatório, estocástico, onde os estados excitados relaxam, emitindo ou não fótons, de forma espontânea, onde cada evento é independente do outro. A expressão matemática para este processo é dado por:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (2.2)$$

Na ausência de processos de supressão não radiativos (*quenching*), é possível definir o tempo de vida intrínseco do fluoróforo da seguinte forma:

$$\tau_0 = \frac{1}{\Gamma} \quad (2.3)$$

A eficiência do fluoróforo pode ser quantificada pelo rendimento quântico de fluorescência, Q :

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (2.4)$$

Outra forma de calcular o tempo de vida intrínseco é a partir dos espectros de absorção, do coeficiente de extinção e do espectro de emissão do fluoróforo. A taxa do decaimento radiativo Γ pode ser calculada utilizando a seguinte equação, (LAKOWICZ, 2007):

$$\begin{aligned} \Gamma &\simeq 2,88 \times 10^9 n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu}^3} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} \\ &= 2,88 \times 10^9 n^2 \langle \bar{\nu}^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} \end{aligned} \quad (2.5)$$

Onde $F(\bar{\nu})$ representa o espectro de emissão em unidades de número de ondas (cm^{-1}), $\varepsilon(\bar{\nu})$ representa o espectro de absorção e n é o índice de refração do meio. As integrais são calculadas sobre a interação de $S_0 \leftrightarrow S_1$ no espaço dos comprimentos de onda de absorção e emissão.

Em geral essa formulação funciona bastante bem, particularmente para soluções de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares. No entanto, existem inúmeras razões pelas quais a Equação 2.5 pode ser imprecisa. Nesta equação não são assumidas a interação analito-solvente, nem consideradas as alterações no índice de refração (n), que interfere nos comprimentos de onda de absorção e emissão, além de assumir que não há mudança na geometria do estado excitado (LAKOWICZ, 2007). É evidente que existem modelos mais elaborados onde tais considerações são levadas em conta, porém fogem ao objeto desse trabalho.

2.1.4 Eletroluminescência

A eletroluminescência é um fenômeno ótico e elétrico que ocorre quando um material emite luz em resposta à passagem de corrente elétrica ou é quando submetido a um forte campo elétrico. Um exemplo de eletroluminescência acontece nos diodos emissores de luz, também conhecidos como LED. Um diodo é constituído de material semicondutor dopado, formando uma junção $p - n$. Isso significa dizer, que um lado do dispositivo é dopado por uma impureza aceitadora de elétrons (lacunas ou falta de elétrons) e outro lado por uma impureza doadora de cargas negativas (excesso de elétrons) (REZENDE, 2004).

Na região da junção forma-se a zona de depleção, isso graças à recombinação entre os elétrons e as lacunas fornecidos pelos dopantes. Na Figura 3 está representado um diodo de junção polarizado diretamente. Para que ocorra a passagem de corrente é necessário que seja aplicada uma tensão superior à tensão de barreira, característica da junção.

A polarização direta fará 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. Quando um elétron, do mínimo da banda de condução, se recombina com um buraco, do topo da valência, a diferença entre estes dois níveis precisa ser liberada. Isso pode acontecer de três maneiras: (i) o excesso de energia pode ser repassado para outro elétron livre (transição, emissão eletrônica), (ii) a energia excedente pode ser repassada à rede na forma de vibração (fônon, calor), ou ainda, (iii) pode ser emitida na forma de radiação (fóton, luz).

Figura 3 – Representação gráfica de um diodo e junção $p-n$.

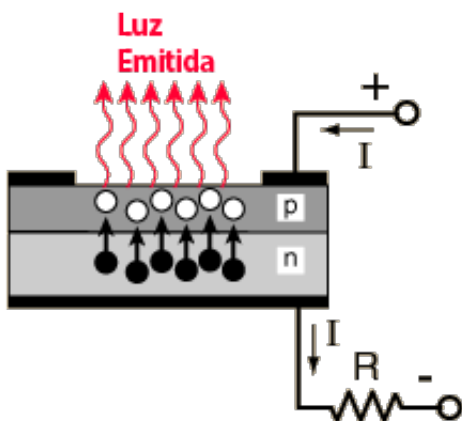
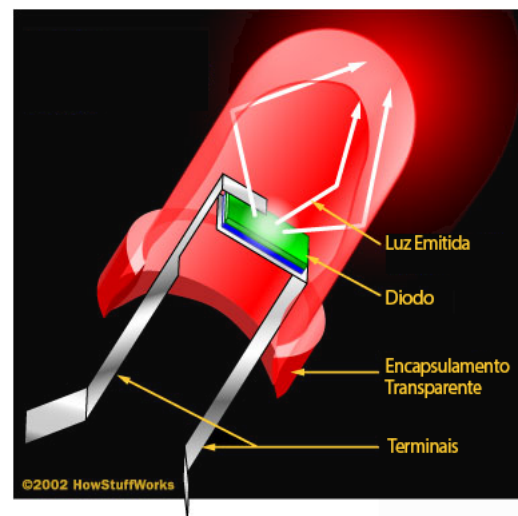


Figura 4 – Representação de um led internamente. Versão Traduzida Fonte: HowStuffWorks



Arranjos construtivos na posição da pastilha e no encapsulamento do diodo possibilitam a extração da radiação de eletroluminescência criando uma fonte de luz de alta eficiência, Figura 4.

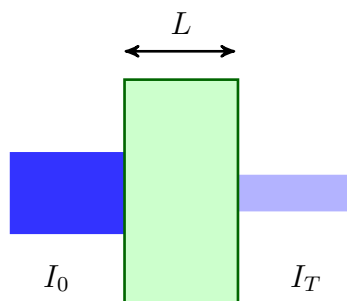
2.2 MEDIDAS DE LUZ

As cores exibidas pelos objetos dependem da não absorção de certos componentes do espectro eletromagnético pelas moléculas que os compõem. Sendo assim, um material que absorve a cor verde irá refletir as demais cores que não foram absorvidas. Uma solução que seja capaz de absorver todo o comprimento de onda visível será de cor preta. Eventu-

almente, uma solução de coloração branca pode não absorver a maior parte do espectro visível (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012), porém, ser branco não quer dizer que não absorve luz. Ultravioleta (UV) e infravermelho (IR) podem estar sendo absorvidas pelo objeto sem que o olho humano se dê conta. Para solucionar esta limitação humana uma série de instrumentos precisaram ser desenvolvidos, cobrindo diferentes faixas do espectro de luz. Em termos físicos ou químicos não há distinção entre a luz visível, ultravioleta e infravermelha, a não ser suas energias características e os efeitos causados nas diferentes substâncias.

Um aspecto fundamental para a espectroscopia de fluorescência é o espectro de absorção da substância de interesse, ou seja, a absorbância em função do comprimento de onda da luz excitação. A lei de Beer-Lambert caracteriza o modo como que a luz é absorvida por moléculas. Geralmente dissolve-se o analito num solvente que seja transparente, água, por exemplo, ou etanol, para que em seguida seja medido o quanto de luz é capaz de atravessar a amostra (PINA; BERNARDO; GARCIA-ESPANA, 2000).

Figura 5 – Representação da Lei de Beer-Lambert, onde uma quantidade de luz I_0 chega a amostra, I_T a luz que consegue atravessar o comprimento L da amostra.



A lei de Beer-Lambert, Equação 2.6, é uma relação empírica que relaciona a absorção de luz, absorbância (\mathbf{A}), com as propriedades de opacidade do material que ela atravessa. Assim, a luz incidente (\mathbf{I}_0) chega a amostra e somente uma parcela \mathbf{I}_T não é absorvida ao atravessar um comprimento \mathbf{L} dessa amostra, além disso α representa o coeficiente molar de absorbância e \mathbf{c} a concentração do analito na solução (LAKOWICZ, 2007).

$$A = \alpha \cdot L \cdot c = \log_{10} \frac{I_0}{I_T} \quad (2.6)$$

A transmitância (\mathbf{T}), por sua vez, representa a fração da energia luminosa que consegue atravessar uma determinada espessura do material, sem ser absorvida (MARTINHO,

1994).

$$T = \frac{I_T}{I_0} = \%T = 100T \quad (2.7)$$

Substituindo a Equação 2.7 na Equação 2.6, tem-se uma relação entre absorvância e transmitância dada pela Equação 2.8. Assim, quando a absorvância do analito é igual a 1, significa dizer que solução absorveu 90% da luz. Para um valor igual a 2, esse percentual será igual a 99%, de acordo com a expressão:

$$A = -\log_{10} T = 2 - \log_{10} \%T \quad (2.8)$$

Desta maneira a intensidade da luz absorvida (\mathbf{I}_A) é a diferença entre a luz incidente e a luz emergente, expressa na Equação 2.9, considerando que não houve reflexão, nem mesmo fluorescência na amostra (PINA, 1994).

$$I_A = I_0 - I_T = I_0 - I_0 \cdot T = I_0 \cdot (1 - 10^{-A}) \quad (2.9)$$

A refletância (\mathbf{R}) é a razão entre o fluxo luminoso incidente numa superfície e o fluxo refletido. Normalmente a refletância é representada na forma percentual, sendo expressa pela Equação 2.10.

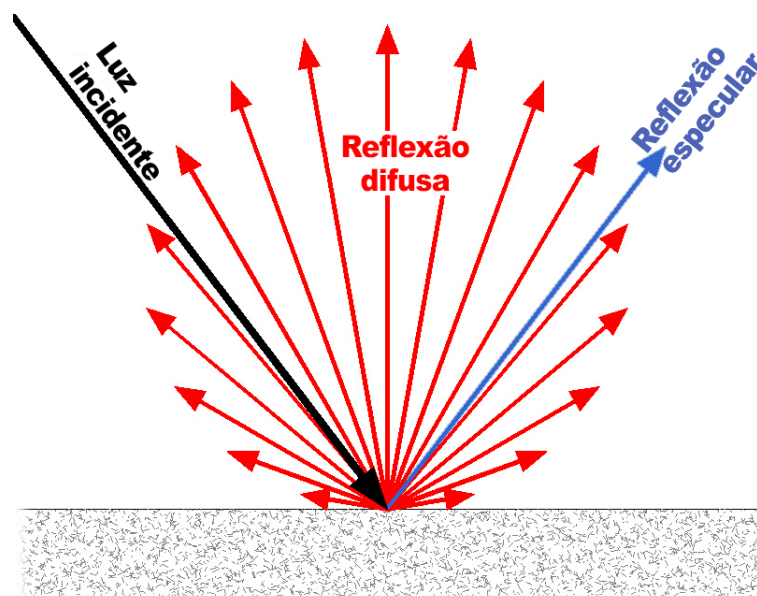
$$R = \frac{F_R}{F_I} \cdot 100\% \quad (2.10)$$

A reflexão pode ocorrer de duas formas: (i) especular ou (ii) difusa, ver Figura 6. Pela lei da reflexão, a direção da luz incidente e a direção da luz refletida fazem o mesmo ângulo em relação à superfície normal, onde o feixe incide. Esta definição, quando atendida pela totalidade dos raios incidentes, coincide com a definição de refletância especular, como acontece em superfícies polidas ou lisas.

Refletância difusa é a reflexão da luz por uma superfície rugosa, de modo que o feixe incidente é refletido em diferentes ângulos, em lugar de ser refletido em apenas uma direção. Uma superfície refletora difusa ideal, quando iluminada, terá igual luminância em todas as direções (SOUZA et al., 2011).

A luz espalhada (\mathbf{I}_{SCAT}) é um processo rápido onde a luz é absorvida pela partícula e é então, rapidamente emitida em outra direção. As partículas de espalhamento podem ser moléculas do próprio meio, do ar, poeira, gotículas de água ou poluentes, que espalham a luz em todas as direções. O espalhamento pode também ser visto como um “tipo de refração” (BOHREN; HUFFMAN, 1988).

Figura 6 – Representação gráfica dos tipos de reflexão: reflexão especular e reflexão difusa. Versão traduzida. Fonte:(GIANNIG46, 2010)

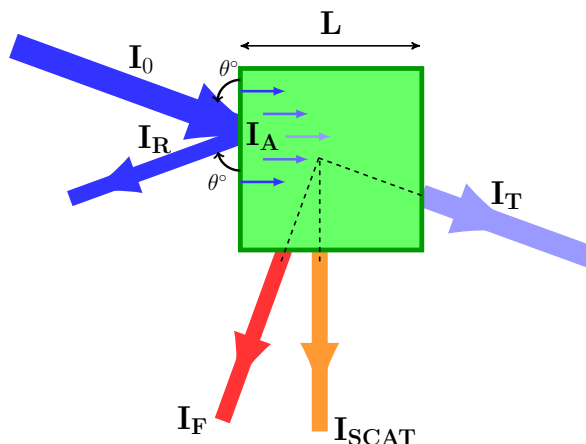


A luz de fluorescência (\mathbf{F}) é emitida em todas as direções, sem que haja uma direção preferencial, isso ocorre por ser uma reemissão de luz, a partir das transições eletrônicas das moléculas que foram excitadas pela da luz incidente (I_0). Vale ressaltar que essa reemissão de luz não necessariamente é no visível (EISINGER; FLORES, 1979). Em função desta particularidade, a medida da intensidade da luz de fluorescência (I_F) deve ser coletada a 90° em relação ao feixe de excitação (I_0). Se faz desta forma com o objetivo de que sejam coletados apenas os fótons da componente I_F , isolando-os das demais componentes, conforme formulado na Equação 2.11. Além disso, a observação de (I_F) nessa geometria melhora a relação sinal-ruído, diminuindo o limite de detecção em aproximadamente 1 parte em 10000, quando comparado à captação a 180° . A fluorescência também pode ser medida pela frente da amostra, procedimento adotado para caracterizar amostras turvas ou opacas (RENDELL; MOWTHORPE, 1987).

$$I_0 = I_A + I_T + I_R + I_F + I_{SCAT} \quad (2.11)$$

A Figura 7 ilustra as intensidades de luz envolvidas em diversos processos de interesse para a caracterização óptica de substâncias: I_0 representa a energia que será fornecida à amostra, I_A representa a absorção de energia gradativa na amostra, uma vez que a absorção tem relação direta com o caminho óptico (L), I_T é a porção da luz que emerge da amostra, I_R é a porção da luz que foi refletida e I_F a luz de fluorescência, reemitida pela amostra.

Figura 7 – Representação gráfica das intensidades de luz envolvidas em diversos processos de interesse para a caracterização ótica de substâncias



2.3 CARACTERIZAÇÃO ÓTICA DE SUBSTÂNCIAS

Os métodos espectroscópicos de análise têm por base a medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou espécies atômicas em função do comprimento de onda (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007). Assim, as duas técnicas de análise que têm relação direta com o trabalho de investigação reportado nesta tese são a espectrofotometria e, mais especificamente, a espectrofluorimetria.

O termo espectrômetro é aplicado a todos os instrumentos que operam sobre uma ampla faixa de comprimentos de onda, medindo de forma quase continua a cada Δ nanômetros. Quando esses equipamentos fazem apenas as medidas de absorbância, transmitância, ou ambos, recebem o nome de espectrofotômetro ou simplesmente fotômetro, não necessariamente dispondo da capacidade de fazer a varredura de uma faixa larga de comprimentos de onda (MARTINHO, 1994).

Os espectrofotômetros são equipamentos que, em geral, possuem uma ou mais redes de difração, com o objetivo de selecionar, tanto a luz de excitação I_0 , quanto de analisar I_A , I_T , I_R ou I_{SCAT} , que são os feixes de luz que emergem da amostra.

Para a caracterização ótica de substâncias por meio da medida de fluorescência I_F , tem-se de maneira geral, dois tipos de equipamentos: o filtro fluorímetro, que utiliza filtros óticos para isolar a luz incidente da luz de fluorescência e os espectrofluorímetros que utilizam um monocromador dotado de uma ou mais redes de difração para análise da luz observada.

Em geral, esses equipamentos possuem pelo menos 4 elementos básicos: (i) uma fonte de excitação de amplo espectro, forçada a passar por um filtro, ou monocromador, ou, uma fonte de luz de banda estreita, como um LED ou um laser, (ii) um porta amostra, (iii) um sistema de coleta da luz de interesse, dotado de um ou mais sensores e, finalmente, (iv) um instrumento de medição e visualização da medida.

2.3.1 Espectrofotômetro

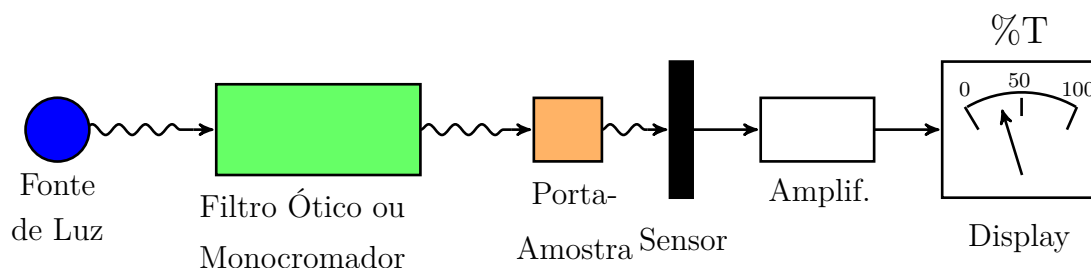
Os espectrofotômetros são instrumentos capazes de medir I_A , I_T e I_R , em uma determinada solução, quando exposta ao feixe de luz de excitação I_0 . Utilizando um espectrofotômetro, a concentração de uma determinada substância química, em solução, pode ser determinada pela medida de I_A . Os espectrofotômetros podem ser de três tipos: (i) feixe simples, (ii) duplo feixe e (iii) multicanal.

2.3.1.1 Espectrofotômetro de feixe simples

Esses instrumentos de feixe único variam muito em complexidade e em desempenho. O mais simples e menos dispendioso é composto por baterias que acionam uma lâmpada de tungstênio (fonte de luz de excitação), um conjunto de filtros óticos, ou um monocromador manual, seleciona os fótons de excitação, segue um porta-amostra, um detector, além de um sistema de condicionamento de sinal* e um dispositivo de medição. A Figura 8 ilustra este equipamento.

Normalmente, os equipamentos de espectrometria requerem uma fonte de tensão estabilizada e assim evitar erros de medição. A variação da tensão de alimentação resulta na alteração da intensidade do feixe durante a análise e caracterização do analito em questão.

Figura 8 – Representação de um espectrofotômetro de feixe simples de baixa complexidade onde a informação é mostrada diretamente em um display.



No extremo oposto estão os fotômetros mais sofisticados, que utilizam microcontroladores para o controle e o acionamento automático. Operam em uma ampla faixa do

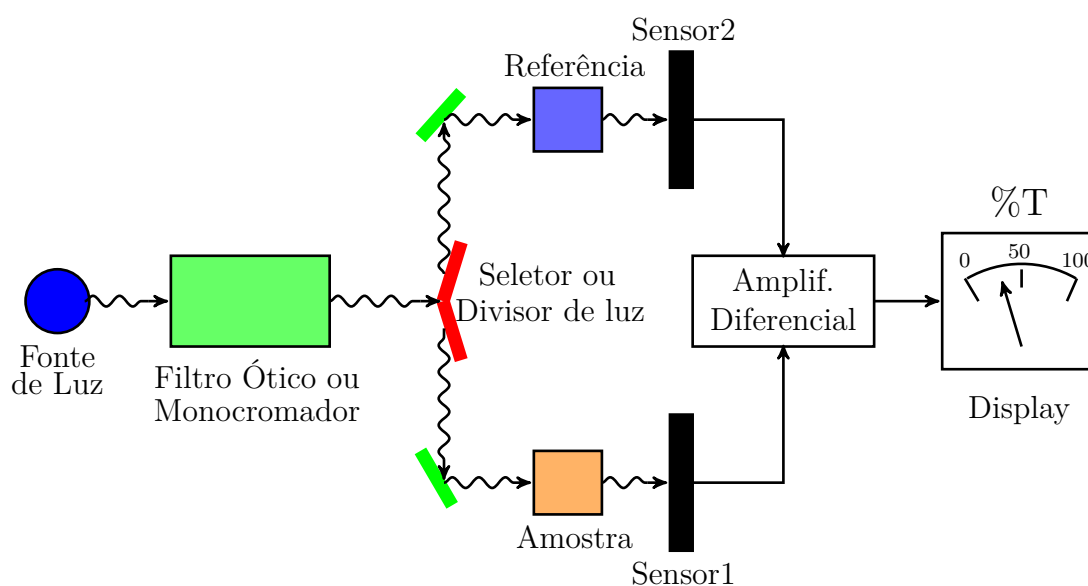
* Amplif. - Amplificador

espectro, variando entre 200 a 1000 nm e além, normalmente contam com uma interface de comunicação com computadores. Estes espectrofotômetros possuem duas fontes de luz de excitação, uma de tungstênio e outra de deutério, por exemplo, que são intercambiáveis. Uma rede de difração de alta resolução faz a seleção e a análise da luz investigada. Fendas variáveis possibilitam ajustar a *acceptância** em função do tipo de medida e tipo de amostra, além de servir para evitar a saturação em luz dos sensores. Seu elemento sensor pode ser uma fotomultiplicadora ou fotodiodo de avalanche, que possuem muita alta sensibilidade e resposta rápida. O sinal elétrico deste sensor, depois de condicionado, é aplicado à entrada de um conversor analógico para digital (ADC), sendo processado e armazenado num computador, para posterior análise (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

2.3.1.2 Espectrofotômetro de duplo feixe

O espectrofotômetro de duplo feixe tem como principal característica o uso de um divisor do feixe de luz de excitação, em vermelho na Figura 9. Este divisor é responsável pelo fracionamento da luz de excitação, dirigida tanto para a amostra, quanto para uma referência, que pode ser uma amostra padrão, ou, em geral, um sensor de referência, de forma a monitorar e compensar eventuais flutuações da fonte de luz de excitação. Assim, o equipamento é capaz de realizar a medida da transmitância em função dos diferentes valores de referências e ainda ter uma fonte de luz única.

Figura 9 – Diagrama típico de um espectrofotômetro de duplo feixe, onde informação adquirida é a diferença entre a amostra e a referência que normalmente é a própria luz.



Existe no mercado uma grande variedade de desses equipamentos. Tipicamente, nos

* *acceptância* é a abertura numérica (AN) de um sistema óptico, dada por um número adimensional, que caracteriza o intervalo de ângulos sobre os quais o sistema pode receber ou emitir luz

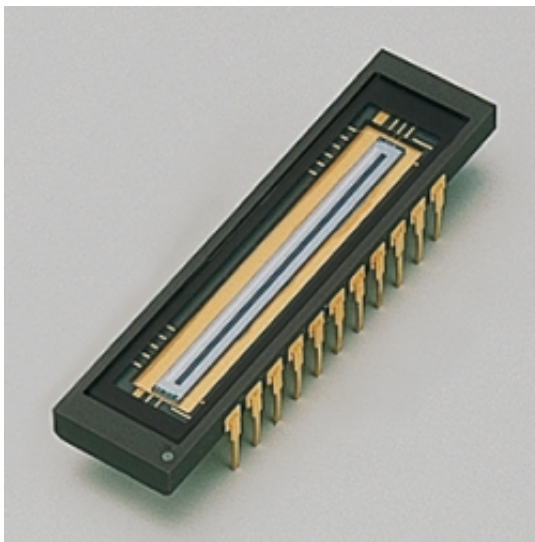
modelos de duplo feixe, podem ser encontrados modelos com: duas fontes de luz, sistema computadorizado para aquisição dos dados e seleção do comprimento de onda, podendo ser dotados de um ou dois elementos fotos-sensíveis. Um sistema de luz pulsada permite diminuir a interferência da luz externa, possibilitando a detecção síncrona dos sinais dos detectores.

2.3.1.3 Espectrofotômetro multicanal

Os espectrofotômetros de multicanal, ou dispersivos, só apareceram no mercado em meados dos anos 80, eles se utilizam de sistema de detecção fotos-sensível em linha, ou na forma de uma matriz de pontos; um conjunto de diodos fotossensíveis ou um CCD, ver Figura 10 (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

A principal característica desse tipo de sensor é a captação simultânea da luz, já resolvida por uma rede de difração, em todo o intervalo de comprimentos de ondas. Assim, a resposta ao estímulo luminoso I_0 , que emana da amostra, é uma curva de múltiplos pontos, ou espectro, e não mais apenas um valor único mostrado num display.

Figura 10 – Foto de uma matriz em linha de fotodiodos, fabricante:HAMAMATSU, modelo S3903-1024Q (HAMAMATSU, 2016).



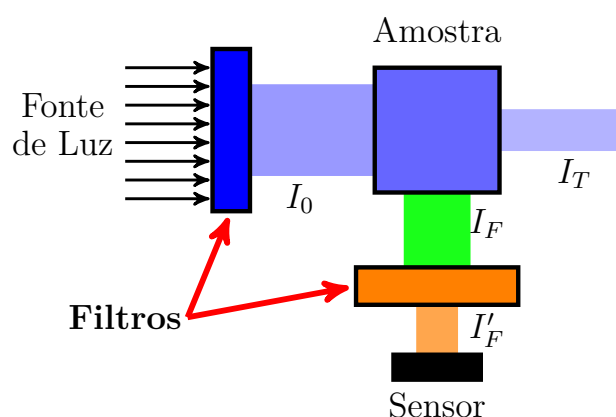
2.3.2 Filtro Fluorímetros ou Fluorímetros

A principal característica de um filtro fluorímetro é o uso de filtros óticos, tanto para selecionar a luz excitação, quanto para a análise da luz de fluorescência, ilustrado na Figura 11. O filtro ótico tem a capacidade de bloquear ou impedir a passagem de certo intervalo de comprimentos de onda e permitir a passagem de outros intervalos de interesse. Desta maneira, um filtro fluorímetro excita em um pequeno comprimento de onda e mede a

fluorescência em um comprimento de onda maior, isto em função do deslocamento de Stokes.

A relativa facilidade de manuseio dos filtros fluorímetros e o relativo baixo custo dos filtros óticos de banda, tornam esses dispositivos ideais para medições dedicadas e rotineiras. Além disso, podem ser calibrados por um padrão de concentração conhecida ou caracterizável por outros métodos laboratoriais convencionais, permitindo medições precisas (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2007).

Figura 11 – Diagrama do filtro fluorímetro, em destaque temos o filtro de seleção do comprimento luz I_0 e o filtro da fluorescência de interesse I'_F .



Os fotômetros de filtro são, em geral, equipamentos baratos e compactos quando comparados aos outros equipamentos de espectroscopia. Como desvantagem, esses equipamentos não fornecem o espectro da amostra, restringindo-se apenas a uma apresentação quantitativa do valor de absorbância e/ou transmitância.

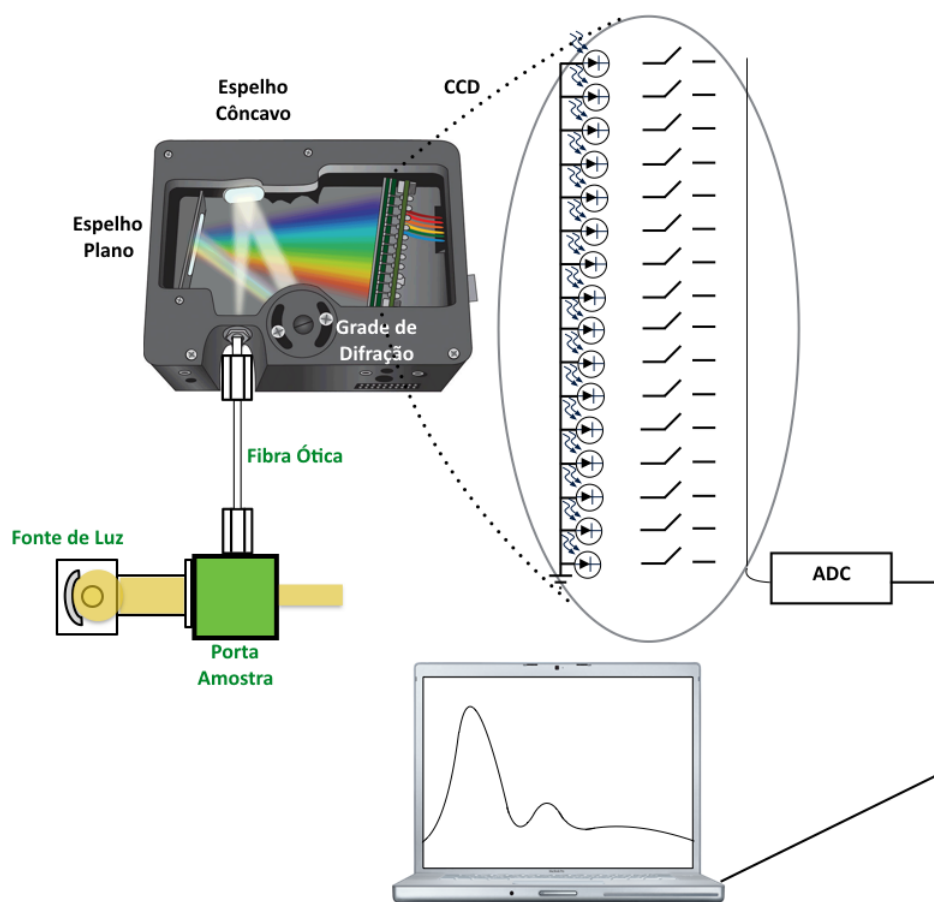
2.3.3 Espectrofluorímetros

Os espectrofluorímetros em geral medem a fluorescência (I_F), podendo também realizar as outras medidas (I_A , I_R , I_T) fazendo uso das técnicas já discutidas de caracterização de amostra. Assim, são encontrados no mercado equipamentos de feixe simples, duplo feixe e multicanal, com uma ou mais fontes de luz, sistema computadorizado de aquisição de dados etc.

Na Figura 12 tem-se a representação de um espectrofluorímetro dispersivo, com uma fonte de luz, um porta amostra, um sistema de condicionamento de luz, um módulo CCD e a saída de dados em formato digital. Assim a amostra é iluminada pela fonte luz de excitação, sendo a luz de fluorescência coletada à 90° por uma fibra ótica. A fibra conduz a luz até um espelho côncavo, este por sua vez reflete a luz coletada sobre uma rede de

difração, com a finalidade de decompor a luz em seus diferentes comprimentos de onda. A luz decomposta chega a um espelho plano que a reflete sobre o CCD, este dispositivo converte o estímulo luminoso em um valor de tensão, proporcional ao número de fótons de cada energia. Um parâmetro importante deste tipo de sensor é o tempo de integração, que determina a duração do período de coleção de fótons por cada elemento sensor da matriz.

Figura 12 – Representação de um espectrofluorímetro equipado com um CCD. Em detalhe, a visão interna do CCD com a luz decomposta em cada fotosensor.



3 MATERIAIS E MÉTODOS EM MECATRÔNICA

O termo mecatrônica é utilizado para indicar um campo multidisciplinar das engenharias sendo uma combinação de engenharia mecânica, elétrica, eletrônica, telecomunicação, computação e controle & automação (ALCIATORE; HISTAND, 2014) e (ADAMSSON, 2005).

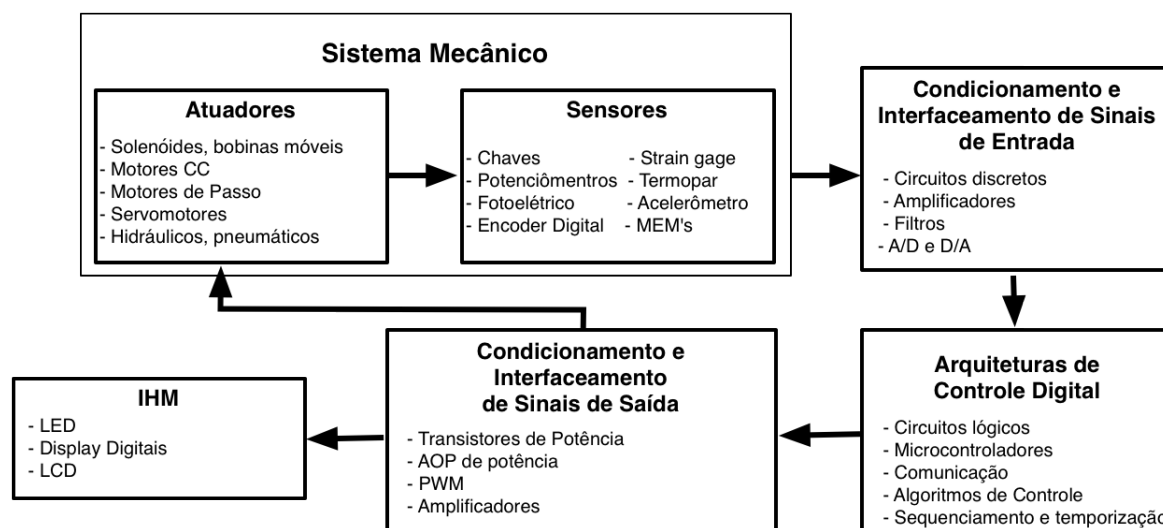
A engenharia mecatrônica é um campo em franco desenvolvimento que trata do desenvolvimento de produtos, e cuja função depende da interação dos componentes eletrônicos e mecânicos, sendo estes gerenciados por uma arquitetura de controle embarcada ou não. Um sistema mecatrônico é complexo, por assim dizer, são sistemas inteligentes. Embora a definição do termo “inteligente” seja um tanto vaga, nos domínios da engenharia, o seu significado está atrelado ao desenvolvimento de elementos complexos regidos por uma lógica, que lança mão da retroalimentação e da computação, tentando de certa forma simular a maneira como os seres humanos pensam e agem (KARNOPP; MARGOLIS; ROSENBERG, 2000) e (BARBALHO, 2006).

3.1 SISTEMAS MECATRÔNICOS COMPLEXOS

Cada vez mais são incorporados componentes eletrônicos aos dispositivos mecânicos ao qual desempenham algum tipo de monitoramento ou controle computacional do desempenho e da atitude destes componentes. Em geral, esses dispositivos são dotados de microcontroladores embarcados que permitem um melhor desempenho, além de maior flexibilidade e adaptabilidade às diferentes aplicações. São exemplos, os módulos de *airbag*, os sistemas de freios, sistemas de controle de vôo e navegação de aeronaves, os equipamentos automatizados, as máquinas CNC (controle numérico computadorizado), as máquinas de prototipagem rápida de placas de circuito impresso, máquina de corte a laser, máquinas de lavar roupas de alto desempenho etc. (BRADLEY, 1993).

A Figura 13 ilustra os principais componentes de um sistema mecatrônico complexo típico. Os atuadores produzem movimento ou ação do sistema, atendendo aos comandos enviados, por um computador, ao sistema de interfaceamento de potência. Os sensores captam ou detectam o estado das variáveis do sistema, gerando um sinal elétrico adequado a cada estímulo sofrido (ALCIATORE; HISTAND, 2014).

Figura 13 – Componentes de um sistema mecatrônico complexo



O condicionamento e as interfaces de sinais fornecem as conexões entre os estímulos elétricos de entrada e a arquitetura de controle digital, adequando estes sinais elétricos primários aos níveis requeridos pelos estágios subsequentes.

A arquitetura de controle pode ser considerada como a etapa “inteligente” do sistema, neste estágio um algoritmo de controle é aplicado de forma a garantir o funcionamento preciso e estável do sistema, recebendo da etapa anterior os sinais de entrada e gerando como saída os comandos para a etapa de condicionamento e interfaceamento dos sinais de saída. Além das saídas de comando, esta etapa é capaz de trocar dados de comunicação com outros dispositivos ou com a interface homem-máquina (IHM).

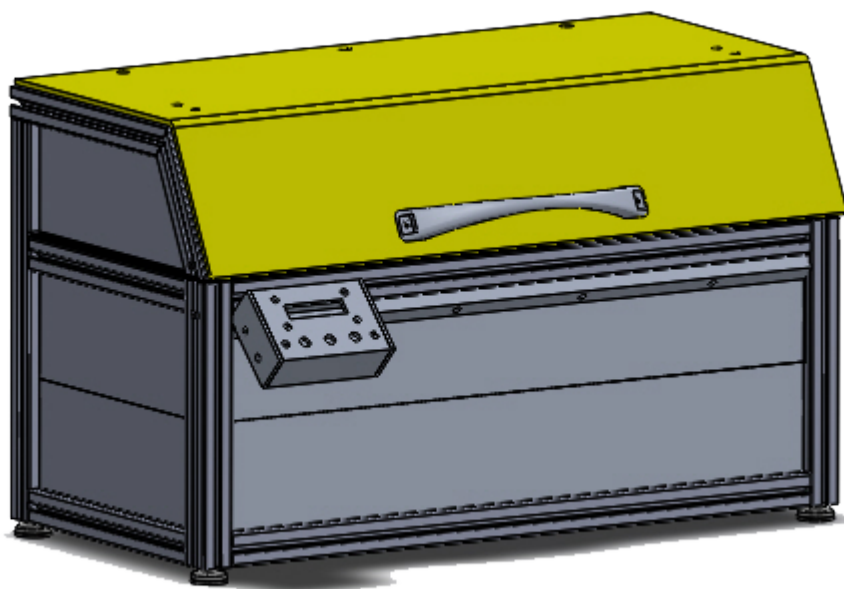
O condicionamento e interfaceamento de sinais de saída produzem a ação de controle sob os atuadores, fornecendo os sinais elétricos necessários para que os mesmos possam desempenhar suas funções. A IHM serve para facilitar a visualização, servindo também para eventual alteração das variáveis de processo, ou parâmetros de entrada e saída do sistema de controle, mas não permite alterar a programação do sistema.

3.2 O ESPECTROTOPÓGRAFO DESENVOLVIDO

O equipamento desenvolvido, o espectrotópografo de fluorescência (Spectratomus-UVIS), pode ser definido como um sistema mecatrônico complexo, sendo composto por diferentes módulos, como mencionado anteriormente. A saber, atuadores (2 motores de passo, 1 LED ou 1 micro-lâmpada de halogênio), sensores (1 matriz CCD ou fotodiodo, 3 sensores de fim de curso), interface de entrada e saída de dados, módulo de controle & acionamento, IHM e painel de comando (3 *push-buttons* e 1 *display* LCD). O projeto do

equipamento foi realizado utilizando ferramentas de CAD, como o SolidWorks versão 2013, para as peças mecânicas, como ilustra a Figura 14, e o Eagle Cadsoft versão 7.3, para os circuitos eletrônicos e circuitos impressos.

Figura 14 – Modelo 3D do equipamento espectrotopógrafo desenvolvido.

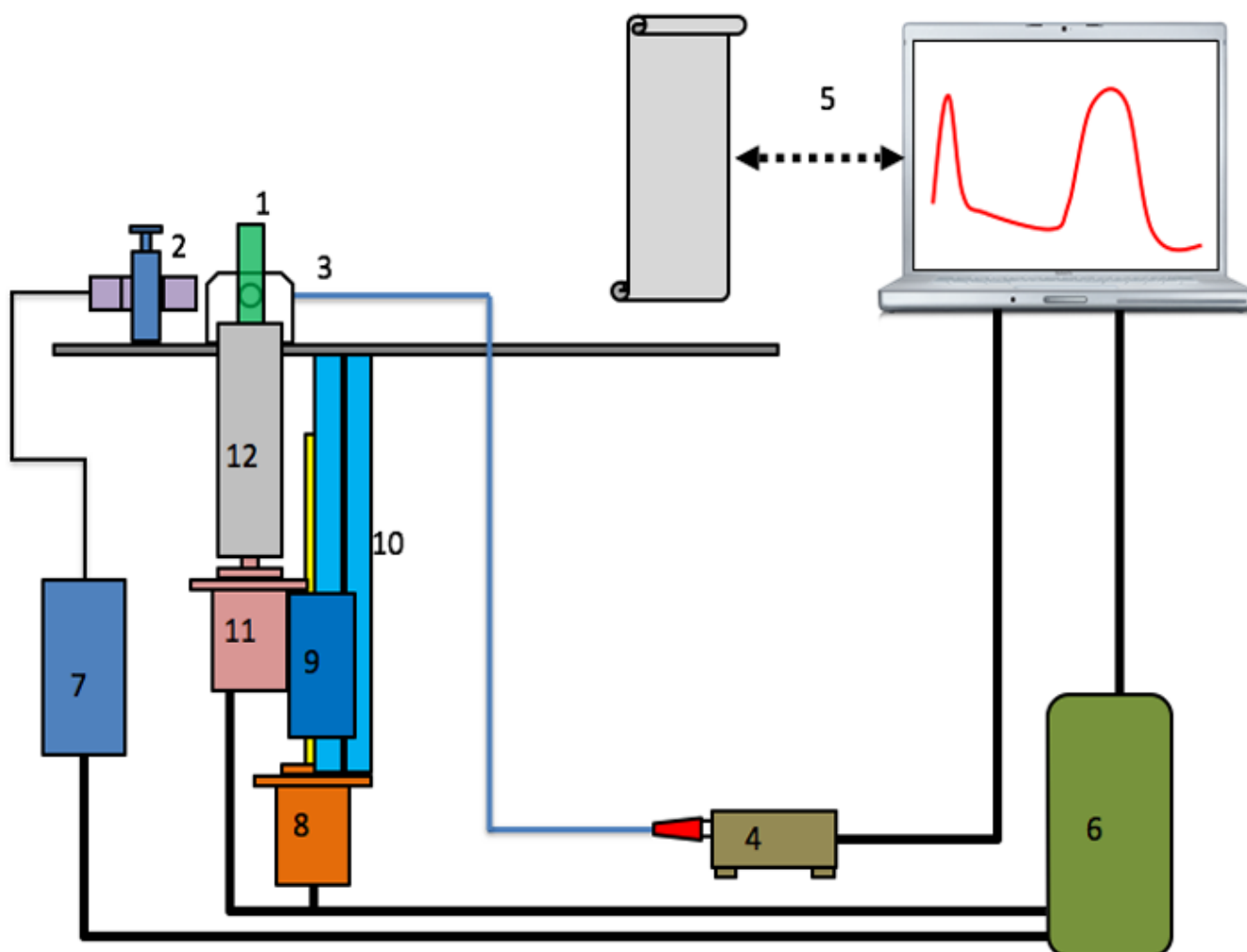


O Spectratomus-UVIS é um equipamento compacto, que usa a tecnologia LED-CCD para excitar compostos e detectar a luz de fluorescência que emana deles. Este instrumento de análise tem a capacidade de detectar, analisar e adquirir espectros de fluorescência ao longo de uma amostra com até $31,713 \pm 0,006$ mm de comprimento, na direção do eixo Z e $360^\circ \pm 0,9^\circ$ em torno do seu eixo azimutal. Com esse equipamento é possível criar uma superfície de fluorescência 3D ou uma espectrotopografia de fluorescência da amostra. A partir do pós-tratamento do conjunto de dados adquiridos muitas outras possibilidades de análise podem ser exploradas. Na Figura 19 tem-se um diagrama da disposição de seus componentes:

1. Porta-amostra; capaz de receber cubetas de 4,5mL e lâminas de vidro.
2. Suporte da fonte de luz de excitação; capaz de fixar o porta-LED ou uma micro lâmpada montada em uma lanterna da marca Maglite.
3. Sistema de fixação e fibra ótica; responsável por manter a fibra fixa e posicionada, para que seja feita uma coleção otimizada da luz de fluorescência.
4. Espectrômetro dispersivo assistido por uma matriz CCD; responsável por converter os estímulos óticos em níveis de tensão e posteriormente em palavra digital, que são enviados em formato de dados numérico de fluorescência para a IHM.
5. IHM; com a função de coordenar a aquisição dos dados de fluorescência e o deslocamento do sistema de posicionamento da amostra, selecionar a intensidade de corrente do LED, ou o acionamento da lâmpada de halogênio, gerar gráficos, armazenar e salvar o conjunto dos dados adquiridos.

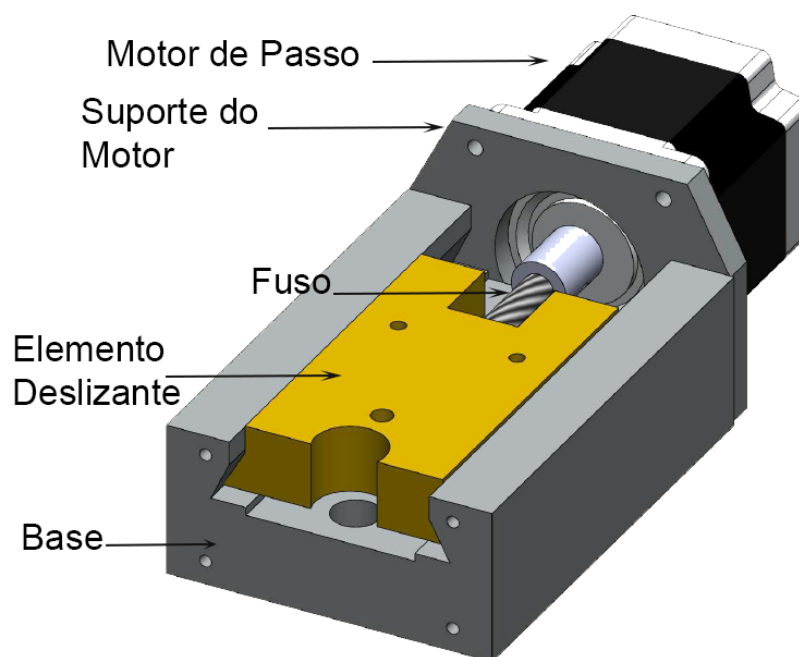
6. Módulo de controle & acionamento; responsável pelo envio do sinal de controle da corrente de polarização da fonte de luz de excitação, leitura dos sensores de fim de curso do sistema de posicionamento da amostra, controle e lógica do acionamento dos motores de passo, leitura dos botões de controle e escrita no *display*.
7. Fonte de corrente; responsável pelo controle da intensidade de corrente que passa no LED.
8. Motor de passo do eixo Z; responsável pelo deslocamento do conjunto cilindro de suporte e porta-amostra, base e motor do eixo azimutal.
9. Guia de escorregamento em rabo de andorinha.
10. Base do guia; situada na base e no topo deste elemento estão instaladas as chaves óticas de fim de curso do eixo Z.
11. Motor de passo do eixo azimutal θ ; onde também está instalada a chave ótica de fim de curso da rotação.
12. Cilindro de giro do suporte do porta-amostra.

Figura 15 – Diagrama do funcionamento mecânico e disposição dos módulos e das interfaces do espectrotótopógrafo de fluorescência UV-VIS - Spectratomus-UVIS



No projeto do Spectratomus-UVIS assumiu-se a racional de que este equipamento deveria ser um sistema ótico de precisão, para tanto o sistema de posicionamento da amostra foi concebido a partir de um guia de escorregamento em rabo de andorinha, Figura 16. Tal formato minimiza a folga entre as partes móveis e permite que o deslocamento ocorra sem balanço ou vibração.

Figura 16 – Guia de escorregamento em rabo de andorinha e motor de passo



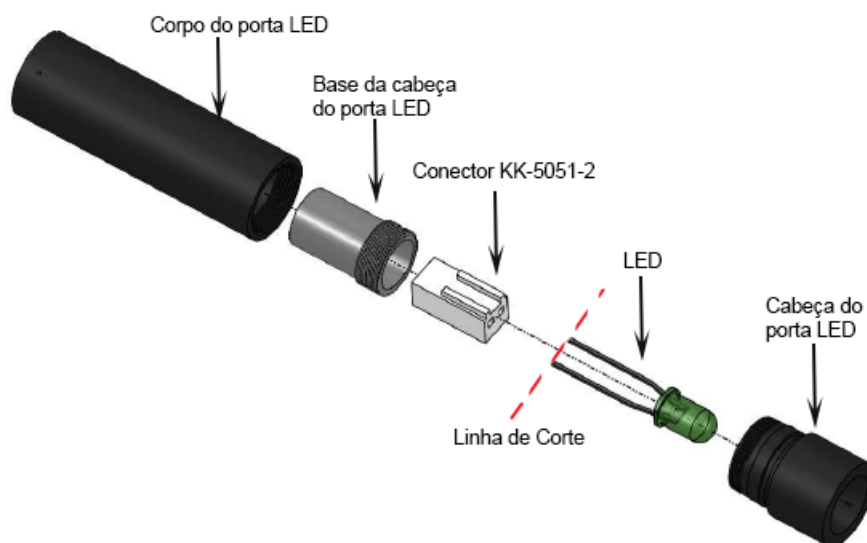
O guia de escorregamento é composto por dois blocos: conjunto base e suporte do motor. O conjunto base pode ser dividido em duas partes, a base em aço inox e o elemento deslizante feito em latão. O elemento deslizante dispõe de uma rosca interna de fuso, com diâmetro M8, sendo capaz de realizar um avanço de 1,25 mm por volta, conforme a norma técnica ISO 261 *Standard thread*. O suporte do motor foi projetado para receber um motor de passo padrão NEMA 23, foi escolhido o modelo 23KM-C051-07V. As características desse motor são: (a) torque alto de 7,4 kg/cm, (b) ângulo por passo de 1,80°; com precisão de ± 0,5 %, (c) ser um motor híbrido; para operação tipo bobina bipolar e acionamento por micro-passo (Minebea Group, 2012). Com base nessas características pode-se calcular a precisão do posicionamento do conjunto guia de escorregamento e motor pela Equação 3.1, o resultado é um deslocamento de 0,00625 mm/ passo.

$$\text{Deslocamento em } Z = \frac{1,25}{200} = 0,00625 \text{ mm/ passo.} \quad (3.1)$$

Outro ponto importante do Spectratomus-UVIS é o seu sistema de troca da fonte de luz de excitação, o porta-LED ilustrado na Figura 17. Desenvolvido para o espectrofluorímetro Q798FIL, este dispositivo é prático, flexível e robusto, permitindo a troca do LED, sem que haja necessidade de soldá-lo. O ato de soldar um LED em uma placa de circuito impresso, ou até mesmo diretamente às extremidades de um par de fios,

pode causar mudanças na luz emitida por este dispositivo, causado pelo super aquecimento dos seus eletrodos e, subsequentemente, da pastilha. Para alguns LEDs ultravioleta a ação de soldagem deve ser evitada, sob pena de causar dano irreversível ao dispositivo. É importante lembrar que a especificação da temperatura de soldagem muda de acordo com o comprimento de onda emitido pelo LED. LEDs violeta e ultravioleta de alto brilho requerem cuidados especiais, em função das especificidades e fragilidade de suas pastilhas (KINGBRIGHT, 2016).

Figura 17 – Diagrama interno do porta-LED, em detalhe a posição de corte dos terminais do LED.

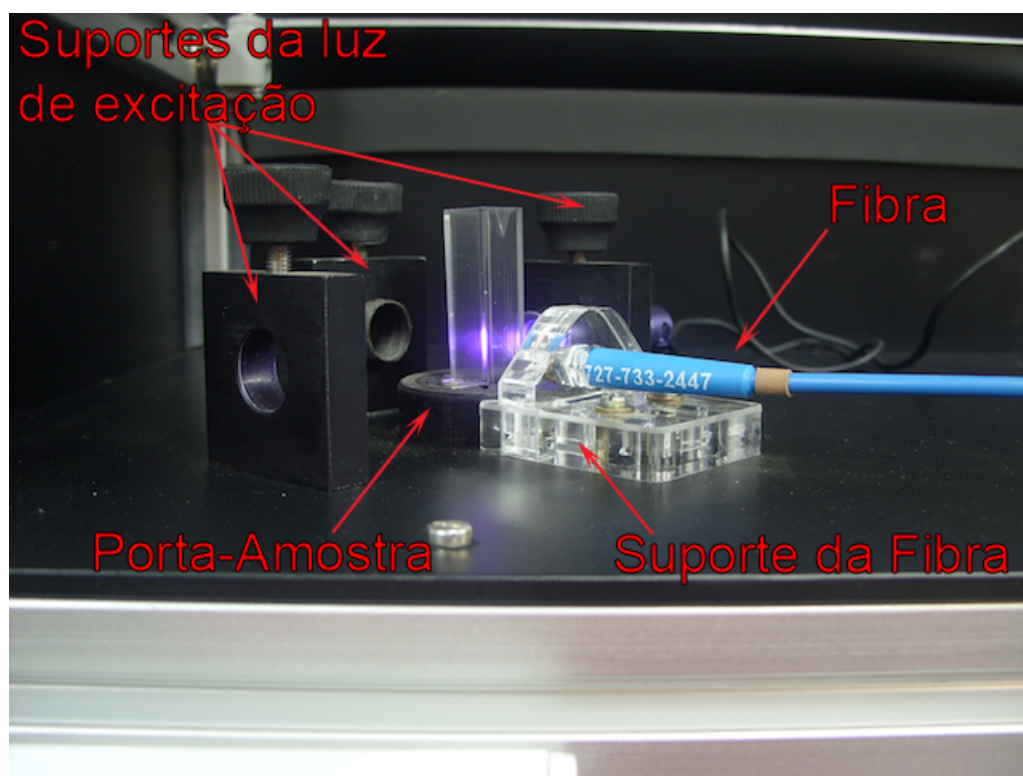


A solução encontrada para a troca dos LEDs da fonte de luz foi utilizar o conector do tipo KK-5051 de duas vias, onde a conexão nos terminais do LED não é mais feita por soldagem, mas sim por um contato de pressão. Quando for necessária a troca do LED, basta realizar a abertura do porta-LED, soltar o embase da cabeça que comporta a janela de saída de luz e acessar o conector KK-5051-2. Antes da troca, usando um alicate de corte lateral, os terminais do LED precisam ser diminuídos antes de inserido no conector, em seguida o LED deve ser re-instalado e o porta LED remontado.

Na Figura 18 é mostrado o conjunto formado pelo suporte da luz de excitação, pelo porta-amostra, pelo suporte da fibra ótica e a fibra ótica. A fibra ótica não deve sofrer *stress* mecânico, seja ele por pressão, flexão ou encurvamento, inferior ao seu raio de curvatura nominal. Na primeira montagem se utilizou uma porca oca, com 1/4 de polegada de diâmetro externo, fixada em um L de alumínio, que funcionava como suporte, onde um conector do tipo SMA era fixado. Essa solução foi posteriormente descartada, pois a distância entre a amostra e a ponta da fibra dificultava certas medidas de fluorescência. Uma segunda montagem foi realizada usando um perfil de alumínio em U, fixado ao L já usado, funcionando como prolongador, permitindo aproximar mais a ponta da fibra da superfície da amostra. Essa solução foi interessante até certo ponto, quando ficou

clara a necessidade de deixar mais livre e fino o ajuste dessa distância. Uma terceira montagem foi projetada, substituindo a anterior por um suporte em acrílico. Esse novo suporte foi projetado de forma a receber a fibra, sem a necessidade da rosca oca, ou qualquer tipo de fixação forçada. Usando uma geometria sextavada compatível com a parte externa do conector SMA da fibra, ajuste suficiente para mantê-la na posição desejada, sem causar nenhum dano à mesma. Esta é a versão final de fixação da fibra hoje usada no Spectratomus-UVIS.

Figura 18 – Foto do conjunto suporte da luz de fixação, fixador da fibra, porta-amostra e fibra de captação

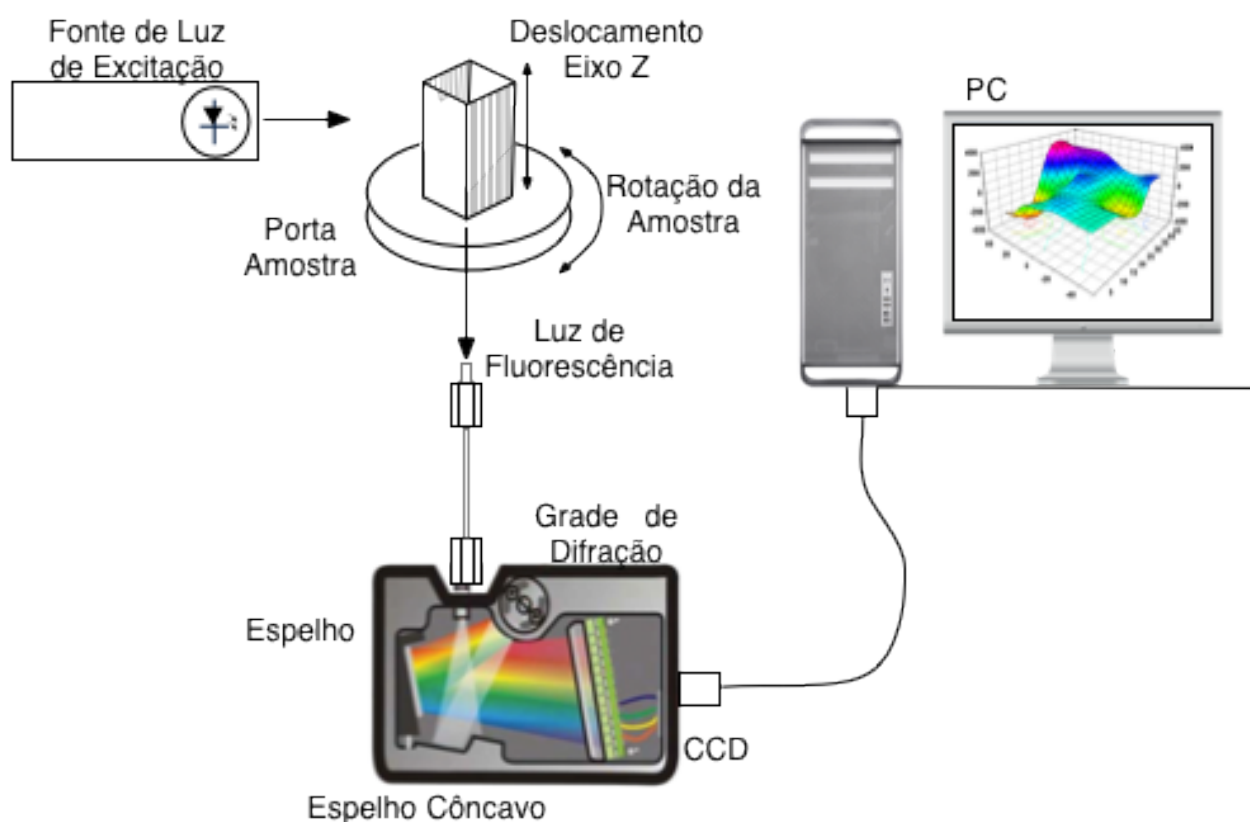


Na Figura 19 está representado um diagrama de blocos do princípio de funcionamento do Spectratomus-UVIS. A coleção da luz de fluorescência é feita pela fibra ótica, montada em ângulo reto em relação ao eixo ótico da fonte de luz de excitação, a distância fibra-amostra permanece fixa durante as medições, mas pode ser pré-ajustada conforme a necessidade. Normalmente o LED empregado, emite uma pequena faixa do espectro luminoso ($\lambda_{LED} \pm 10$ nm), e pode ser escolhido em função da amostra que está sendo investigada, detalhes mecânicos pode ser visualizado no Apêndice C. Nos dias de hoje é possível excitar amostras com diodos emissores de luz no intervalo entre 250 e 2500 nm, sem ter que fazer uso de lâmpadas volumosas e dispendiosas, filtros ou redes de difração (KINGBRIGHT, 2016).

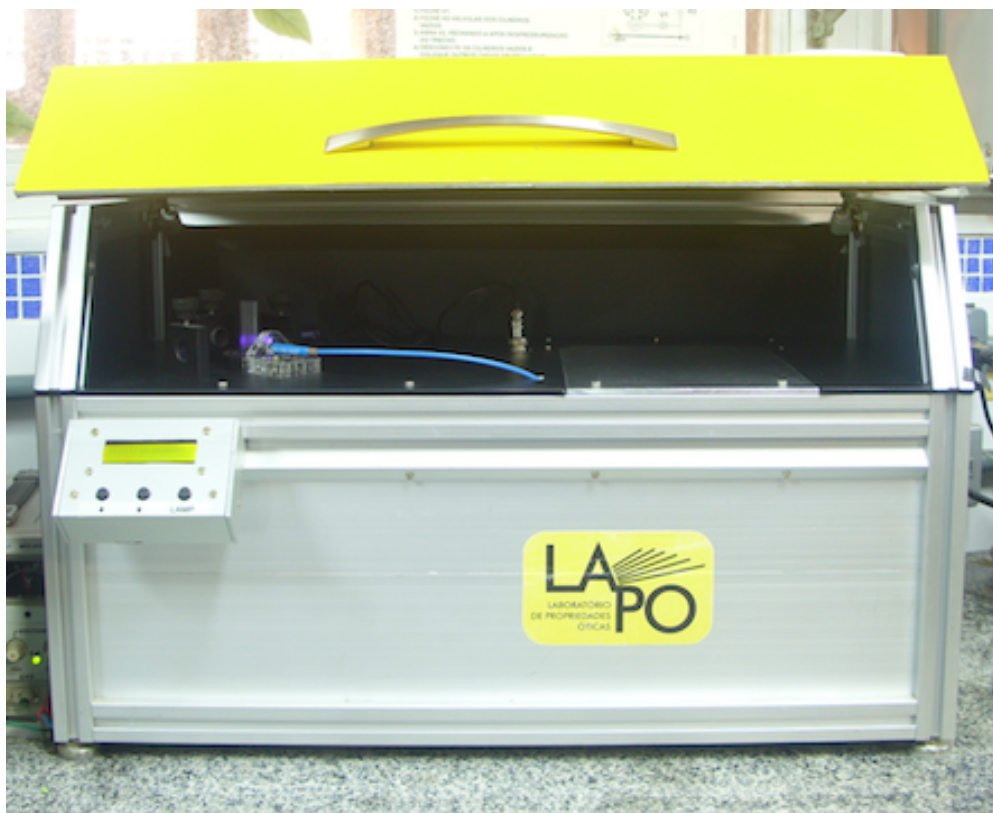
No Spectratomus-UVIS a perda da intensidade de luz na unidade ótica é consideravelmente menor que nos espectrofluorímetros clássicos. O CCD usado tem resolução

de 0,3 nm e o sistema de decomposição da luz ocupa uma área menor que 400 mm². O conjunto ótica-detector pode ser energizado por uma porta USB (Universal Serial Bus) conectada a um computador pessoal (PC), a mesma por onde é feita a transferência dos dados e comandos. Um software de comunicação e de interface homem-máquina (IHM) torna possível a aquisição, em tempo real, dos espectros de fluorescência em cada ponto da amostra. A justaposição e um pós-tratamento numérico desses espectros criam a superfície espectral de fluorescência da amostra em função da posição do eixo Z e do ângulo θ .

Figura 19 – Diagrama do sistema de aquisição de dados de fluorescência, em detalhe para a disposição da luz de excitação e da captação da fluorescência do espectrotópografo de fluorescência UV-VIS - Spectratomus-UVIS



Uma fotografia do Spectratomus-UVIS pode ser vista na Figura 20. O detalhamento de cada módulo que o constituem, além dos softwares embarcados e a IHM e a metodologia de aquisição de dados serão detalhados nas seções seguintes.

Figura 20 – Foto do Spectratomus-UVIS finalizado

3.3 HARDWARE ELETRÔNICO DESENVOLVIDO

O *hardware* eletrônico desenvolvido pode ser dividido em dois módulos, um módulo de controle & acionamento e outro módulo de aquisição de dados de fluorescência. Cada módulo funciona de maneira independente e sua comunicação com o sistema de IHM, rodando no computador, permite a sincronização do sistema de controle.

3.3.1 Módulo de controle & acionamento

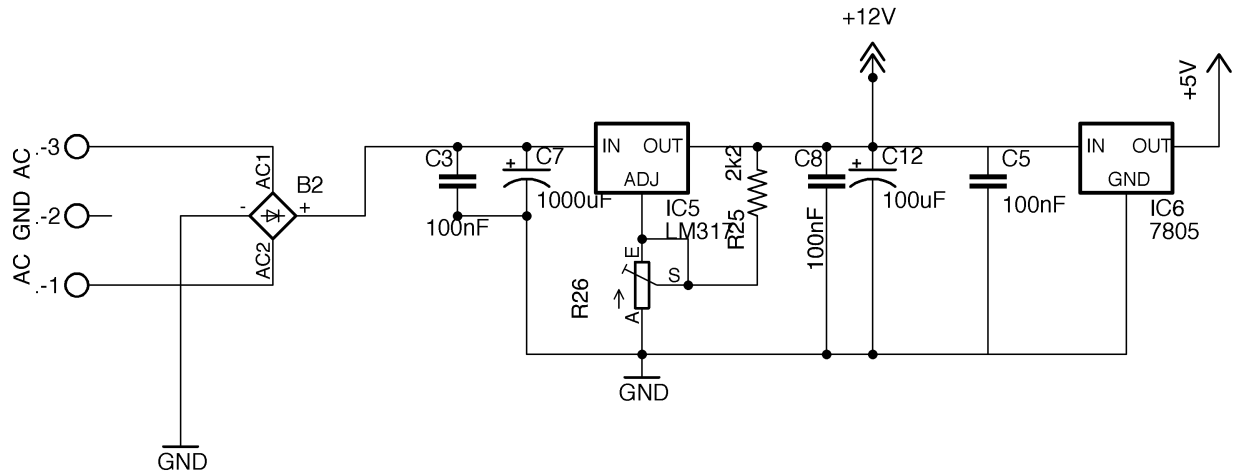
O módulo de controle & acionamento é responsável por controlar e acionar os motores de passo, pela variação da intensidade da fonte de corrente do LED, pelo controle do *display* LCD, pela interpretação dos sinais dos botões de ajustes da fonte de corrente, do botão do temporizador de comando da lâmpada e da fonte de tensão regulada da lâmpada de halogênio ou *xenon* modelo LM2A001.

3.3.1.1 Fonte de alimentação

A fonte de alimentação, Figura 21, é formada por um circuito retificador de onda completa (B2), um filtro capacitivo (C3 e C7), um regulador de tensão ajustável (LM317), que fornece 12 V, mais um filtro capacitivo (C8 e C12) e por fim, um regulador fixo LM7805, fornecendo 5 V (INSTRUMENTS, 2013). Reguladores de tensão foram fixados

em dissipadores de calor individuais, montados na horizontal, fixados na própria placa.

Figura 21 – Diagrama técnico da fonte de alimentação do módulo de controle & acionamento



O resistor R26 foi calculado utilizando a Equação 3.2, fornecida pelo fabricante (SEMICONDUCTOR, 2016). Levando esses valores $R_1 = R_{25} = 2k\Omega$, $V_{out} = 12\text{ V}$ e $I_{adj} = 100\ \mu\text{A}$ na Equação 3.2, tem-se:

$$V_{out} = 1,25 \cdot \left(1 + \frac{R_2}{R_1}\right) + I_{adj} \cdot R_2 \rightarrow 12 = 1,25 \cdot \left(1 + \frac{R_2}{2200}\right) + 100 \cdot 10^{-6} \cdot R_2 \quad (3.2)$$

$$12 - 1,25 = 568,18 \cdot 10^{-6} \cdot R_2 + 100 \cdot 10^{-6} \cdot R_2$$

$$R_2 = \frac{10,75}{668,18 \cdot 10^{-6}} = 16.088\Omega \therefore R_{26} \cong 20k\Omega$$

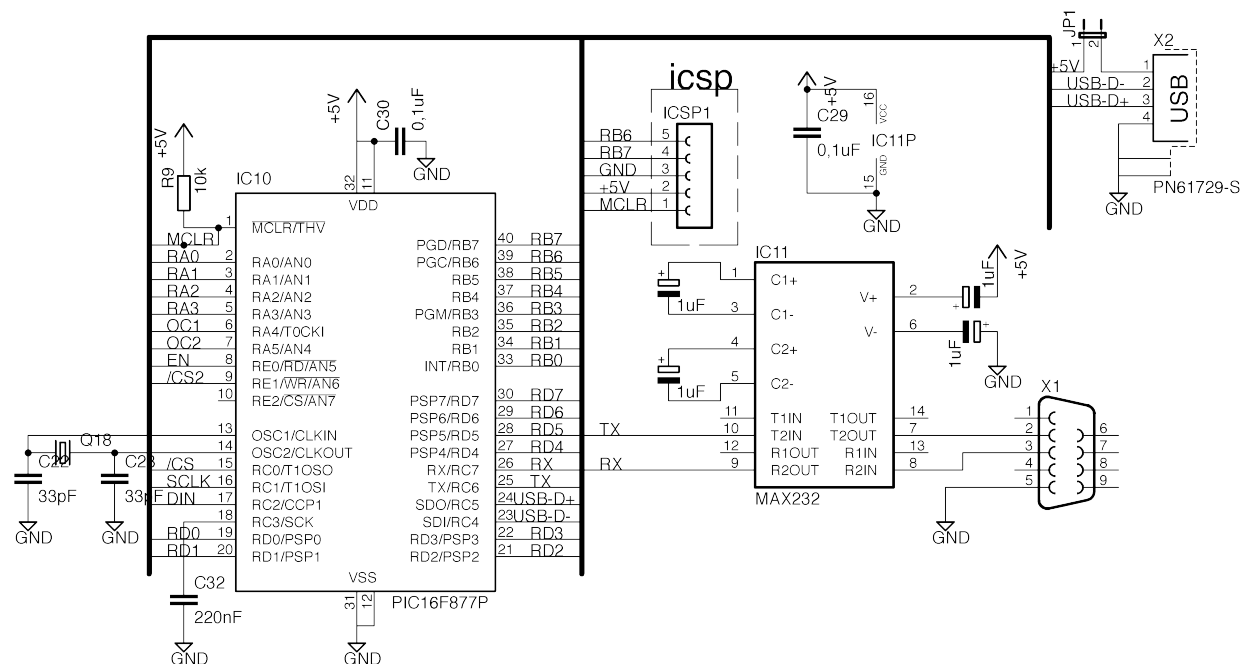
3.3.1.2 Microcontrolador

Com o objetivo de utilizar os componentes mais usuais do mercado e assegurar uma possível atualização do hardware do equipamento no futuro, foi escolhido os microcontroladores PIC16F877A e o PIC18F4550, ambos da família PIC do fabricante MICROCHIP. Além disso, buscou-se fazer com que o equipamento desenvolvido possa, a qualquer momento, utilizar uma porta padrão RS-232. O driver de adaptadores USB/Serial RS-232 quando utilizando o sistema operacional Windows, em qualquer versão, pode apresentar falha de desligamento automático da porta USB, causando eventual instabilidade no funcionamento do Spectratomus-UVIS, quando utilizado ininterruptamente por várias horas. Tendo em vista essa especificidade, o módulo de controle & acionamento possui as duas possibilidades de porta de comunicações (USB/RS-232) disponíveis para o usuário.

A versão PIC16F877A é um dos microcontroladores mais antigos da MICROCHIP de uso geral, com excelente documentação e interface de programação ICSP, permitindo a atualização do firmware sem que seja necessário retirar o *chip* da placa. Este controlador

não possui interface de comunicação USB, sendo assim optou-se pelo PIC18F4550, que tem uma porta USB incorporada. Além disso, estes microcontroladores possuem o mesmo número de pinos, o mesmo encapsulamento, sendo compatíveis pino a pino. Isso permite que o módulo desenvolvido possa utilizar qualquer um desses microcontroladores.

Figura 22 – Diagrama técnico da unidade de processamento embarcado e da interface de comunicação serial e USB



Na Figura 22, pode ser visualizado o microcontrolador PIC16F877P, próximo ao conector de comunicação USB (X2), existe um *jumper* (JP1), quando curto-circuitado, este permite que o módulo seja alimentado pela porta USB do computador. Este *jumper* deve permanecer aberto quando em modo normal de operação. O *jumper* JP1 só deve ser fechado quando o módulo estiver fora do Spectratomus-UVIS para testes ou manutenção em bancada. O capacitor C32 faz parte do circuito de comunicação USB do PIC18F4550. Sendo assim, a porta RC3, ligada ao C32, quando usado o PIC16F877A, deve ser desativada no *firmware*. Ainda nesta parte do circuito, pode ser visto o conector para gravação por ICSP, este serve para ambos os microcontroladores. O circuito integrado MAX232 faz a conversão do sinal da comunicação serial, ainda em níveis TTL (lado μC^*), para níveis compatíveis com RS-232 (conexão com o computador). Os demais componentes do diagrama fazem parte dos circuitos básicos para o funcionamento adequado do μC , são eles (i) o circuito oscilador a cristal (Q18), no valor de 20 MHz; responsável pela velocidade de processamento e (ii) o circuito POR (*power-on reset*) (R9); que garante que o μC inicialize de maneira adequada.

* μC - microcontrolador

3.3.1.3 Circuito de acionamento dos motores

No circuito de comutação dos motores de passo foi empregado um transistor do tipo Darlington, TIP122, operando em corte e saturação, o ponto de operação da saturação do transistor é determinado pelo resistor de base (SEMICONDUCTOR, 2014) e (BOYLESTAD; NASHELSKY, 2004).

Figura 23 – Diagrama do circuito de comutação da bobina do motor de passo.

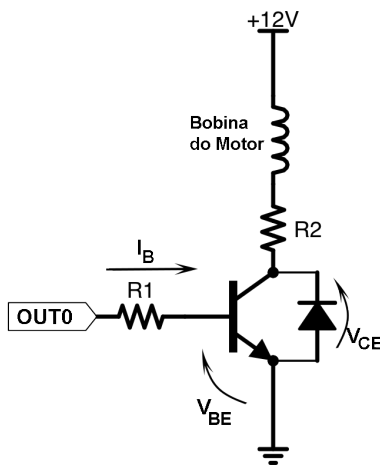
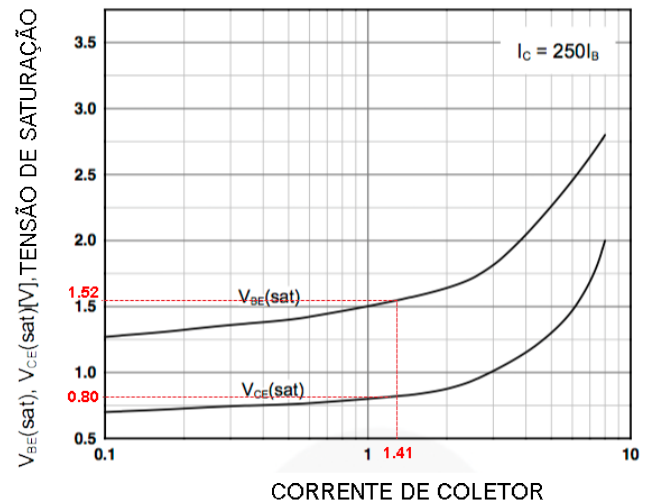


Figura 24 – Curva de corrente e tensão de saturação do TIP122, em destaque os valores utilizados para os cálculos. Eixos traduzidos da folha de dados



A malha analisada para o cálculo da corrente de base (I_B) do transistor está representada na Figura 23. Esta etapa do circuito pode ser descrita pela Equação 3.3, sendo que a tensão de 5 V corresponde ao nível lógico 1, para uma carga TTL.

$$5V = R_1 \cdot I_B + V_{BE} \quad (3.3)$$

Na malha de saída, a bobina do motor tem resistência de $2,4 \Omega$, uma resistência de potência de $R_2 = 5,6 \Omega$ limita a corrente total do circuito próximo a $1,5A$, estes termos junto com a tensão coletor-emissor V_{CE} compõem a Equação 3.4.

$$12V = 2,4 \cdot I_C + 5,6 \cdot I_C + V_{CE} \quad (3.4)$$

A relação entre $I_C = 250 \cdot I_B$ para a saturação do TIP122 é especificada na folha de dados. Como o diodo externo ao TIP122 faz com que a tensão V_{CE} seja igual $0,7V$, o valor da corrente I_C é dada pela Equação 3.5:

$$12 - 0,7 = (2,4 + 5,6) \cdot I_C \rightarrow I_C \approx 1,41 A \quad (3.5)$$

Com base nesse valor ($I_C = 1,41\text{ A}$) determina o valor de I_B (5,65 mA), dados obtidos pela curva de saturação do transistor, Figura 24, encontrando valor V_{BE} (1,52 V) e o valor de R_1 será 615,93 Ω , pela Equação 3.3. Dessa maneira tem-se dois valores comerciais possíveis 560 Ω e 680 Ω , optou-se pelo valor de $R_1 = 560\ \Omega$.

Figura 25 – Diagrama interno do CI 74AC574

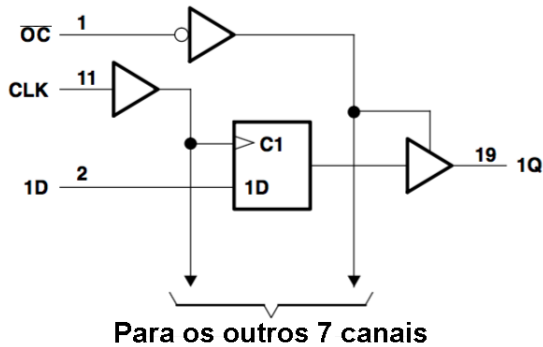
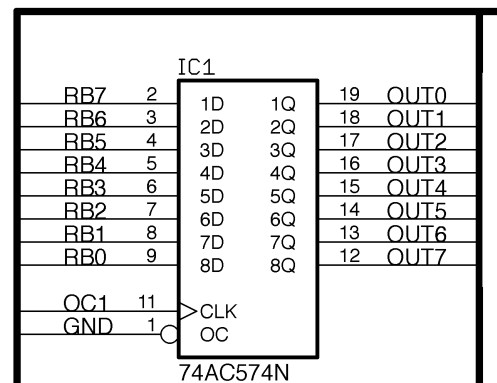


Figura 26 – Diagrama da interface entre o μC e o circuito de acionamento das bobinas



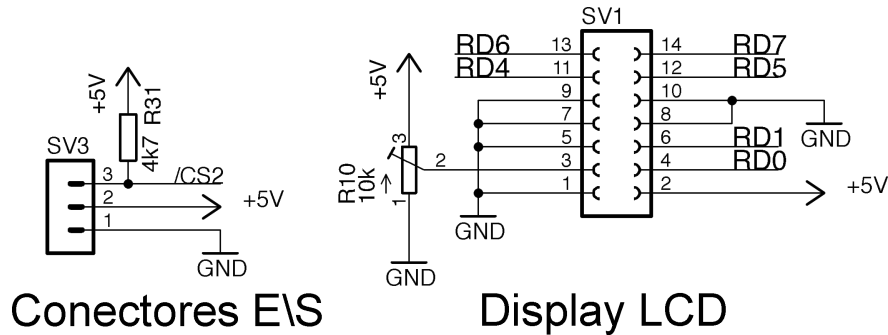
Para expandir a capacidade das portas de E/S do μC e protegê-las foi utilizado o CI 74HC574, um *Flip-Flop* TTL, tipo D, com disparo por borda e saída com *tri-state*. O diagrama interno do 74HC574 está representado na Figura 25, (INSTRUMENTS, 1997). A função *tri-state* deste circuito não foi utilizada, ficando o CI ligado diretamente ao circuito de acionamento do motor passo. A linha de comando \overline{OC} foi ligada ao terra (GND), conforme Figura 26. A linha de comando CLK, pino 11 do CI, é responsável pela memorização da informação no estágio de saída do CI. Quando a palavra de comando estiver pronta para ser memorizada é aplicado um pulso na linha de CLK e então, a informação da entrada fica registrada na saída do FF e permanece assim até que um novo pulso seja aplicado.

Cada motor de passo utiliza 4 linhas para o seu acionamento. Para que o Spectratomus-UVIS pudesse acionar até 4 motores, seriam necessários 16 portas do μC . A solução encontrada foi utilizar dois 74HC574 em paralelo, ligados a 10 portas do μC , com a seguinte distribuição: 8 portas para o comando dos motores de passo, compartilhadas pelos dois *flip-flops* e 2 portas para o controle do armazenamento CLK de cada 74HC574. Assim, cada *byte* de comando pode ser escrito individualmente em cada um dos 74HC574.

3.3.1.4 Módulos de entrada/saída

As portas do μC são do tipo coletor aberto, sendo necessário o uso de resistores de *pull-up* (4k7 Ω) para que o nível de tensão neste pino de saída seja de 5V, permitindo polarizar adequadamente os dispositivos auxiliares (botões e chaves de fim de curso), conforme ilustrado na Figura 27.

Figura 27 – Do lado esquerdo diagrama do conector de E/S para os botões do painel e das chaves de fim de curso. Do lado direito detalhe do conector do *display* de LCD



Dois conectores (*pin-header* de 3 vias) montados na placa de acionamento & controle são usados para a conexão dos botões de ajuste da corrente do LED (chaves do tipo NA), estes possibilitam o ajuste manual deste parâmetro. Outro botão serve para o acionamento do temporizador da lâmpada de halogênio. Três conectores desse mesmo tipo foram utilizados para conectar as chaves de fim de curso usadas na identificação da posição zero do posicionador da amostra, um último conector serve de entrada de alimentação para o módulo “fonte-relé” que controla a lâmpada de halogênio.

O *display* de LCD HD44780 está conectado a SV1, veja Figura 27. Foram utilizadas 4 portas do μC para envio de dados ao *display* e duas portas de controle, totalizando 6 pinos de E/S. Um *trimpot* (10k Ω) foi adicionado ao circuito para ajuste do contraste do LCD, esse valor é especificado pelo fabricante.

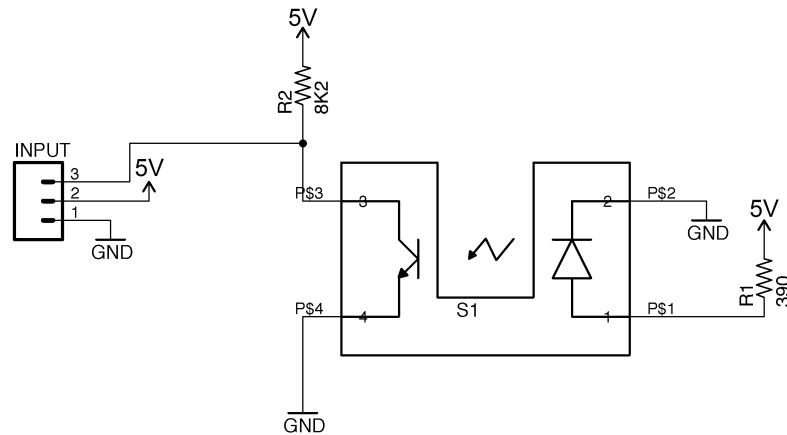
Os fins de curso dos eixos do posicionador da amostra são chaves ótica modelo TP850. Para o cálculo do resistor de polarização (R1) foi considerado que a queda de tensão no LED emissor é de 1,6 V e que a corrente não deve ultrapassar 10 mA. Substituindo esses valores na Equação 3.6 encontra-se um valor de 340 Ω para R1. O valor comercial mais próximo é de 390 Ω , uma vez que 330 Ω polarizaria o LED muito próximo do valor máximo de corrente preconizado pelo fabricante (TECHNOLOGY, 2015; TECHNOLOGY, 2008).

$$V_{CC} = V_{LED} + V_{R1} \rightarrow 5 - 1,6 = R_1 \cdot 10^{-2} \therefore R_1 = 340 \Omega \quad (3.6)$$

Para a determinação do valor de R2 foi considerado uma corrente de saturação I_C igual a 0,625 mA e V_{CE} de 0,4 V, seguindo os dados do fabricante. Pela Equação 3.7 encontra-se o valor de 7360 Ω , o melhor valor comercial é 8k2 Ω , uma vez que 6k8 Ω ultrapassa o valor seguro de I_C .

$$V_{CC} = V_{CE} + V_{R2} \rightarrow 5 - 0.4 = R_1 \cdot 0,625 \cdot 10^{-3} \therefore R_2 = 7360 \Omega \quad (3.7)$$

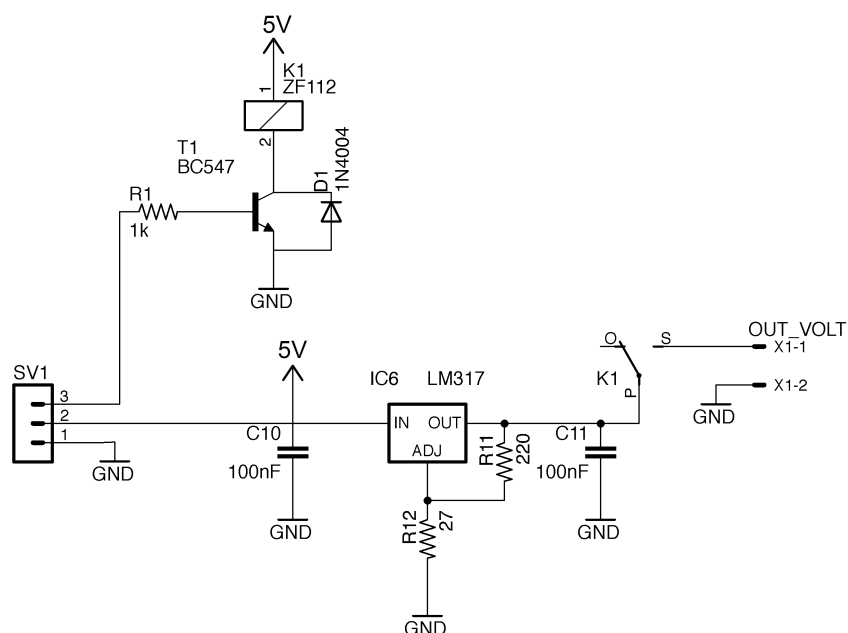
Figura 28 – Diagrama do circuito da chave ótica utilizada como chave de fim de curso dos eixos da máquina



O diagrama da Figura 29 se refere ao circuito de alimentação regulada da lâmpada de halôgênio, além do sistema de acionamento do relé de comando. A lâmpada de halôgênio utilizada é da marca Maglite, modelo Solitare cuja tensão de trabalho é 1,4 V, sendo assim, se faz necessário ajustar a tensão de operação para esse valor. Usando a Equação 3.2 e substituindo o valor de $R2=220 \Omega$ e $V_{out} = 1,4 \text{ V}$, tem-se:

$$1,4 = 1,25 \cdot \left(1 + \frac{R12}{220}\right) + 100 \cdot 10^{-6} \cdot R12 \rightarrow R12 = \frac{0,15}{5,78 \cdot 10^{-3}} \therefore R12 = 25,94 \Omega \quad (3.8)$$

Figura 29 – Diagrama do circuito regulador de tensão de 1,5V para a lâmpada de halógena de excitação e acionamento a relé.

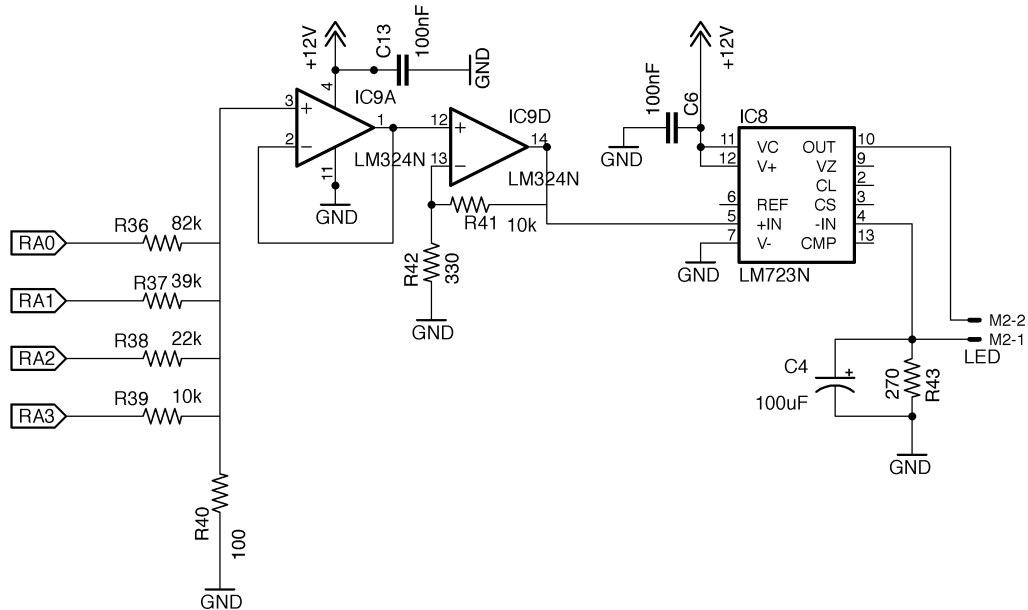


Assim o valor comercial para $R12$ é de 27Ω , garantindo a tensão adequada para o funcionamento da lâmpada. A operação contínua desse tipo de lâmpada reduz sua

vida útil. Para mitigar esse problema, inseriu-se um circuito temporizado de comutação a relé. Assim a unidade de controle pode ligá-la ou desligá-la, quando necessário, tanto de forma manual (botão no painel), quanto a partir da IHM. Em ambos os casos, o tempo ligado da lâmpada é controlado pelo temporizador do programa embarcado no μC .

Para o circuito de controle e ajuste da corrente do LED, ilustrado na Figura 30, foram empregados dois amplificadores operacionais (OP-AMP) LM324 e um regulador de tensão LM723. O LM324 possui internamente 4 OP-AMP, somente dois foram utilizados (IC9A e IC9D). A primeira etapa do circuito é um somador de corrente com resistores ponderados, a queda de tensão sobre um resistor ligado à massa é aplicada à entrada do amplificador em configuração de seguidor de tensão, a tensão de saída da etapa de *buffer* pode ser calculada pela Equação 3.9. O segundo OP-AMP, montado na configuração de amplificador não-inversor, confere um ganho à tensão gerada no somador resistivo, o valor da tensão de saída obedece à Equação 3.10, (CARTER; BROWN, 2001) e (INSTRUMENTS, 2015)

Figura 30 – Diagrama do circuito de conversão DAC para controle da corrente no LED de excitação



$$V_{O1} = \frac{V_{RA0} \cdot R40}{R40 + R36} + \frac{V_{RA1} \cdot R40}{R40 + R37} + \frac{V_{RA2} \cdot R40}{R40 + R38} + \frac{V_{RA3} \cdot R40}{R40 + R39} \quad (3.9)$$

$$V_{O1} = (9,901 \cdot V_{RA3} + 4,525 \cdot V_{RA2} + 2,558 \cdot V_{RA1} + 1,218 \cdot V_{RA0}) \cdot 10^{-3}$$

$$V_{O2} = V_{O1} \cdot \left(1 + \frac{10k}{330}\right) \rightarrow V_{O2} = 31,303 \cdot V_{O1} \quad (3.10)$$

Assim, o μC ao fornecer os valores binário $(0000)_2$ a $(1111)_2$, através das portas RA0 (LSB) a RA3 (MSB), sendo que o valor digital 0 corresponde a 0 V e 1 a 5 V, dígito a dígito, determina a tensão V_{O1} .

Desta maneira, substituindo esses valores na Equação 3.9, o valor de V_{O1} varia entre 0 V a 0,09 V, enquanto o valor de V_{O2} varia entre 0 V e 2,85 V segundo a Equação 3.10. Vale ressaltar que nos cálculos desses valores não foram levados em consideração as tensões de *offset* (2 mV), da saída de cada OP-AMP. Nenhum circuito de compensação dessa tensão de erro foi implementado neste projeto.

É sabido que cada LED possui uma tensão de operação (*forward voltage*) e que o fluxo radiante é proporcional a corrente que passa por ele (REZENDE, 2004). Assim, para que o LED não sofra dano, é necessário controlar esta corrente, uma vez que a tensão sobre ele pode ser considerada fixa. O LM723 faz parte do circuito de acionamento deste dispositivo e tem a função de manter constante a corrente de polarização do LED. Esta pode ser ajustada, fazendo com que o LED emita mais ou menos fótons (National Semiconductor, 1995).

Para calcular o resistor de realimentação (sensor de corrente) em série com LED foi estipulado que a corrente máxima aplicada seria de 10 mA, o que atende a uma grande variedade de LEDs comerciais, que operam bem nessa condição (KINGBRIGHT, 2016). A queda de tensão no sensor de corrente é igual a $V_{realimentação} = R43 \cdot I$. Como esta tensão é aplicada na entrada inversora do amplificador de erro do LM723, a tensão de saída do estágio anterior (LM324, V_{O2}) define o valor da corrente constante aplicada ao LED. A Equação 3.11 serviu para determinar o valor do resistor R43, o valor comercial mais próximo é $R43=270 \Omega$.

$$V_{O2} = V_{realimentação} \rightarrow V_{O2} = R43 \cdot I \therefore R43 = \frac{2,85}{10 \cdot 10^{-3}} = 285 \Omega \quad (3.11)$$

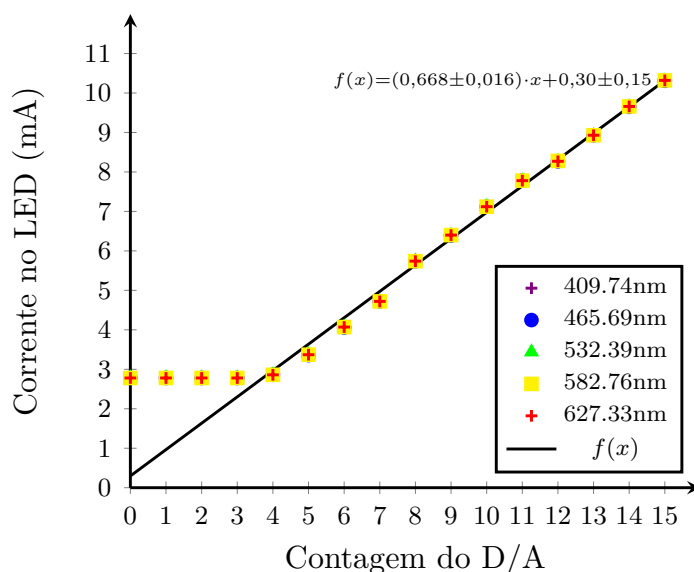
Para verificar se a fonte de corrente digital estava operando dentro do esperado, foi realizado um ensaio com 5 LEDs de diferentes comprimentos de onda. No ensaio foi usado um multímetro Minipa, modelo MD-511, operando como amperímetro, na escala de 20 mA. Os resultados experimentais são apresentados Tabela 1.

Os valores de corrente (Tabela 1) se mostraram consistentes e independentes dos LEDs utilizados, comprovando assim o funcionamento do circuito desenvolvido. Vale destacar que quando a palavra digital está entre 0 e 3 contagens não há mudança no valor da corrente, isso ocorre porque existe uma tensão mínima de *offset* na saída do LM723, que determina uma zona morta no acionamento do LED (National Semiconductor, 1995).

Tabela 1 – Levantamento dos valores de corrente em função do comprimento de onda de emissão do LED.

Contagem	Roxo 409,74 nm	Azul 465,69 nm	Verde 532,39 nm	Amarelo 582,76 nm	Vermelho 627,33 nm
0	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA
1	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA
2	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA
3	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA	2,78 mA
4	2,86 mA	2,86 mA	2,86 mA	2,86 mA	2,86 mA
5	3,37 mA	3,36 mA	3,37 mA	3,37 mA	3,37 mA
6	4,07 mA	4,06 mA	4,07 mA	4,07 mA	4,07 mA
7	4,72 mA	4,72 mA	4,72 mA	4,72 mA	4,72 mA
8	5,74 mA	5,74 mA	5,74 mA	5,74 mA	5,74 mA
9	6,40 mA	6,39 mA	6,39 mA	6,40 mA	6,40 mA
10	7,12 mA	7,12 mA	7,12 mA	7,12 mA	7,12 mA
11	7,78 mA	7,78 mA	7,77 mA	7,78 mA	7,78 mA
12	8,27 mA	8,27 mA	8,27 mA	8,28 mA	8,27 mA
13	8,93 mA	8,93 mA	8,92 mA	8,93 mA	8,93 mA
14	9,66 mA	9,65 mA	9,65 mA	9,66 mA	9,66 mA
15	10,32 mA	10,31 mA	10,30 mA	10,32 mA	10,32 mA

Apesar da simplificação do sistema de conversão DAC, pelo emprego de resistores quase-ponderados comerciais e não um arranjo R/2R, o que conferiria maior precisão a esta fonte de corrente com controle digital, o resultado final é bastante satisfatório. A prova disso, é o fator de determinação $R^2 = 0,99$, obtido para o ajuste linear dos pontos experimentais, ver Figura 31. Os valores de corrente no LED podem ser determinados pela equação $f(x) = (0,668 \pm 0,016) \cdot x + (0,30 \pm 0,15)$, com a ressalva de que os três primeiros valores de corrente (0, 1 e 2) fazem parte da zona morta e foram descartados da regressão linear.

Figura 31 – Gráfico dos pontos experimentais da Tabela 1 dos valores de corrente obtidos para os LEDs e a reta de aproximação $f(x)$.

3.3.2 Módulo de aquisição de dados de fluorescência

Uma das características mais importantes de um espectrômetro é a sua resolução espectral, ou óptica. A resolução espectral de um sistema determina o número máximo de picos do espectro que um espectrômetro é capaz de resolver. Por exemplo, se um espectrômetro num intervalo de 200 nm, tem uma resolução espectral de 1 nm, o sistema será capaz de resolver até 200 picos individuais.

Nos espectrômetros dispersivos, com detecção por CCD, três fatores determinam a resolução espectral: (i) a fenda de entrada, (ii) a resolução da rede de difração, (iii) a qualidade do detector. A fenda determina o tamanho mínimo da imagem que a óptica interna forma no plano do detector. A rede de difração determina a faixa de comprimento de onda total que o espectrômetro pode analisar. O detector determina o número máximo e o tamanho dos pontos discretos em que o espectro pode ser digitalizado.

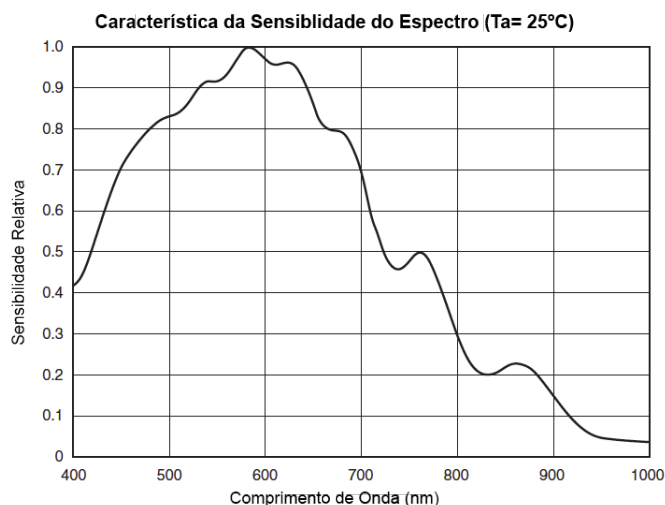
No Spectratomus-UVIS foi utilizado para aferir e analisar luz de emissão e de fluorescência um espectrômetro modular, modelo USB2000+, fabricado pela *Ocean Optics*, cedido para nosso grupo em regime de OEM. Esse modelo é um espectrômetro miniatura, com entrada para fibra ótica, que conta com conversor ADC de 12 *bits* operando em 2 MHz, uma eletrônica microcontrolada programável, um detector CCD de 2048 elementos e comunicação por uma porta USB 2.0. Essa combinação inovadora produz um espectrômetro rápido e oferece uma resolução entre 0,1 nm e 10 nm (FWHM), com a capacidade de armazenar um espectro completo a cada 1 ms, sem necessidade de uma alimentação externa. Além disso, como possui um microcontrolador embarcado os parâmetros operacionais deste dispositivo podem ser modificados pela interface IHM disponibilizada pelo fabricante (Ocean Optics, 2010).

O detector usado no espectrômetro USB2000+ é uma matriz CCD de 2048 elementos de alta sensibilidade da fabricante Sony, modelo ILX511B, sua curva de resposta pode ser vista na Figura 32. Suas principais características são (CORPORATION, 2008):

- Alimentação de 5 V;
- Tamanho do *pixel* de $14\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ ($14\mu\text{m}$ *pitch*);
- Gerador de tempo e *clock* internos;
- Circuito de amostragem e retenção internos;
- Frequência máxima de operação 2 MHz.

Os módulos USB2000+ possuem internamente um chip de memória do tipo EEPROM, com informações como, (i) coeficientes de calibração para cada comprimento de onda, (ii) coeficientes de linearidade, (iii) calibração da irradiância absoluta e (iv) o número

Figura 32 – Curva característica do CCD ILX511B extraído da folha de dados do fabricante Sony, os eixos foram traduzidos, (CORPORATION, 2008)



de série da unidade. Usando o aplicativo do espectrômetro é possível ler esses valores diretamente do espectrômetro, permitindo também o ajuste de forma individualizada em cada módulo caso seja necessário. Como os coeficientes estão dentro do módulo, a troca do módulo não implica na necessidade de uma nova calibração do sistema de detecção.

A *Ocean Optics* comercializa os módulos USB2000+ em diversas configurações para diferentes aplicações. Assim as principais características do módulo USB2000+ utilizado são (Ocean Optics, 2007):

- Detector Sony ILX511B de 2048 elementos;
- Resposta entre 200 a 1100 nm dependendo da rede de difração utilizada;
- Sensibilidade de 75 fótons/contagem a 400 nm; 41 fótons/contagem a 600 nm;
- Resolução ótica 0,3 nm (FWHM);
- Tempo de integração de 1ms a 65 s;
- Relação sinal/ruído 250:1;
- Ruído térmico - Dark noise 50 RMS contagens;
- Armazenamento interno em memória EEPROM;
 - Coeficiente de calibração por comprimento de onda;
 - Coeficiente de correção da linearidade;
 - Calibração da irradiância absoluta (opcional);
- Baixo consumo de energia 250 mA a 5 V;
- Conversor ADC de 16 bit, 3 MHz (configurável);
- 4 modos de gatilhamento;
- Certificação CE e RoHS.

A fibra ótica utilizada é do tipo multimodo de poliamida com diâmetro do núcleo de $600 \pm 10 \mu\text{m}$ (*core diameter*), a espessura do revestimento (*cladding thickness*) é de $30 \pm 3 \mu\text{m}$ e a zona tampão (*buffer thickness*) mede $25 \pm 10 \mu\text{m}$. A fibra vem com conectores do tipo SMA-905, com diâmetro de abertura de $100 \mu\text{m}$. Assim, a uma distância de 5 mm entre a ponta da fibra e a amostra, a coleta de luz é feita em uma área de $0,786 \text{ mm}^2$ formando assim, um ângulo sólido $\Omega = 0,2 \text{ rad}$.

3.4 SOFTWARE DESENVOLVIDO

Para a operação do topógrafo de fluorescência Spectratomus-UVIS foi necessário o desenvolvimento de dois programas, sendo um interno ao equipamento, ou *firmware*, e o outro um aplicativo para computador, que coincide com a interface homem-máquina (IHM).

3.4.1 Software embarcado na máquina - *firmware*

Firmware é um programa embarcado, escrito para um determinado μC , onde, geralmente, não se faz necessário o uso de um sistema operacional para a sua execução. Tais programas são escritos diretamente na linguagem de máquina do μC ou em linguagem de alto nível como C ANSI, quando escritos através de uma plataforma de desenvolvimento específica para cada controlador. Neste desenvolvimento foi utilizada a interface “*PIC C Compiler*” da empresa CCS - *Custom Computer Service, Inc.*

Já a IHM, que está instalada no PC, é executada a partir do sistema operacional (SO) Windows da Microsoft, sendo que a interface propriamente dita foi escrita em C# do Visual Studio 2012, também da Microsoft, com base na plataforma de formulário gráfico WPF (Windows Presentation Foundation). Uma aplicação WPF pode ser implantada, tanto em um ambiente *Desktop*, quanto hospedada num *site web*. O WPF se propõe a unificar um grande número de serviços de aplicações: interface com o usuário, desenhos 2D e 3D, documentos fixos e adaptáveis, tipografia avançada, gráficos vetoriais, gráficos Raster, animações, vinculação de dados, áudio e vídeo (NATHAN, 2006).

Uma vez escrito nessa plataforma é possível atualizar o programa para uma nova versão do sistema operacional Windows, ou ainda, migrá-lo para outro sistema operacional, isso graças ao uso do formulário em .NET, em linguagem C#.

O programa embarcado no μC tem a função de acionar e controlar o sistema de deslocamento dos motores de passo, controlar a fonte de corrente do LED e temporizar a micro-lâmpada halogênio, além de mostrar as informações no *display* de LCD, ler os estados das chaves de fim de curso e prover a comunicação entre a máquina e a IHM, seja por USB ou por serial RS-232.

Inicialmente, ao ligar o equipamento, este mostra no *display* de LCD a tela de abertura, Figura 33, informando em seguida a versão do *firmware* instalado, Figura 34. A ausência dessas mensagens deve ser compreendida como um sinal de advertência e possível falha no módulo de controle & acionamento.

Figura 33 – Tela inicial do Spectratomus-UVIS



Figura 34 – Tela inicial com o informe da versão do *firmware* da máquina



Com o intuito de prover robustez ao equipamento os dois modos de comunicações USB e serial, estão disponíveis para operação, sem necessidade de programação prévia, entretanto, somente um desses modos deve ser utilizado por vez.

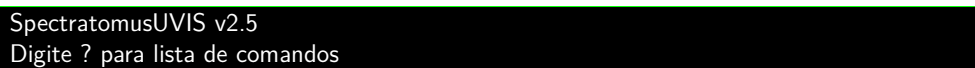
A comunicação USB implementada funciona como um conversor USB/Serial, aparecendo para o SO como uma porta serial padrão, normalmente uma COMx no Windows ou ttySn em Linux ou MAC. O *driver* para este conversor é disponível, juntamente com o PIC C Compiler, não sendo necessário nenhum desenvolvimento específico para tanto. Um grande inconveniente desse tipo de conversor, qualquer que seja ele, é que o SO Windows desliga ou bloqueia a comunicação desses conversores depois de algumas horas de uso, sendo necessário que os equipamentos sejam fisicamente reconectados ao PC. Sendo assim, quando for necessária uma aquisição de dados por muitas horas, recomenda-se o uso da porta serial no lugar da porta USB, para o módulo de controle & acionamento. Já o espectrômetro da *Ocean Optics* deve permanecer conectado à USB por se tratar outra classe de dispositivo, onde o SO Windows não interfere em seu funcionamento.

Quando a presença do equipamento conectado a uma porta USB do PC é detectada, uma mensagem informa no *display* LCD do Spectratomus-UVIS esta identificação, Figura 35. Uma mensagem negativa aparece, quando o equipamento for desconectado do computador, Figura 36. Dessa maneira o usuário pode monitorar quando o equipamento foi ou não identificado pelo PC. Entretanto, isto não quer dizer que o equipamento esteja apto a funcionar. Fazer funcionar o Spectratomus depende da instalação de um *driver* apropriado.

Figura 35 – Informe de USB conectado no computador**Figura 36** – Informe de USB desconectado do computador

A comunicação com a máquina foi baseada num sistema terminal serial padrão, permitindo o controle da máquina por qualquer interface que possa prover um terminal de comunicação serial, como por exemplo: HyperTerminal, Putty, RealTerm, SimpleTerm SE, Virtual Serial Port, Goserial etc. Assim, a taxa de comunicação (*baudrate*) deve ser ajustada para 57600 bps, sem *bit* de paridade (*none*), 8 *bits* de dados e um stop *bit*. Em linha de código seria: 57600,8n1. Além disso, os comandos devem ser finalizados pelo *handshake* padrão serial: “<CR>” seguido do comando “<LF>”, ou, em linguagem C “\r\n” e pela tabela ASCII usando os valores 13 e 10, respectivamente.

Ao se conectar pelo terminal ou pela IHM o equipamento envia uma mensagem de retorno padrão, Figura 37, informando que a comunicação foi estabelecida. No *display* será informado que a conexão foi estabelecida pela mensagem, Figura 38. Quando ocorrer algum erro, ou desconexão, aparece no *display* a mensagem de erro da Figura 39.

Figura 37 – Exemplo de uma tela em terminal emulado serial informando conectividade com o Spectratomus-UVIS**Figura 38** – Mensagem de conexão estabelecida entre o equipamento e o computador.**Figura 39** – Mensagem informando que a conexão não foi estabelecida entre o equipamento e o computador.

Pelo *software* que emula o terminal no *PC*, o usuário pode acessar a listagem dos comandos disponíveis digitando <?>, conforme ilustrado na Figura 37, a listagem aparece no terminal como mostra a Figura 40. Na Tabela 2 estão listados os nove comandos e seus respectivos parâmetros. Vale ressaltar que os comando só serão interpretados se digitados em caractere maiúsculos; mantendo *CAPS LOCK* ativado. Os valores numéricos devem ser números inteiros e positivos, caso ocorra uma digitação indevida desses valores, estes não serão interpretados pelo μC , sendo necessária sua redigitação.

Figura 40 – Exemplo de uma tela em um terminal emulado serial listando o menu de comandos do Spectratomus-UVIS

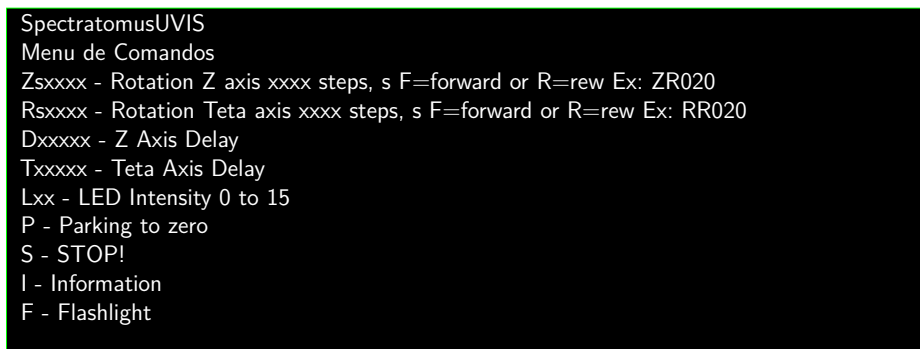


Tabela 2 – Lista dos comandos e parâmetros para o módulo de controle & acionamento.

Comando	Parâmetros	Valor	Descrição	
Zsxxxx	s=F p/ subir, R p/ descer	xxxx= quantidade de passos	0-5074	Acionamento do deslocamento no eixo Z
Rsxxxx	s=F horário, R anti-horário	xxxx= quantidade de passos	0-5074	Acionamento do deslocamento no eixo azimutal θ
Dxxxxx		xxxx = valores em ms	1-3000	Velocidade do acionamento do motor do eixo Z
Txxxxx		xxxx = valores em ms	1-3000	Velocidade do acionamento do motor do azimutal θ
Lxx		xx=valor da intensidade	0-15	Controle de intensidade do LED
P				Posicionamento inicial do sistema
S				Parada de emergência
I				Leituras dos parâmetros atuais do equipamento
F				Acionamento temporizado da lâmpada de <i>xenon</i>

Ainda operando a partir do terminal serial emulado, o formato correto dos comandos de deslocamento é <ZR020>. O *firmware* do μC do Spectratomus-UVIS interpreta este comando deslocando para baixo o porta-amostra em 20 passos e o *display* informa a confirmação do comando executado, como mostrado na Figura 41. O comando <ZF150> faz com que o porta-amostra suba em 150 passos e, de forma análoga, o LCD informa, como apresenta a Figura 42.

Figura 41 – Tela informando a movimentação do eixo Z - descendo



Figura 42 – Tela informando a movimentação do eixo Z - subindo



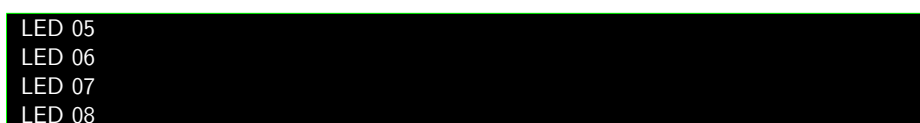
Outros comandos como <RR015>, para que a amostra seja girada no sentido anti-horário, também aparecem no *display* (Figura 43). O comando para girar no sentido horário tem a forma <RF020>, seu informe é ilustrado na Figura 44. Ao finalizar um dos comandos apresentados anteriormente, no *display* LCD aparece a mensagem “SpectratomusUVIS”, ver Figura 45, enquanto no terminal serial aparece a mensagem [0 steps].

Figura 43 – Tela informando a movimentação angular θ no sentido horário.**Figura 44** – Tela informando a movimentação angular θ no sentido anti-horário**Figura 45** – Tela informando o fim do deslocamento dos eixos.

Os comandos $\langle Dxxxx \rangle$ e $\langle Txxxx \rangle$ determinam o tempo de acionamento das bobinas dos motores de passo (eixos Z e azimutal θ). Esse parâmetro é importante para que o sistema possa garantir que não haverá perda de passos. Da experiência ganha nos ensaios controlados em bancada, este tempo foi fixado em 2 ms para ambos os eixos Z e θ . Este valor fica armazenado na memória EEPROM interna do μC . Os comandos $\langle Dxxxx \rangle$, $\langle Txxxx \rangle$ e $\langle I \rangle$ não são informados no LCD do equipamento, apenas via comunicação serial, conforme Figura 46.

Figura 46 – Exemplo de uma sequência de retorno do comando $\langle I \rangle$ dado em terminal emulado serial.

A corrente do LED pode ser alterada, tanto por comunicação serial entre o PC e o Spectratomus-UVIS, quanto através dos botões montados próximos ao LCD do equipamento. Isso atribui versatilidade ao equipamento, permitindo o ajuste mais rápido da intensidade da luz excitação pelo usuário. Uma vez pressionado um dos botões (\downarrow e \uparrow) montado na face do equipamento, o μC envia pela serial o valor alterado, o retorno desse comando pode ser visto na Figura 47. Mediante o envio do comando $\langle Lxx \rangle$ é possível alterar a corrente no LED, seja pelo terminal emulado ou pela IHM de controle.

Figura 47 – Exemplo de uma sequência de dados enviados pela serial quando o botão \uparrow foi pressionado 4 vezes pelo usuário.

Ao ser ligado o Spectratomus-UVIS estabelece como valor inicial, 0 contagens, o que corresponde a 2,78 mA de corrente aplicados no LED. Na medida em que são feitos incrementos nesse valor de contagens, o *display* informa essas alterações, até atingir o valor máximo 15, conforme ilustram as Figuras 48, 49 e 50.

Figura 48 – *Display* informando o valor inicial da contagem do DAC da corrente no LED.



Figura 49 – *Display* informando a intensidade de corrente no LED



Figura 50 – *Display* informando a intensidade máxima de corrente no LED



Ao enviar o comando para o posicionamento inicial <P>, o equipamento informa no *display* qual eixo está sendo posicionado, Figuras 51 e 52. O eixo azimutal gira no sentido horário até que a chave de fim de curso sinalize que a posição inicial foi alcançada, fazendo com que o porta-amostra fique alinhado, tanto com o suporte do LED, quanto como a fibra de coleta da luz de fluorescência. Posteriormente o eixo Z é movimentado até o topo, a chave de fim de curso informa o fim do posicionamento para o μC , o que em seguida é informado ao *display*, Figura 53.

Figura 51 – Posicionando o eixo azimutal θ



Figura 52 – Posicionando o eixo Z.

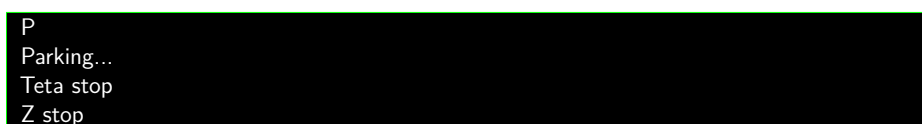


Figura 53 – Posicionamento finalizado.



Concomitantemente a IHM do PC recebe do μC a confirmação do comando e retorna o texto [Parking...], fazendo isso para cada eixo ([Teta stop] e [Z stop]), a sequência completa das mensagens de execução do comando <P> pode ser visualizada na Figura 54.

Figura 54 – Sequência completa do texto enviado pelo μC para a IHM em resposta ao comando <P> para o posicionamento inicial do porta-amostra.



No Spectratomos-UVIS o usuário pode acionar de forma manual a lâmpada de *xenon* usando o botão LAMP, localizado próximo ao *display*. Uma vez acionado o botão, o μC passa a monitorar o tempo que a lâmpada fica acesa, o som provocado pelo acionamento do relé pode ser ouvido e o *display* mostra a mensagem “Lamp -> ON” (Figura 55).

Passados 15 s a lâmpada é desligada e o *display* exibe a mensagem “Lamp -> OFF”, Figura 56.

Figura 55 – *Display* informando que a lâmpada de xenon está ligada.

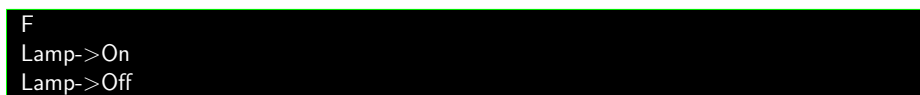


Figura 56 – *Display* informando que a lâmpada de xenon está desligada.



Pela IHM o comando <F> também executa a função de ligar a lâmpada, o desligamento é feito de forma automática. Em ambos os casos, através da comunicação serial, o μC informa a IHM o acionamento da lâmpada através da mensagem [Lamp->On], e ao final de 15 s a mensagem [Lamp->Off], como ilustrado na Figura 57.

Figura 57 – sequência completa do texto enviado pelo μC para a IHM em resposta ao comando <F>, para acionamento da lâmpada de halogênio e desligamento automático.



Um comando de emergência <S> foi implementado, com prioridade de interrupção do controlador, e possibilita parar ambos os eixos a qualquer momento pela IHM. Ao executar esse comando uma mensagem aparece no *display* (Figura 58), da mesma forma uma mensagem é enviada pela comunicação serial para a IHM [Parando os motores].

Figura 58 – *Display* informando que os motores foram parados e desligados.



Além da implementação, descrita anteriormente, foi necessário o desenvolvimento de uma biblioteca específica para o acionamento dos motores de passo. Essa biblioteca permite o acionamento dos motores pelas técnicas de duplo torque ou de meio passo. A técnica de acionamento em duplo torque consiste em energizar duas bobinas do motor de passo ao mesmo tempo, aumentando assim o torque do motor. Já técnica de acionamento de meio passo permite um acionamento alternado das bobinas, ora acionado uma bobina, ora acionando duas, aumentando assim o número de passos por volta e, portanto, a resolução do posicionador.

Conforme descrito na subseção 3.3.1.3, para o acionamento dos motores de passo foram reservados dois *bytes* de memorização dinâmica, o que permite ao Spectratomus-UVIS o controle de até 4 motores, ou um *byte* para cada par de motores. A biblioteca desenvolvida se encarrega de selecionar um *byte* por vez, armazenando a informação partir de um pulso de 20 μs , em seguida armazena o segundo *byte*. Como o acionamento é por

lógica inversa, ao iniciar o μC seus pinos estão em nível alto, ao escrever nos *flip-flops* (FF), destinados ao acionamento dos motores, as palavras são escritas na porta do μC , para só então serem armazenadas nos FFs, fazendo girar os motores.

Uma parte do código desenvolvido pode ser vista no código 3.1. A função `HALF_Step` recebe os parâmetros, velocidade, direção, quantidade de passos e seleção do motor, o que lhe permite realizar o deslocamento da matriz `M_HALF_STEP`, energizando alternadamente uma ou duas bobinas. De maneira análoga, a partir dos mesmos parâmetros, a função `FULL_Step` realiza o acionamento em duplo torque.

```
BYTE const M_HALF_STEP[8] = {0b1000, 0b1100, 0b0100, 0b0110, 0b0010, 0b0011, 0
    b0001, 0b1001};
VOID HALF_Step(int speed, char dir, int steps, BYTE Motors) {
    static BYTE stepper_state = 0;
    BYTE VALOR, i;
    for(i=0; i<steps; ++i) {
        switch (Motors){
            case 0:
                VALOR=M_HALF_STEP[ stepper_state ]<<4;
                output_B(VALOR);
                PIN_OFF(OC1);
                delay_us(20);
                PIN_ON(OC1);
                break;
            case 1:
                output_B(M_HALF_STEP[ stepper_state ]);
                PIN_OFF(OC1);
                delay_us(20);
                PIN_ON(OC1);
                break;
        }
        if(dir!='F')
            stepper_state=(stepper_state+1)&(sizeof(M_HALF_STEP)-1);
        else
            stepper_state=(stepper_state-1)&(sizeof(M_HALF_STEP)-1);
    }
    delay_ms(speed);
}
```

Código Fonte 3.1 – Trecho da biblioteca desenvolvida para acionamento dos motores de passo usando a técnica de meio passo.

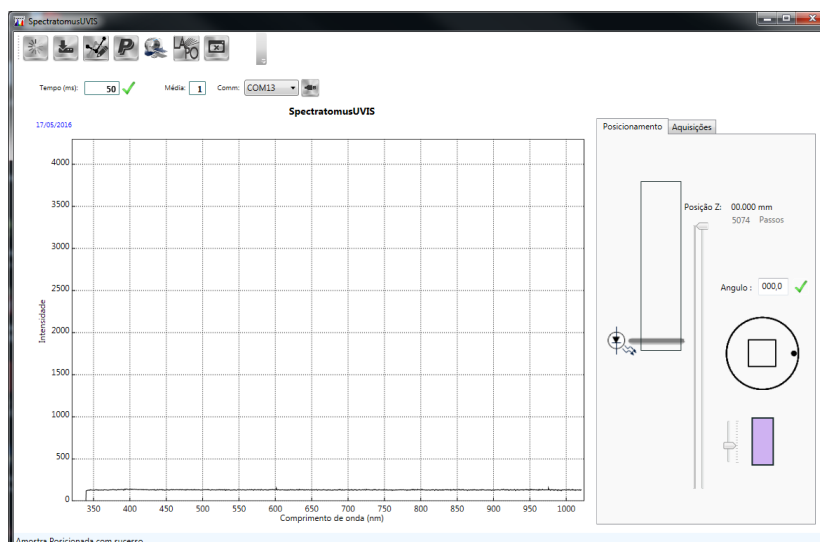
O deslocamento do eixo Z é feito em modo duplo torque, esse eixo conta com um fuso para aumentar a sua resolução. O eixo azimutal (θ) é acionado em modo meio passo, uma vez que o porta-amostra está montado em acoplamento direto com esse eixo, modo de acionamento indispensável para assegurar a resolução requerida.

3.4.2 Interface de controle no computador - IHM

A interface IHM, Figura 59, além das funções já discutidas, tem a função de permitir o monitoramento e a coordenação da aquisição dos dados de fluorescência, junto com o módulo de acionamento & controle. Nesta interface é possível visualizar, em tempo real, os espectros de fluorescência, enquanto a amostra é deslocada nos eixos Z e azimutal θ .

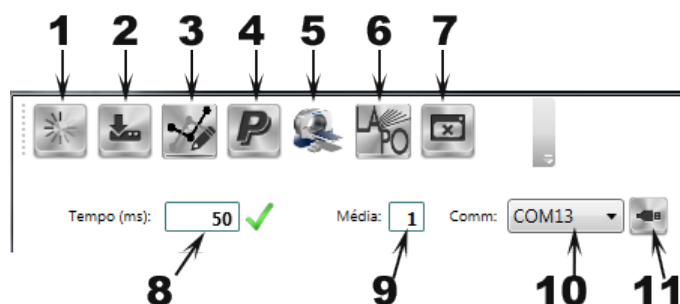
Ao iniciar a IHM, esta estabelece a comunicação com os módulos de aquisição de fluorescência e de controle & acionamento, uma mensagem de conexão bem sucedida pode ser visualizada no *display* do equipamento, Figura 38.

Figura 59 – Captura da tela da IHM do Spectratomus-UVIS



Caso algum erro ocorra, uma mensagem no computador especifica com qual dos módulos não foi possível estabelecer conexão. Como o SO Windows pode mudar a numeração da porta COMx sem aviso prévio, à IHM é dada a possibilidade de iniciar sua operação, mesmo em modo de erro de comunicação com o módulo de controle & acionamento. Neste caso, já com a IHM em execução, o usuário deve especificar em que porta serial o módulo se encontra, agindo sobre os botões indicados pelos números 10 e 11 da Figura 60.

Figura 60 – Captura em detalhe dos botões de comando da IHM do Spectratomus-UVIS



O objetivo desta interface é de ser simples e prática, com um pequeno menu de botões, Figura 60, além de outros ajustes e interações permitidos ao longo da interface, Figura 61. Todas as funcionalidades de operação do Spectratomus-UVIS estão implementadas, na Tabela 3 podem ser vistas essas funções.

Tabela 3 – Descrição das funções da IHM

Opção	Função
1	Limpa todos os dados de fluorescência adquiridos.
2	Salva todos os dados adquiridos.
3	Permite a navegação de todos os dados adquiridos por um cursor, ponto a ponto.
4	Posiciona o porta-amostra na posição inicial - "Home".
5	Abre o formulário para especificação da aquisição por varredura.
6	Informativo sobre a versão e o desenvolvimento da IHM.
7	Fecha a interface sem salvar os dados.
8	Especifica o tempo de integração para aquisição de dados variando de 3 ms a 65 s.
9	Estabelece quantas aquisições constituirão a média.
10	Seleciona a porta serial para comunicação com o módulo de controle & acionamento.
11	Conecta a interface ao módulo de controle & acionamento.
12	Deslocamento manual da amostra em Z.
13	Deslocamento manual da amostra em θ .
14	Ajuste do valor de corrente no LED.

Figura 61 – Captura em detalhe dos ajustes de deslocamento em Z, θ e do valor de corrente no LED.

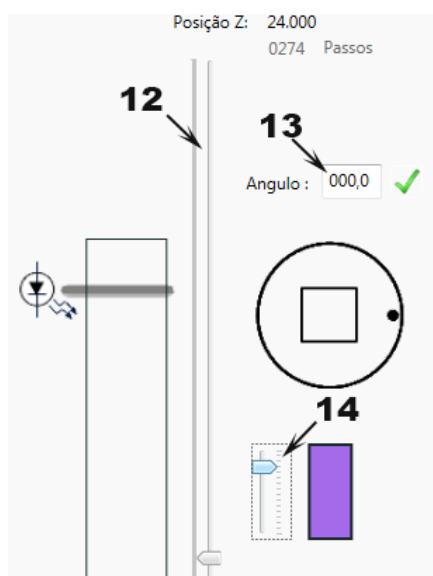
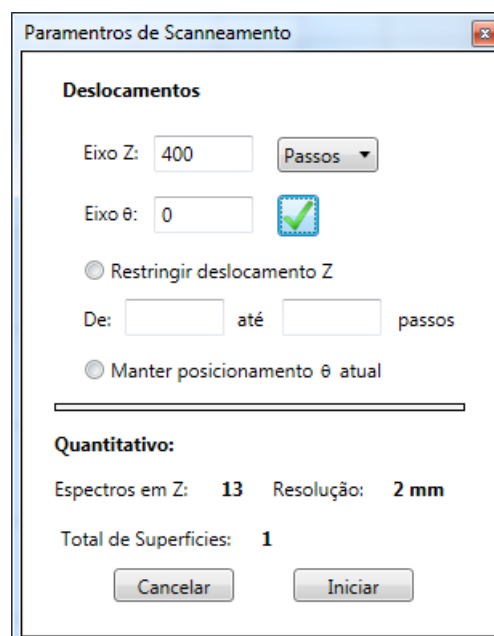


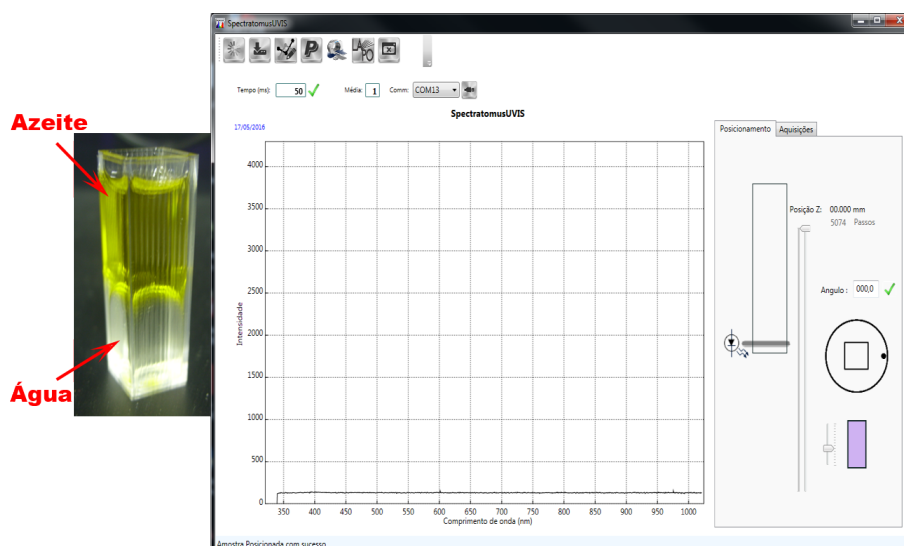
Figura 62 – Captura da tela de parâmetros da varredura do espectrotopografia de fluorescência da amostra.



Com o protótipo de engenharia do topógrafo de fluorescência (Spectratomos-UVIS) finalizado foi realizado um experimento para que suas diferentes funcionalidade fossem evidenciadas. Neste teste foi caracterizada uma amostra de água + azeite de oliva, a amostra resultou em uma mistura bifásica, conforme ilustrado na Figura 63.

Inicialmente foi colocada uma cubeta vazia no porta-amostra, ajustado o tempo de integração e a intensidade da corrente para o LED de excitação, até que fosse alcançadas entre 3500 e 4000 contagens de ADC, ora assumida como unidade arbitrária da intensidade de luz. Para o teste, o tempo de integração foi de 800 ms e a corrente do LED foi fixada no nível 12, ou 8,27 mA, conforme a Tabela 1.

Figura 63 – Exemplo de uma aquisição de dados com uma amostra bifásica - água+azeite de oliva.

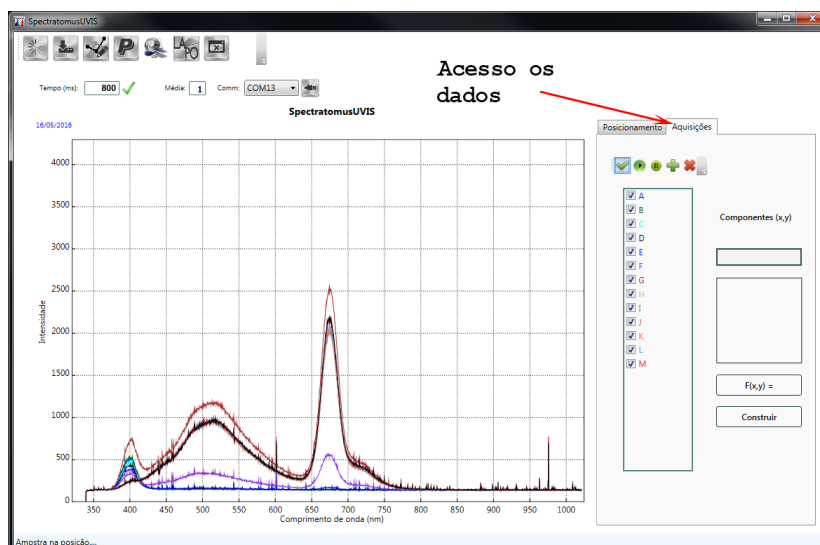


Uma vez ajustados os parâmetros iniciais a amostra foi colocada no porta-amostra, eventualmente o ângulo de início pode ser ajustado antes do início da aquisição. A interface permite que o ajuste do ângulo possa ser realizado pelo botão de *scroll* do *mouse*, ou pela digitação de um valor numérico em graus na IHM, item 13 da Figura 61.

Através da função *Scan*, opção 5 do menu, o formulário de escaneamento é aberto e alguns parâmetros podem ser ajustados de acordo com a necessidade do usuário, ver Figura 62. Esses parâmetros são a quantidade de passos, ou a distância em mm entre uma aquisição e outra. O usuário pode ainda restringir o deslocamento, quando se tratar de uma amostra com dimensões reduzidas, informando a posição inicial e final em Z. Outra possibilidade é manter o ângulo de posicionamento da amostra, uma vez que o ângulo inicial para o escaneamento é sempre 0^0 . Antes de iniciar a varredura, a quantidade de espectros que serão adquiridos e o total da superfície a ser observado são informados ao usuário.

Uma vez realizada a varredura os espectros de fluorescência são exibidos na tela da IHM e ficam disponíveis e acessíveis ao usuário. Cada espectro recebe um rótulo na sequência alfabética e uma cor diferente, além disso, uma série de informações é salva de forma independente, tais como posição, tempo de integração e a intensidade do LED. Essas informações são acessíveis através da aba “Aquisições”, em destaque na Figura 64.

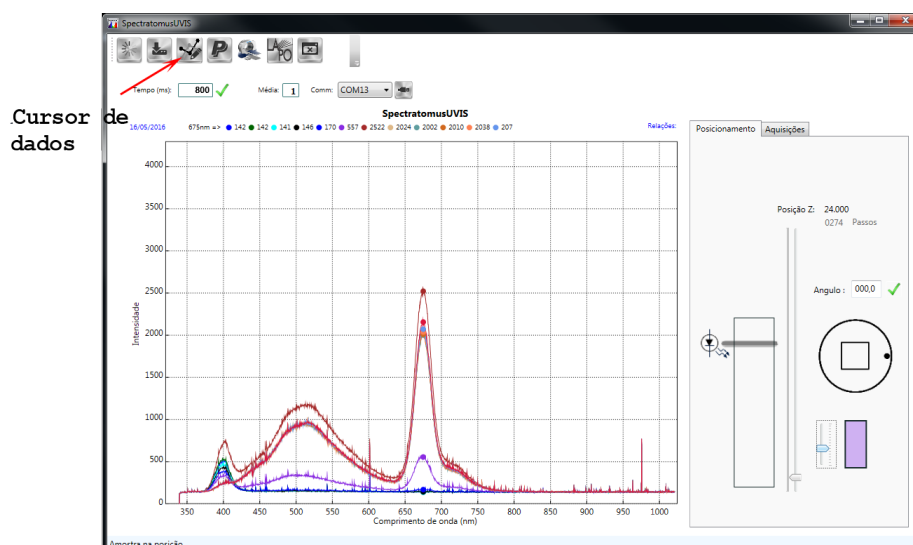
Figura 64 – Captura da tela que dá acesso aos dados individuais do Spectratomus-UVIS



A IHM permite ainda realizar operações matemáticas básicas entre os espectros adquiridos, são aceitas expressão como: A-B ou A·10, isso usando o botão “Construir”.

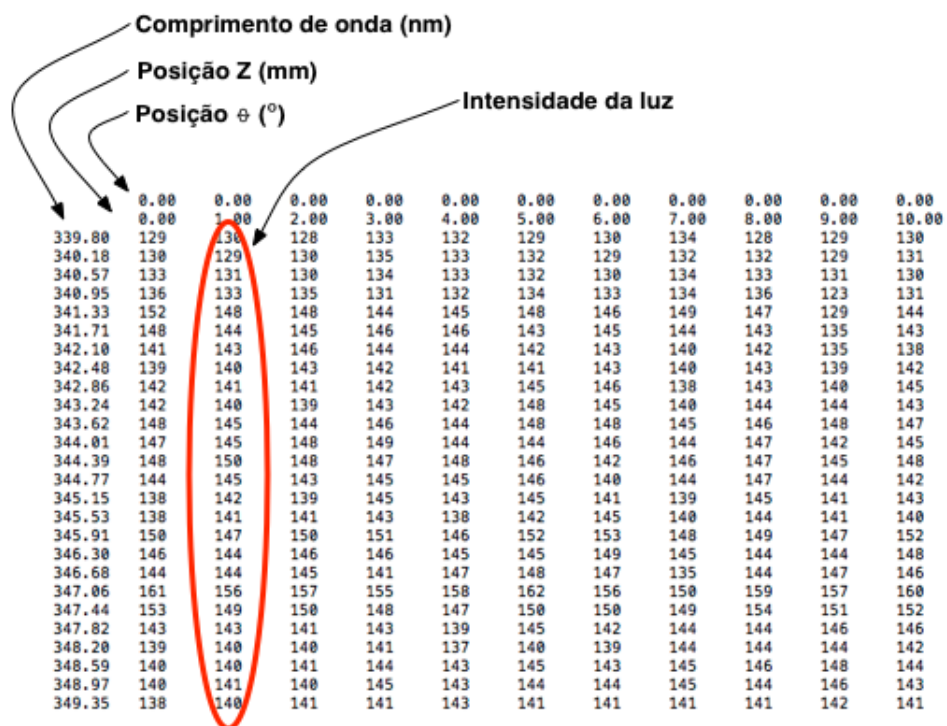
Pela da função cursor, item 3 da Figura 60, pode se habilitar a navegação através dos dados adquiridos e uma sequência de dados é mostrada na parte superior da área reservada aos espectros, ver Figura 65. São informados o comprimento de onda correspondente à posição do cursor e os valores de intensidade de luz para cada espectro exibido. Através das teclas de navegação do telado (← e →) o usuário pode fazer a navegação e assim encontrar a informação desejada.

Figura 65 – Captura da tela da navegação com os cursores nos dados adquiridos.



Quando o usuário desejar salvar os dados, item 2 da Figura 60, estes serão salvos em formato de texto, possibilitando a abertura dos mesmos por outros programas tais como Matlab, Origin, Excel etc. Na Figura 66 pode ser visto como esses dados são salvos: na primeira linha a posição azimutal da amostra, na segunda linha a posição Z em mm e a partir da terceira são guardados os dados adquiridos organizados por coluna, sendo na primeira o comprimento de onda em (nm) e nas demais colunas as intensidades de fluorescências adquiridas.

Figura 66 – Organização da saída de dados dos espectros adquiridos em formato txt.



4 TESTES DE VALIDAÇÃO E RESULTADOS

Os experimentos realizados com o Spectratomus-UVIS tiveram por objetivo medir, determinar e verificar as características do equipamento, bem como evidenciar os detalhes de seu funcionamento, aplicabilidade e validação. Neste sentido foram realizados dois ensaios. O primeiro ensaio serviu para verificar a precisão dos deslocamentos do porta-amostra ao longo do eixo Z e em torno do eixo azimutal θ , onde foi feita a determinação da intensidade da luz de fluorescência, em função do comprimento de onda, de uma amostra de teste, artificialmente produzida, tendo por objetivo os testes de engenharia do protótipo desenvolvido. No segundo ensaio, foram utilizadas amostras produzidas com finalidade de investigação científica. Estas amostras foram obtidas pela condensação de pontos quânticos em gelatina, assumidas a priori como homogêneas, este teste permitiu caracterizá-las gerando uma imagem da fluorescência ao longo de sua superfície, complementando outras técnicas de análise.

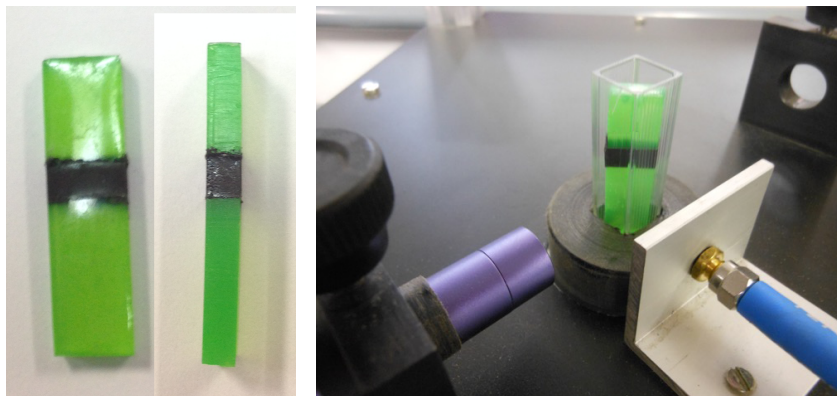
4.1 ENSAIO DO DESLOCAMENTO NO EIXO Z E ÂNGULO AZIMUTAL θ

Neste ensaio do Spectratomus-UVIS foi usada uma amostra sólida, de forma retangular, um tarugo de resina epóxi dopado com uma substância fluorescente (Saramanil 40 %). Nesta amostra foi criada uma descontinuidade, ou defeito ótico, distribuído longitudinalmente ao redor da superfície da amostra, com $5,6 \pm 0,2$ mm de espessura média, com centro de sua posição em $16,3 \pm 0,2$ mm em relação à base, aferida com um paquímetro digital, da marca Mitutoyo, modelo CD-6 ASX-B. Este defeito foi provocado pela aplicação de tinta automotiva fosca, preta, conforme ilustra a Figura 67a.

Figura 67 – Fotos da amostra preparada para o teste de deslocamento

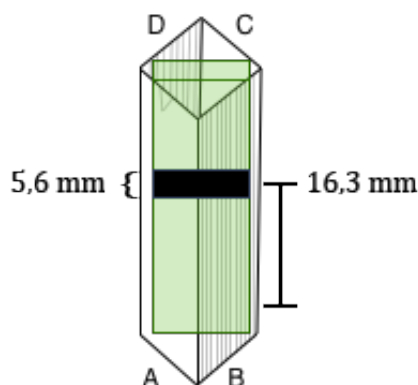
(a) Foto da amostra pintada com a faixa preta

(b) Foto da amostra no porta-amostra



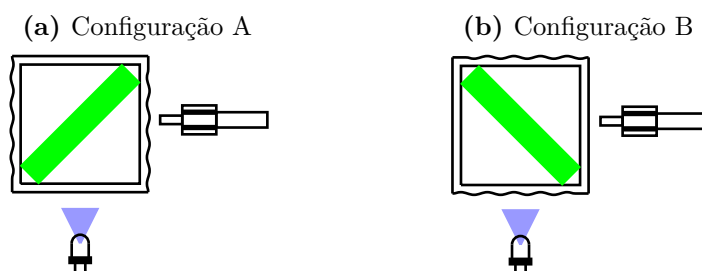
O objetivo desse experimento foi testar a sensibilidade e capacidade de discriminação do espectrotopógrafo, quanto a um defeito de superfície. Além de confirmar se o equipamento desenvolvido era capaz de determinar o tamanho do defeito e sua posição na amostra. A amostra foi acondicionada em uma cubeta padrão, em poliestireno, com 4,5 mL de volume, conforme ilustrado na Figura 68. Esta cubeta tem banda passante na faixa de 340 a 800 nm, com caminho ótico de 10 mm, com duas faces lisas e duas faces rugosas, lote de fabricação 4225/09, do fabricante Kartell S.P.A, Itália.

Figura 68 – Representação gráfica da amostra sólida na cubeta



Percebe-se que a amostra fica posicionada na diagonal no interior da cubeta, conforme Figuras 67b e 68. Com esse posicionamento têm-se sempre duas configurações para a incidência da luz de excitação e do ponto de coleção da luz de fluorescência. A primeira configuração acontece quando a luz de excitação incide na parte frontal da amostra e a captação da luz de fluorescência é feita nesta mesma face (configuração A). A outra configuração acontece quando a luz de excitação atravessa a amostra e a captação se dá pela face oposta, não iluminada diretamente (configuração B). As condições de ensaio estão ilustradas na Figura 69.

Figura 69 – Ilustração das condições sob a qual a amostra foi submetida ao ensaio do defeito ótico na amostra sólida

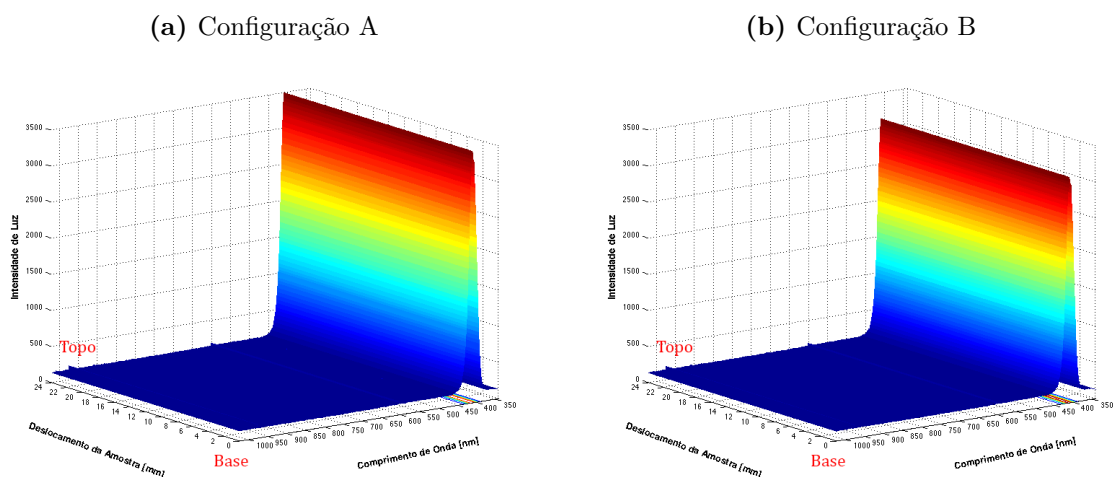


É importante lembrar que a cubeta tem quatro faces, sendo duas faces lisas e duas faces rugosas, conforme ilustrado na Figura 68. Desta maneira, a luz de excitação passa pela face lisa da cubeta e a luz de fluorescência é coletada pela face rugosa (Lisa

→ Rugosa), ver Figura 69a. Quando a cubeta é girada no sentido anti-horário, de 90° , as faces são invertidas e a medição passa a ser feita iluminando a face rugosa, sendo a fluorescência coletada na face lisa (Rugosa → Lisa), ver Figura 69b.

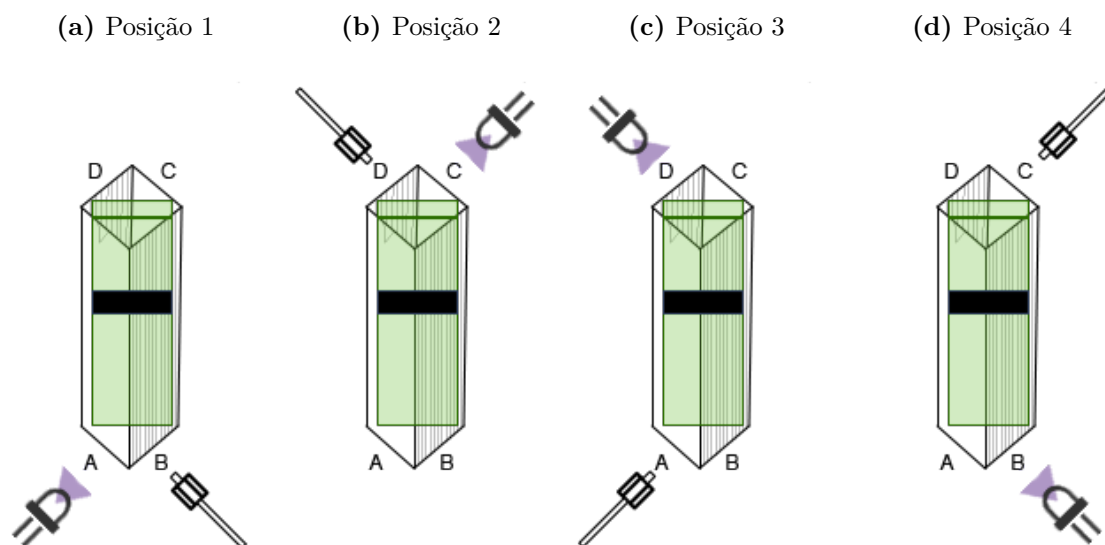
Inicialmente, foram realizadas duas aquisições do espectro de fluorescência com a cubeta vazia alternando a configuração de incidência, primeiramente na configuração Lisa → Rugosa e, em seguida, na configuração Rugosa → Lisa. Os espectros com a cubeta vazia servem para determinar uma eventual interferência do porta-amostra na absorbância e no espalhamento da luz de excitação. Servindo também, para verificar a eventual fluorescência do material de que é feita a cubeta, ou a presença de impurezas fluorescentes neste suporte. Nas informações adquiridas com a cubeta vazia não se observou qualquer alteração na luz de excitação que atravessa a cubeta, ver Figura 70.

Figura 70 – Espectrotopógrafia da cubeta vazia nas duas configurações A e B de ensaio.

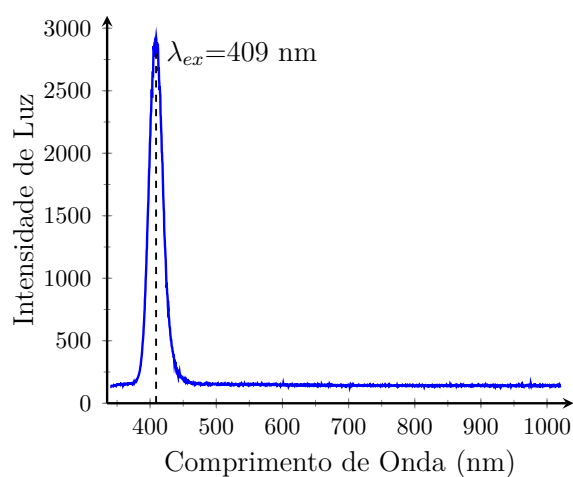


Em seguida foram realizadas mais quatro aquisições com a amostra posicionada em seu interior. As aquisições com a amostra podem ser organizadas da seguinte forma:

- Posição 1 - Luz de excitação incidindo na face lisa (A) e coleta da luz de fluorescência pela face rugosa (B), amostra na configuração A, ilustrado na Figura 71a;
- Posição 2 - Luz de excitação incidindo na face lisa (C) e coleta da luz de fluorescência pela face rugosa (D), amostra na configuração A, ilustrado Figura 71b;
- Posição 3 - Luz de excitação incidindo na face rugosa (D) e coleta da luz de fluorescência pela face lisa (A), amostra na configuração B, ilustrado na Figura 71c;
- Posição 4 - Luz de excitação incidindo na face rugosa (B) e coleta da luz de fluorescência pela face lisa (C), amostra na configuração B, ilustrado Figura 71d.

Figura 71 – Ilustração do posicionamento da amostra em relação as condições de iluminação e coleta da luz de fluorescência.

A aquisição de dados foi realizada utilizando o Spectratomus-UVIS, equipado com um LED de 409 ± 11 nm, como fonte de luz de excitação, polarizado por uma corrente de $10,32 \pm 0,03$ mA. O espectro de emissão do LED utilizado pode ser visualizado na Figura 72. Para determinar o tempo de integração do equipamento a amostra foi colocada na cubeta e aumentou-se gradativamente o tempo de interação até atingir a intensidade adequada do espectro observado, em torno de 4000. O tempo de integração do CCD do equipamento ficou programado para 420 ms. Ao final deste intervalo de tempo o espectro de fluorescência da amostra foi transferido para o PC e um novo deslocamento em Z foi realizado.

Figura 72 – Espectro de emissão do LED utilizado no experimento adquirida pelo próprio Spectratomus-UVIS

O espectro adquirido foi uma matriz de pares composta pelo comprimento de onda (variável independente) e a intensidade de luz para cada comprimento de onda (variável dependente), precedida pela informação da posição Z , onde a coleta do espectro foi feita. A amostra foi analisada ao longo do comprimento do eixo Z , com deslocamentos de 0,3125 mm ou 50 passos do motor, ao final de cada tempo de integração. Foi gerado um conjunto de 100 espectros de fluorescência para cada face da amostra.

4.1.1 Resultados

Os resultados obtidos foram agrupados em função da face iluminada. As superfícies espectrais obtidas podem ser visualizadas nos gráficos de superfície que serão apresentados a seguir. Nesses gráficos devem ser destacadas duas regiões de interesse, uma em torno dos 409,7 nm, que diz respeito à luz de excitação refletida pela amostra e outra próxima a 515,8 nm, que corresponde à luz de fluorescência produzida.

Analisando os gráficos nota-se que a intensidade luz de excitação refletida varia ao longo da amostra. É importante ressaltar que a amostra sólida, quando inserida na cubeta, não a preenche por completo, existindo uma interface de ar entre o poliestireno da cubeta e o epóxi da amostra. Esta interface favorece o fenômeno da reflexão, mas não necessariamente uma reflexão uniforme. Isto significa que o conjunto cubeta-amostra pode ter uma taxa de reflexão que varia ao longo do eixo Z .

Como mencionado anteriormente, foi criado na amostra um defeito opaco que impede a passagem da luz de excitação, mas também o escape da luz de fluorescência emitida pela amostra. Outro fator relevante, que deve ser ressaltado, é o fato da própria amostra não ser perfeitamente lisa ou polida, podendo apresentar um lado mais rugoso que o outro, além de imperfeições na sua superfície, que fazem variar o poder de reflexão da mesma.

Na Figura 73, tem-se a espectrotopógrafia de fluorescência da amostra obtida pela compilação dos dados adquiridos. Pode-se observar que existe um vale na intensidade da luz refletida (409,7 nm) ao longo do eixo Z . Em relação à luz de fluorescência (515,8 nm), também se observa um vale menos pronunciado que o seu homólogo. Para que fosse possível uma análise mais detalhada, foi extraído o contorno da espectrotopografia de fluorescência da amostra, centrados nos comprimentos de onda de interesse. A partir dessas curvas, aplicou-se uma distribuição normal (gaussiana) para determinar a largura do defeito ótico da amostra usando o *software* Origin versão 7.0. Na Figura 74 é possível observar o vale causado pela supressão da reflexão da luz de excitação média, este vale ajustado por uma gaussiana tem centro na posição $\mu = 2729 \pm 13$, em unidades de passos de motor, e meia

Figura 73 – Espectrotopógrafia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 1

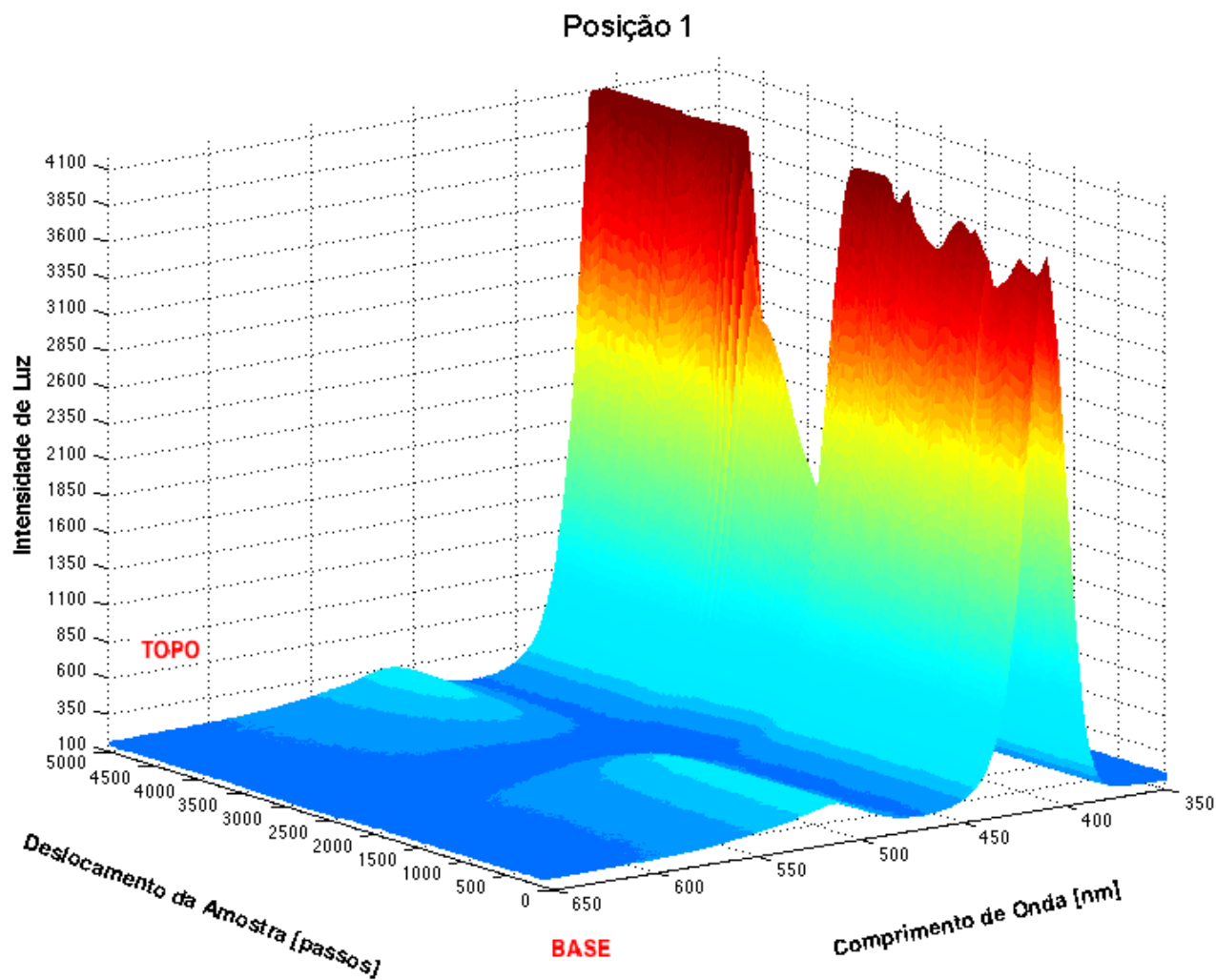
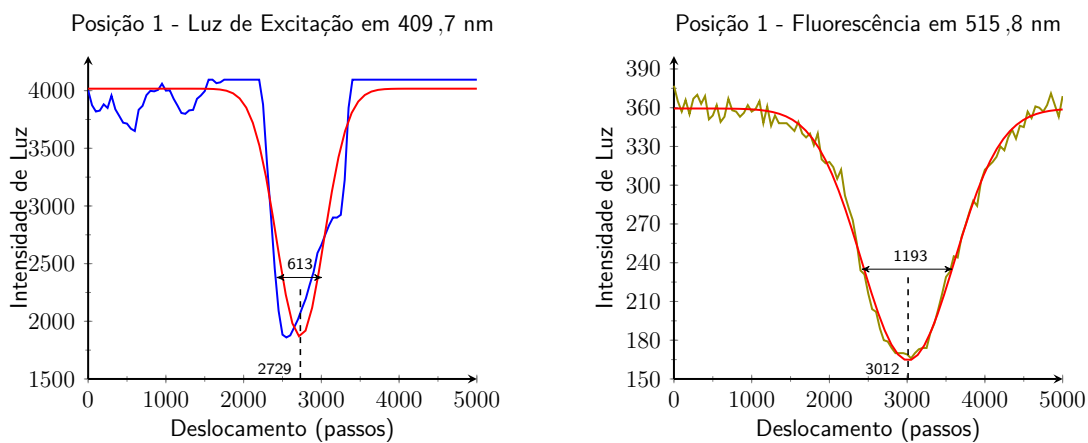


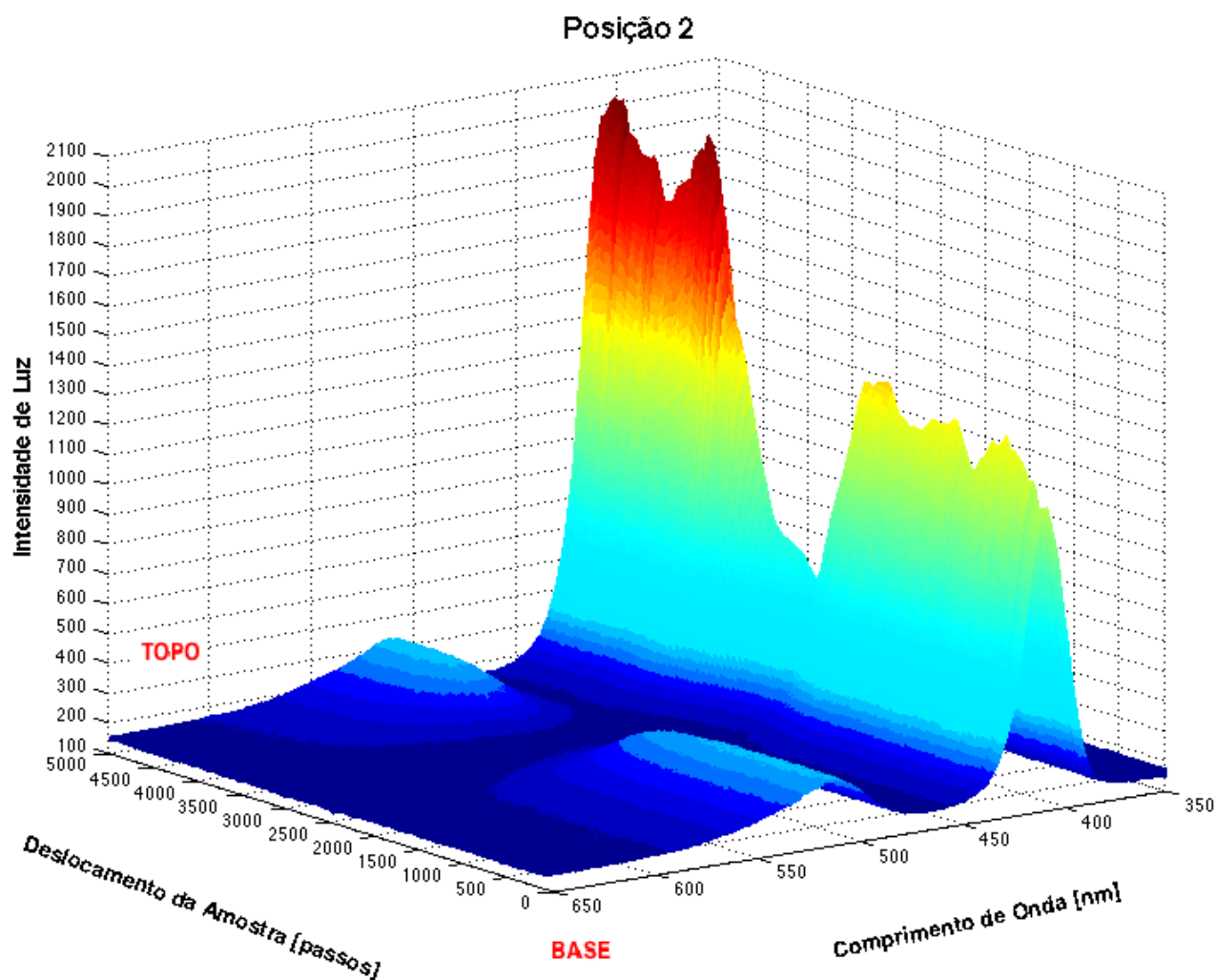
Figura 74 – Contornos na região de interesse na Posição 1. As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.



largura de $\sigma = 613 \pm 28$ passos de motor. Na região que corresponde à supressão da luz de fluorescência, a gaussiana ajustada tem centro em $\mu = 3012 \pm 6$ passos de motor e meia largura de $\sigma = 1193 \pm 16$ passos de motor.

Na Figura 75 é observado um comportamento similar ao anterior, a curva de contorno da região de interesse pode ser visualizada na Figura 76. Assim, obtêm-se os seguintes valores para o centro da região de supressão da luz de excitação $\mu = 2730 \pm 10$ passos de motor, enquanto que a sua meia largura vale $\sigma = 931 \pm 90$ passos de motor, e na região de supressão da fluorescência, o centro da distribuição está em $\mu = 3060 \pm 10$ passos de motor e meia largura de $\sigma = 1151 \pm 24$ passos de motor.

Figura 75 – Espectrotopografia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 2



Nas Figuras 77 e 79 nota-se o mesmo comportamento visto anteriormente, a presença de dois vales, um causado pela supressão da luz de excitação e outro pela supressão da luz de fluorescência. Vale lembrar que a cubeta na configuração B, significa que a luz

Figura 76 – Contornos na região de interesse na Posição 2. As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.

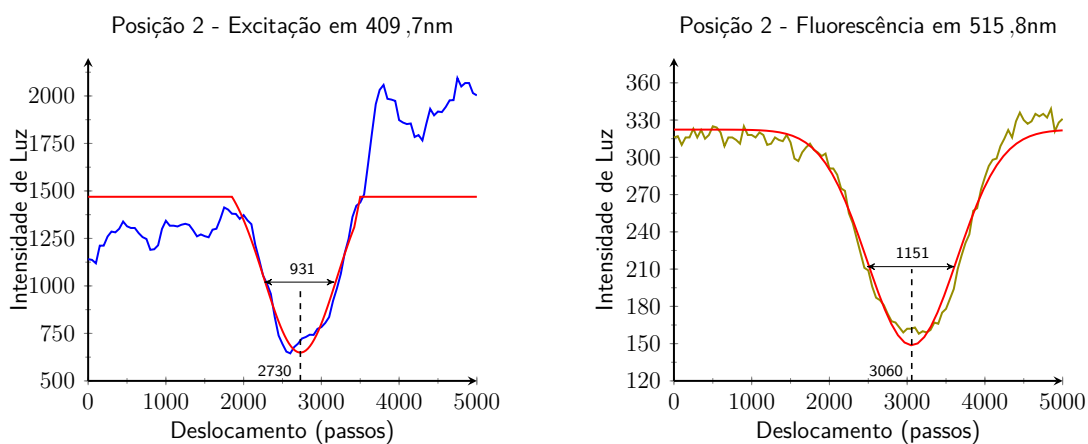


Figura 77 – Espectrotopografia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 3

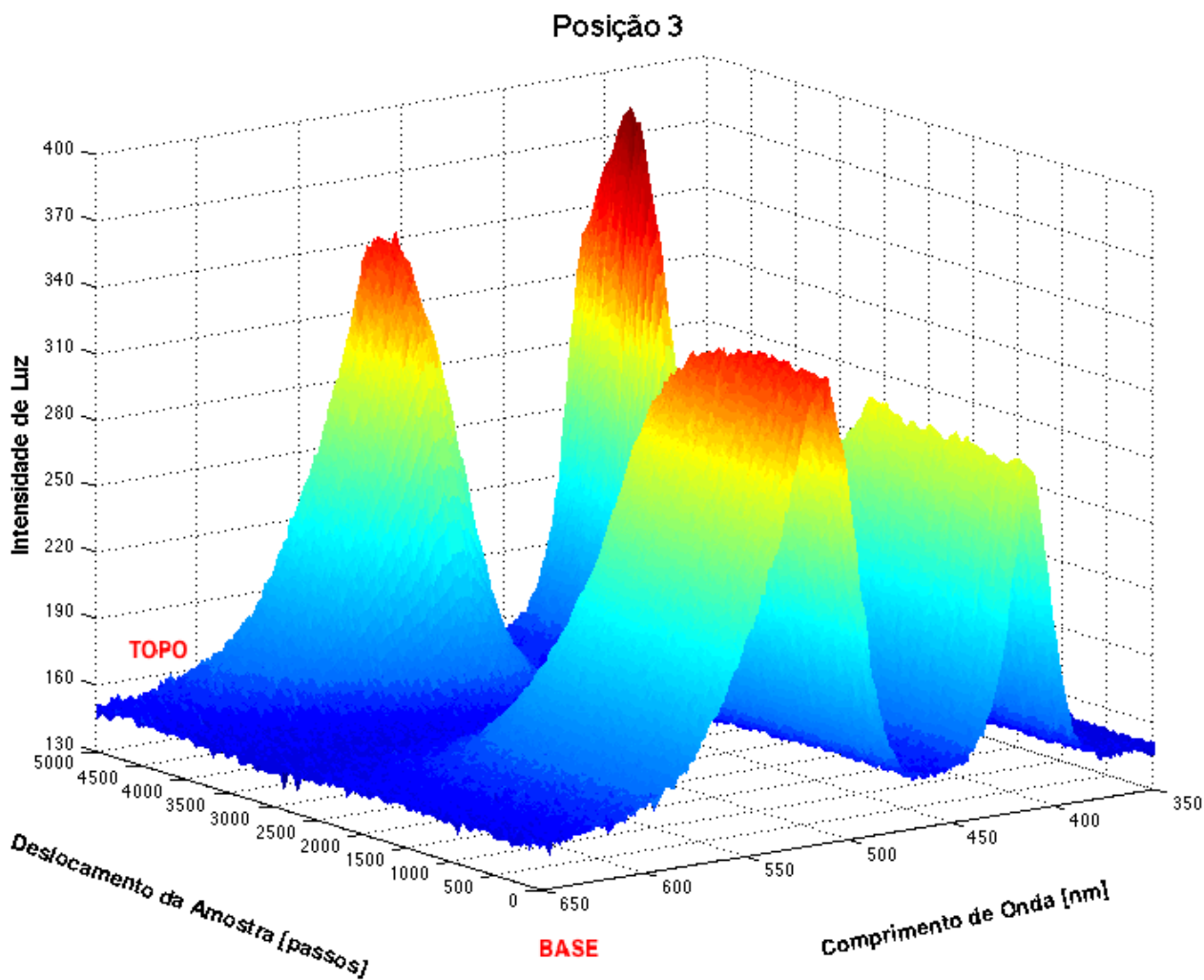
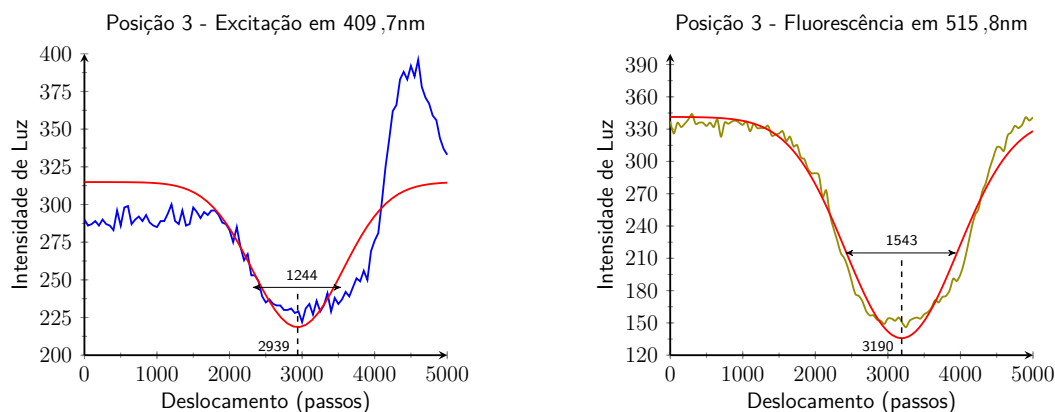


Figura 78 – Contornos na região de interesse da face rugosa para lisa, D→A (Posição 3). As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.



de excitação passa pela superfície rugosa do porta-amostra, ilumina a amostra pela parte posterior e a fluorescência é coletada na face frontal da amostra, o que acarreta uma perda de intensidade da luz coletada. Assim, como visto anteriormente, no ponto onde se encontra o defeito, não há fluorescência, nem tampouco luz de excitação refletida.

Uma iluminação nestes moldes determina forte absorção da luz de excitação pela amostra, assim como, mais luz espalhada pelo caminho ótico, amostra e porta-amostra. A mistura resina epóxi e corante também não é totalmente homogênea, uma vez que a concentração do corante pode variar ao longo da amostra, o que ocasiona a variação da absorvância da amostra e, portanto, de sua fluorescência.

Na Figura 78 é apresentada a curva de contorno para a iluminação na Posição 3. Assim, obtêm-se os seguintes valores para o centro da região de supressão da luz de excitação $\mu = 2939 \pm 59$ passos do motor, enquanto que a sua meia largura vale $\sigma = 1244 \pm 149$ passos do motor, e na região da fluorescência, centrada em $\mu = 3190 \pm 11$ passos do motor e a meia largura $\sigma = 1543 \pm 31$ passos do motor. Já na Figura 80, ilumina a face B e a coleta é feita pela face C (Posição 4), para a região da luz de excitação o centro é $\mu = 3144 \pm 28$ passos do motor e a meia largura $\sigma = 779 \pm 72$ passos do motor. A região de supressão de fluorescência tem centro em $\mu = 3115 \pm 7$ passos do motor e a meia largura $\sigma = 1104 \pm 16$ passos do motor.

Nas Figuras 77 e 79 observa-se um comportamento anômalo, uma flutuação das intensidades associadas aos comprimentos de onda a partir de 650 nm. O mapa feito pela compilação dos 100 espectros, iluminando a amostra pela face D ou B da cubeta e coletando a fluorescência através da face A ou C, indica certa atividade de emissão em comprimentos de ondas mais longos que o esperado. Quando da caracterização por

Figura 79 – Espectrotopografia da amostra ao longo do eixo Z na Posição 4

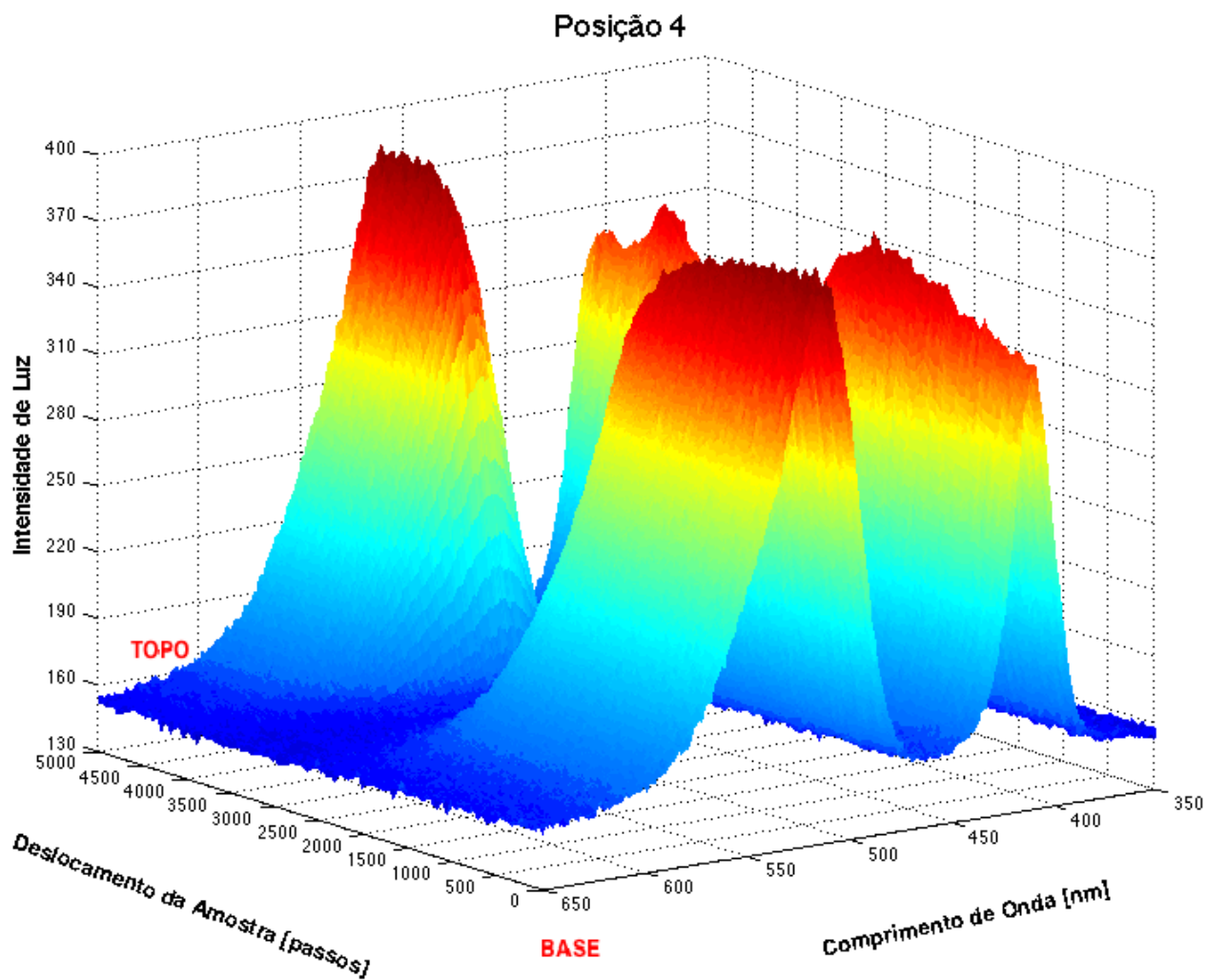
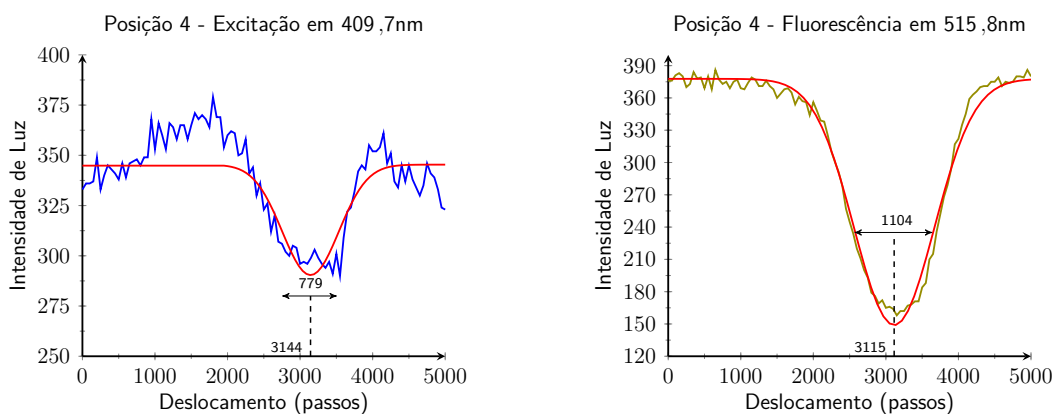


Figura 80 – Contornos na região de interesse da face rugosa para lisa , B→C (Posição 4). As curvas em vermelho são a distribuição normal calculada sob os dados adquiridos para cada região de interesse.



espectrofluorescência simples dessa amostra, não foram observados componentes de fluorescência no infravermelho (IR), como se vê nas Figuras 73 e 75.

Na configuração B, a amostra é iluminada pela parte rugosa da cubeta que difrata uma parte desta luz de excitação. A luz de excitação é mais absorvida ou dispersada nessa condição, diminuindo a relação sinal/ruído, dando maior destaque para o ruído térmico, se comparado com iluminação na configuração A.

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os resultados agrupados das curvas de contorno na região de supressão da luz de excitação e da luz de fluorescência, para cada uma dos 4 condições de iluminação. Ainda nestas tabelas figura o cálculo dos centros e das larguras do defeito artificialmente inserido na amostra. Para converter o valor de passos de motor em uma unidade métrica do SI (mm) foi usada a Equação 4.1. Cinquenta passos de motor separam cada ponto de medição da fluorescência da amostra, ou 0,3125 mm.

$$Largura = \frac{\sigma}{50} \times 0,3125 \quad (4.1)$$

Tabela 4 – Tabela dos resultados do defeito ótico inserido na amostra na região da luz de excitação

Supressão da luz de excitação				
	Centro	Centro do defeito	Meia largura	Largura do defeito
Posição 1	2729 ± 13	17,1 ± 0,1 mm	613 ± 28	3,8 ± 0,2 mm
Posição 2	2730 ± 10	17,1 ± 0,1 mm	931 ± 90	4,8 ± 0,6 mm
Posição 3	2939 ± 59	18,4 ± 0,4 mm	1244 ± 144	7,8 ± 0,9 mm
Posição 4	3144 ± 28	19,7 ± 0,2 mm	779 ± 72	4,9 ± 0,5 mm
	Média	18,1 ± 0,2 mm		5,3 ± 0,6 mm

Tabela 5 – Tabela dos resultados do defeito ótico inserido na amostra na região da luz de fluorescência

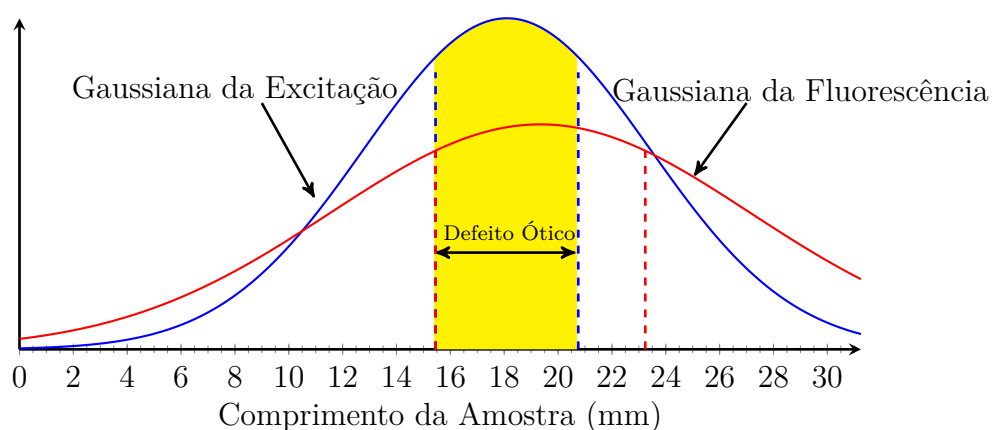
Supressão da luz de fluorescência				
	Centro	Centro do defeito	Meia largura	Largura do defeito
Posição 1	3012 ± 6	18,83 ± 0,04mm	1193 ± 16	7,5 ± 0,1 mm
Posição 2	3060 ± 10	19,13 ± 0,06 mm	1151 ± 24	7,1 ± 0,2 mm
Posição 3	3190 ± 11	19,94 ± 0,06 mm	1543 ± 31	9,6 ± 0,2 mm
Posição 4	3115 ± 7	19,47 ± 0,04 mm	1104 ± 16	6,9 ± 0,1 mm
	Média	19,34 ± 0,05 mm		7,8 ± 0,2 mm

Com base nos resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5, foi calculada a média dos valores obtidos e comparados os valores da posição e largura do defeito ótico. Assim, tanto na configuração de iluminação A, quanto na configuração de iluminação B, a luz de excitação apresentou o menor erro percentual na determinação da posição do defeito e da largura da amostra, com um erro médio de 11,04 % para a determinação da posição central do defeito e de 5,36 % para a largura do defeito.

Na determinação desses mesmos aspectos do defeito, a partir da luz de fluorescência, observou-se um erro percentual maior do que foi observado usando a supressão da luz de excitação, o erro na determinação da posição central foi de 18,65 % e 39,29 % para a largura. Vale ressaltar que na Posição 3 foi obtido a maior discrepância, em comparação com as demais condições. N.B.*, o defeito ótico artificialmente inserido na amostra não tem altura constante em todas as faces, portanto é de se esperar que o erro na configuração de iluminação B seja maior. Visto que o caminho ótico não está perfeitamente alinhado com a outra face da amostra, caminho este que ainda pode ser alterado pela refração da luz ao atravessar a própria amostra.

Um método alternativo para auxiliar na determinação da posição e da largura do defeito da amostra pode ser implementado realizando a superposição das gaussianas encontradas pela média dos valores discutidos anteriormente. A Figura 81 ilustra esta superposição, superpor as gaussianas significa refinar a determinação dos parâmetros geométricos a partir do cruzamento das informações obtidas, de forma independente, para dois efeitos também independentes: supressão da fluorescência e supressão da luz de excitação pelo defeito. Portanto, é correto afirmar que defeito na amostra se encontra na posição que vai de 15,4 mm a 20,7 mm o que determina uma largura de 5,3 mm. Assim, tem-se um erro no valor de 14,07 % para determinação da posição inicial, um erro no valor de 8,38 % para a determinação da posição final e para a largura do defeito um erro de 5,36 %.

Figura 81 – Superposição das gaussianas da luz de excitação e de fluorescência identificando o local do defeito ótico.



Esses resultados demonstram e comprovam que o equipamento tem a capacidade de, não só analisar a amostra em seu comprimento, como também de determinar, com

* **Nota bene** é uma locução latina que significa “note bem”, no sentido de “preste atenção”.

erro relativo menor que 15%, a posição e a extensão onde o defeito topológico ocorre, permitindo uma nova gama de possibilidades para a caracterização de substâncias.

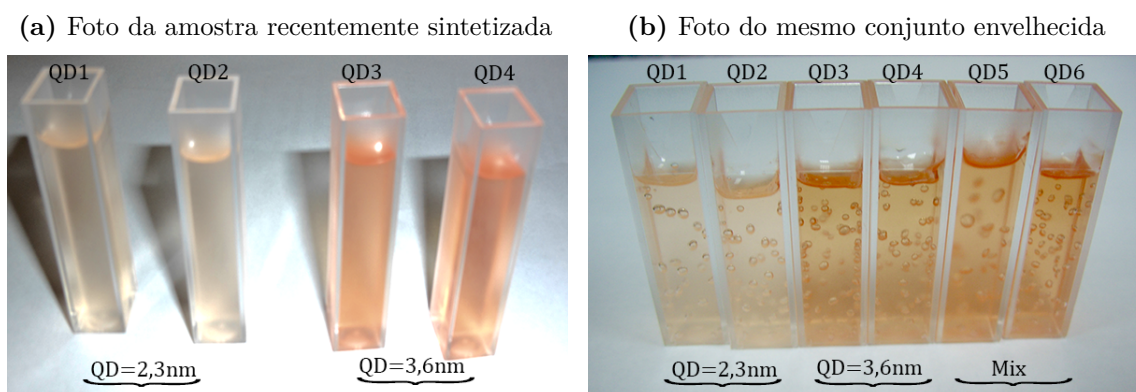
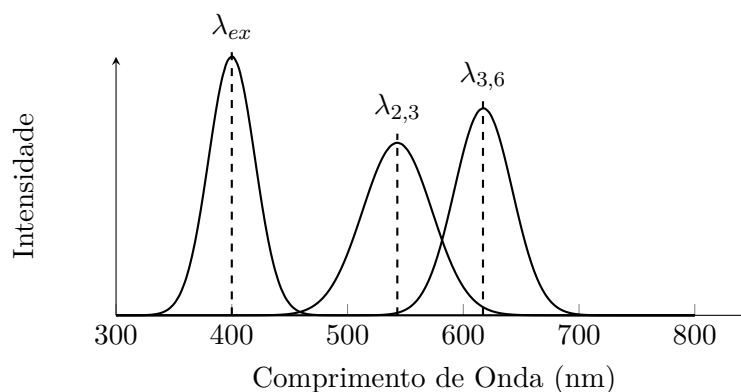
4.2 AMOSTRAS EM PONTOS QUÂNTICOS

Os pontos quânticos (*Quantum Dots* - QD) vêm sendo extensivamente estudados nos últimos anos em função de suas aplicações como dispositivos fotovoltaicos, dispositivos eletrônicos e biomédicos, além de serem estudados com o objetivo de expandir o entendimento de suas propriedades. A síntese destas nanopartículas pode ser realizada tanto por meio orgânico, via precursores organometálicos, quanto em meio aquoso, a partir dos sais dos precursores. Cada uma destas rotas de síntese apresenta vantagens intrínsecas, sendo possível modelar as propriedades dos QD para aplicações específicas (THEIVASANTHI; ALAGAR, 2013; SILVA et al., 2010).

No intuito de testar o Spectratomus-UVIS pela caracterização, com finalidade de investigação científica, de uma amostra com interesse de pesquisa básica, foi trazido um conjunto de amostras preparadas pelo professor Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana do Instituto de Química da UFBA para que fossem caracterizadas no equipamento desenvolvido, uma vez que o mesmo já havia tentado em outros equipamentos de espectrofluorimetria sem sucesso.

Assim, inicialmente foram sintetizados, em laboratório, pelo Dr. Santana, pontos quânticos pelo método de síntese hidrotérmica (VALE et al., 2015). Desta síntese foram obtidos QDs de CdTe recobertos com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA-CdTe), com dois diâmetros diferentes, 2,3 nm e 3,6 nm. Para a remoção de contaminantes e obtenção dos pontos quânticos em fase sólida foi empregado etanol PA, que promove a precipitação destes corpúsculos. O precipitado foi posteriormente separado por centrifugação, para em seguida ser secado a vácuo e só então, ser armazenado em frascos âmbar ao abrigo da luz. Esta metodologia de síntese está de acordo com o procedimento proposto por Silvestre (SILVESTRE et al., 2011; FORTES et al., 2011), sendo a mesma rota empregada pelo professor Santana em sua tese de doutoramento e em trabalhos correlatos (SANTANA; KORN; SANTOS, 2013; SANTANA et al., 2015).

Para os ensaios foram preparadas seis amostras de QD, condensadas em gelatina de agarose e posteriormente acondicionadas em cubetas de poliestireno de 4,5ml. Sendo, duas amostras com QD de 2,3 nm de diâmetro, duas com QD de 3,6 nm e duas com a mistura desses dois tamanhos de pontos quânticos, com titulação de 50 % de cada diâmetro. Essas amostras foram preparadas ao mesmo tempo, para só então sofrerem resfriamento em balde de gelo, possibilitando a solidificação da gelatina. Em seguida, foram guardadas na geladeira à 10 °C até o dia do primeiro ensaio. Fotos das amostras testadas podem ser visualizadas nas Figuras 82a e 82b.

Figura 82 – Fotos do conjunto de amostras sintetizadas com QD**Figura 83** – Espectros de fluorescência dos QD de MPA-CdTe

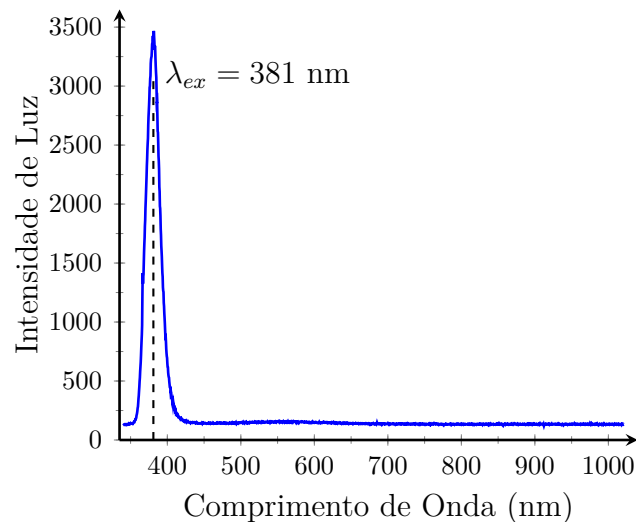
Na Figura 83 são apresentados os espectros de fluorescência dos QD sintetizados em MPA-CdTe, para luz de excitação à 400 nm. Os picos de fluorescência mostrados nessa figura dizem respeito a amostra com QD de 2,3 nm de diâmetro, (543 nm), e QD de 3,6 nm (617 nm), os dados para a construção do gráfico dessa figura foram obtidos no trabalho de doutoramento do prof. Dr. Rodolfo Santana (SANTANA, 2014).

Depois do primeiro ensaio, feito em 13 de janeiro de 2016, as seis amostras foram armazenadas sob refrigeração por 49 dias e novamente colocadas no Spectratomus-UVIS para uma nova caracterização. Percebeu-se, por comparação fotográfica (Figuras 82a e 82b), que uma pequena porção das amostras envelhecidas (parte superior) evaporou ou foi consumida durante o armazenamento na geladeira. Além disso, as amostras envelhecidas apresentaram bolhas internas, inexistentes nas amostras recém preparadas.

Nos ensaios com o Spectratomus-UVIS optou-se por excitar a fluorescência dos QDs usando um LED de 381 ± 19 nm, ver Figura 84, comprimento de onda que provê maior intensidade de emissão fluorescente, se comparado com outros comprimentos, também

testados, 355, 360, 390 e 400 nm. Aplicando um procedimento análogo, ao discutido na seção 4.1, o tempo de integração nesta campanha de caracterização foi fixado em 200 ms, a corrente do LED foi de 10,32 mA e 0,5 mm de deslocamento em Z.

Figura 84 – Espectro de emissão do LED utilizado no experimento de caracterização de pontos quânticos.



4.2.1 Resultados

Ao final do ensaio, um conjunto de espectrotopografias foi gerado a partir da varredura de cada amostra. Aos pontos experimentais, durante a pós-análise dos dados, foi aplicado um filtro de média móvel, com a intenção de suavizar os espectros obtidos, tornando-os mais bem definidos, pela minimização das flutuações estatísticas e do ruído térmico. Para isso foi utilizada a função *smooth*, no ajuste padrão de 5 pontos vizinhos do software Matlab, versão R2014a, da empresa The MathWorks, Inc.

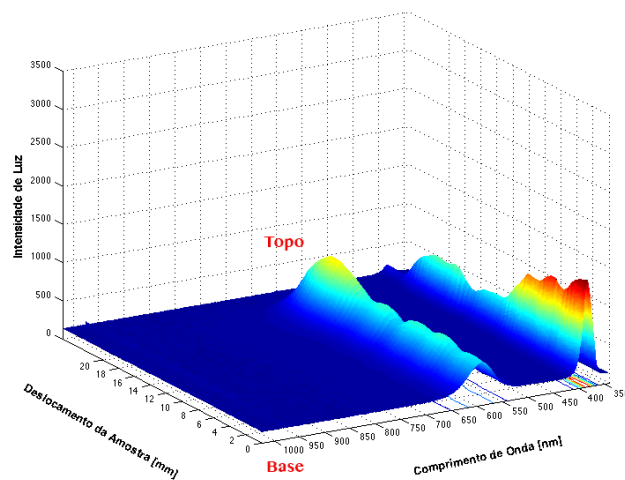
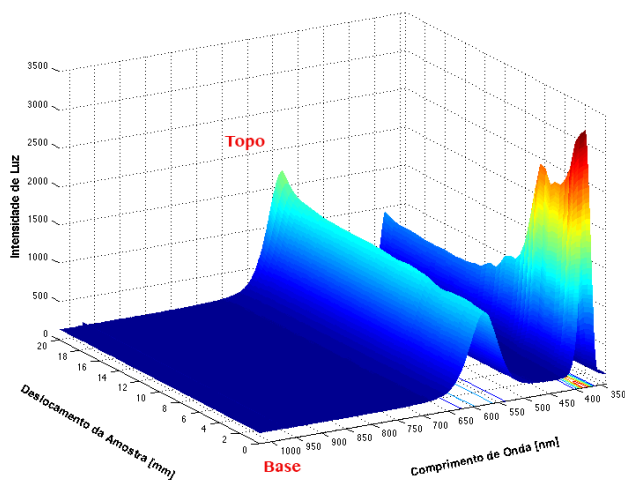
Nas Figuras 85, 86, 87, 88 e 89 podem ser vistas as espectrotopografias de fluorescência das amostras de pontos quânticos condensados em gelatina. Estas amostras foram nomeadas QD1 e QD2, amostras com pontos quânticos de 2,3 nm de diâmetro; QD3 e QD4, amostras com pontos quânticos com diâmetro de 3,6 nm, e a amostra QD5 e QD6, produzida pela mistura dos dois tipos de pontos quânticos estudados. A amostra QD6 foi descartada posteriormente por conta de manipulação inadequada. Do lado esquerdo (a) podem ser vistas as amostras no dia da primeira caracterização usando o Spectratomus-UVIS e a direita (b) as amostras envelhecidas de 49 dias.

Vale ressaltar que os parâmetros configuráveis no Spectratomus-UVIS, tempo de integração e corrente no LED, foram mantidos os mesmos nos dois ensaios.

Figura 85 – Espectrotopografia de fluorescência da amostra QD1

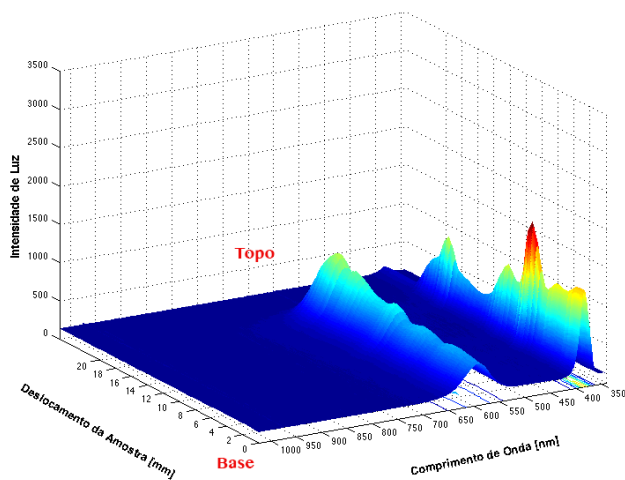
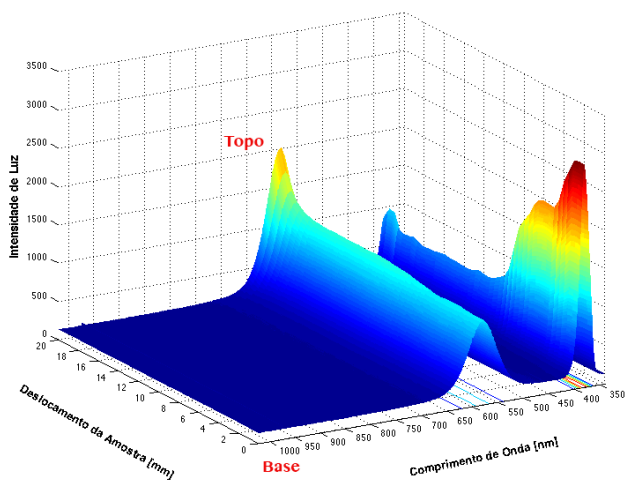
(a) Amostra QD1 - Nova

(b) Amostra QD1 - Envelhecida

**Figura 86** – Espectrotopografia de fluorescência da amostra QD2

(a) Amostra QD2 - Nova

(b) Amostra QD2 - Envelhecida

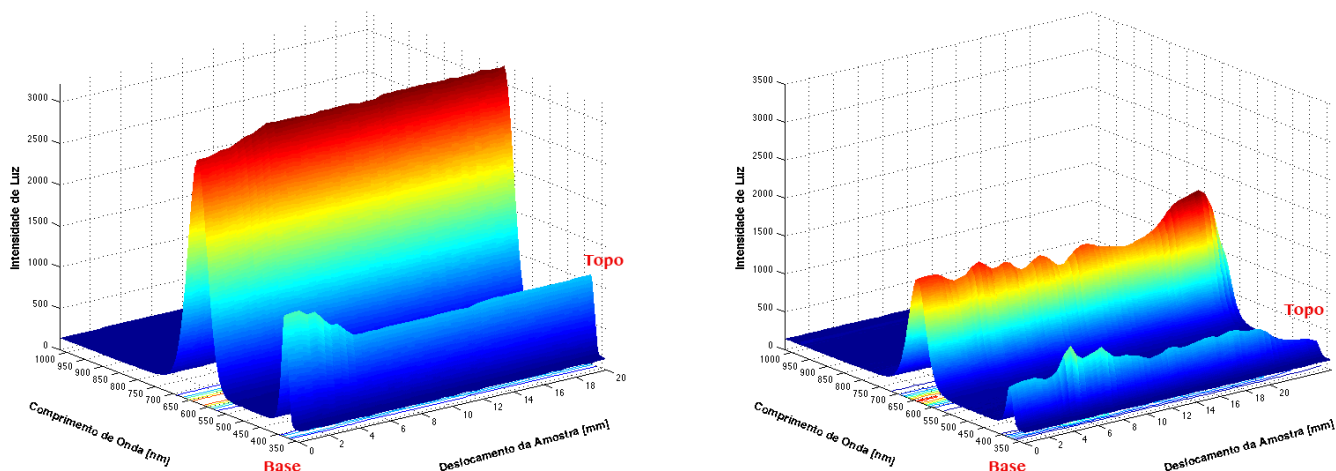


É observado nas Figuras 85a e 86a que a intensidade da luz de fluorescência na base da cubeta é menor que no topo da mesma. Isto leva a concluir que, como esperado, os QDs são sintetizados como uma população, formada por nanopartículas com diâmetro que variam em uma faixa, centradas no diâmetro médio assumido como o diâmetro da população. Sendo assim, na cubeta as diferentes nanopartículas, de diferentes diâmetros e densidade, se distribuem de modo que os QDs de maior diâmetro ficam na parte superior (menor densidade), enquanto os QDs de menor diâmetro ficaram na parte inferior. Como pontos quânticos de maior diâmetro tendem a emitir maior quantidade de luz (MURRAY; NORRIS; BAWENDI, 1993), com comprimento de onda longo, isso explicaria o observado. Na amostra QD2, Figura 86a, essa diferença chega a ser quase o dobro.

Figura 87 – Espectrotopografia de fluorescência da amostra QD3

(a) Amostra QD3 - Nova

(b) Amostra QD3 - Envelhecida

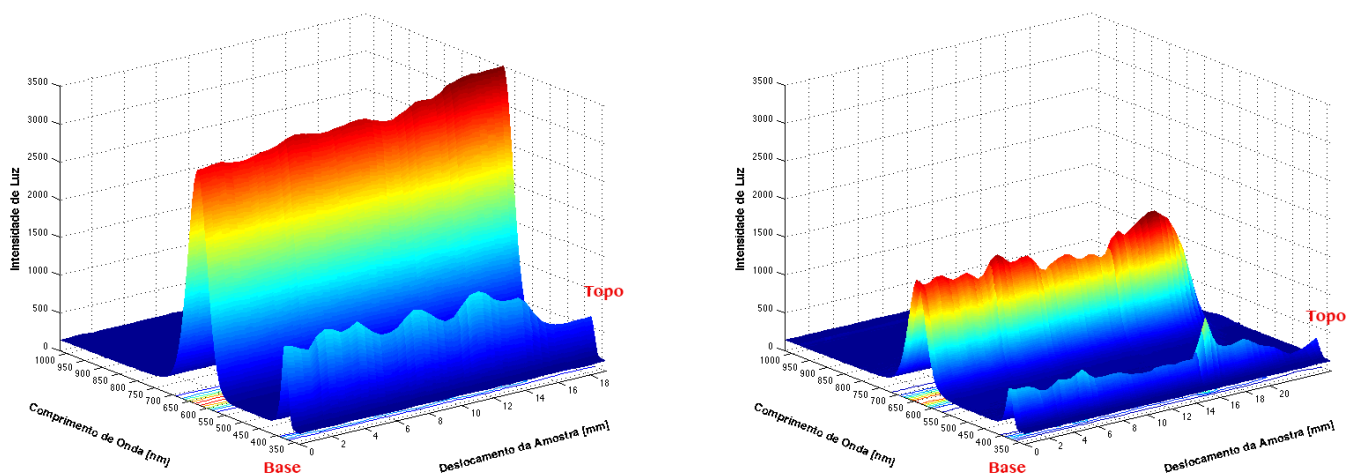


Nas amostras QD3 e QD4, formada por pontos quânticos de 3,6nm de diâmetro, Figuras 87a e 88a, observa-se o mesmo comportamento descrito anteriormente. Comparando os resultados, pode-se dizer que a QD3, Figura 87a, é mais homogênea do que a QD4, Figura 88a, uma vez que a espectrotopografia de fluorescência é mais constante ao longo da amostra. Em outras palavras, muito provavelmente, a população de nanopartículas na amostra QD3 é mais homogênea, no que diz respeito ao diâmetro das partículas sintetizadas e em sua distribuição espacial.

Figura 88 – Espectrotopografia de fluorescência da amostra QD4

(a) Amostra QD4 - Nova

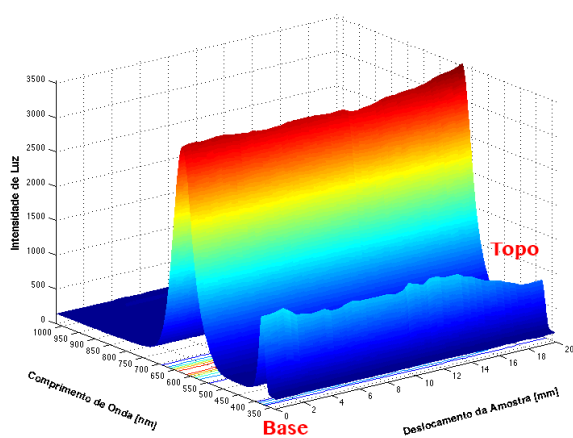
(b) Amostra QD4 - Envelhecida



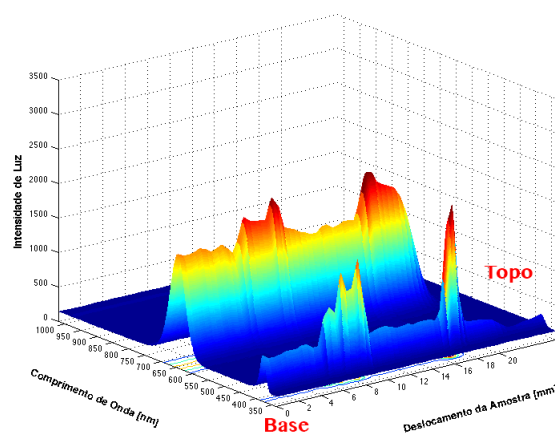
A Figura 89 mostra a fluorescência em função da posição para a amostra QD5, formada pela mistura dos QDs de 2,3 e 3,6 nm de diâmetro. De maneira esperada, tem-se o mesmo comportamento que no caso das amostras produzidas com QDs individuais, Figura 89a. Como pode ser visto na Figura 89b, a amostra QD5 envelhecida apresenta maior variação ao longo do comprimento, quando comparada com as outras amostras também envelhecidas.

Figura 89 – Espectrotopografia de fluorescência da amostra QD5

(a) Amostra QD5 - Nova



(b) Amostra QD5 - Envelhecida



Confirma-se também que toda vez que a amostra absorve mais luz de excitação, obtêm-se maior emissão de luz de fluorescência. Ambos os fenômenos estão diretamente relacionados com a concentração dos QDs, independentemente de seu tamanho, seja ele 2,3 nm, 3,6 nm ou a mistura deles.

O processo de solidificação de gelatina não acontece de maneira uniforme. Assim, uma porção dos QDs fica em suspensão, enquanto a outra parte vai solidificando de forma gradativa. De maneira geral, o topo da gelatina leva mais tempo para se solidificar do que sua base. Além disso, o processo de síntese dos QDs cria uma população de nanopartículas que obedece a distribuição gaussiana de diâmetros, o que indiretamente tem relação com a emissão da luz de fluorescência. Um exemplo disso são os pontos quânticos com diâmetro de 2,3 nm, relatados por Lees e al., que emitem em 543 nm, com sua largura a meia altura de 20 nm (LEES et al., 2008).

Esses fatores, a forma como a gelatina se solidifica, a densidade dos pontos quânticos e a concentração da sua população, favorecem a migração dos QDs de menores diâmetros, mais densos, que se depositam na base da cubeta, enquanto os pontos quânticos com diâmetros maiores, mais leves, ficam no topo. Essa separação já era esperada, porém

pelo uso da técnica convencional de fluorescência não havia meios de determiná-la. Tal informação é importante para que a síntese de futuras amostras condensadas em gelatina, possa ser mais homogênea, ou mais próxima do resultado obtido na produção da amostra QD3.

As amostras uma vez envelhecidas, muito provavelmente, além da oxidação esperada, também foram atacadas por alguma forma de microorganismos, mesmo refrigeradas, fato comprovado pelo aparecimento de bolhas de gás no interior da amostra. A interação desses microorganismos com a gelatina e o MPA-CdTe mostra que em alguns pontos foram mais afetados do que em outras partes da amostra (OMOGO; ALDANA; HEYES, 2013; HEZINOVÁ et al., 2009).

Além disso, como pode ser visualizado nas Figuras 85b, 86b, 87b, 88b e 89b, as amostras apresentam perda da capacidade de emissão de fluorescência, uma vez que essa capacidade está relacionada com o ligante de superfície (LS), que protege os QDs do meio em que se encontram (VALE et al., 2015).

As amostras produzidas sofreram oxidação e, muito provavelmente, a ação de microorganismos, estes podem ter alterado as propriedades do LS, diminuindo a capacidade de fluorescência das amostras com o passar dos dias, num processo de supressão (*quenching*), dos fluoróforos ali existentes (LEE et al., 2012). Além disso, o envelhecimento do próprio ponto quântico favorece a perda da sua capacidade de emissão de luz (LÓPEZ; VÁZQUEZ; GÓMEZ, 2013). Neste caso, atribui-se esta perda à supressão dinâmica, (*collisional quenching*), onde o contato com átomos ou moléculas presentes no meio químico facilita a transição dos elétrons do estado excitado para o estado fundamental, sem que haja emissão de fótons. Esta supressão da fluorescência pode ocorrer em meios orgânicos e inorgânicos como as amostras investigadas neste trabalho (LAKOWICZ, 2007).

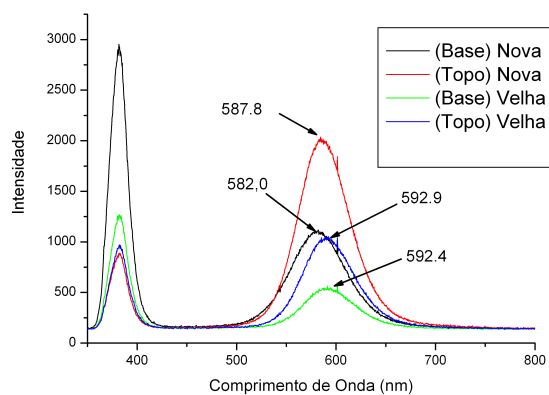
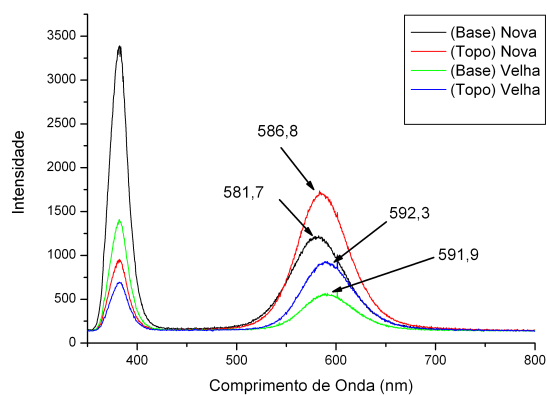
Nas Figuras 90, 91 e 93a estão apresentados os espectros de fluorescência da base e do topo das amostras testadas, caracterizadas no primeiro dia de ensaio e depois de envelhecidas, formando um conjunto de 4 espectros de fluorescência para cada amostra. As curvas foram geradas a partir dos dados coletados, sem nenhum tratamento matemático, no intervalo de interesse que se estende de 350 a 800 nm.

Nas Figuras 90a e 90b, com QD de 2,3 nm de diâmetro, podem ser observados picos de fluorescência centrados em $\lambda = 584,5 \pm 0,3$ nm, para as amostras caracterizadas logo depois da síntese. Essa informação confirma que na parte superior das amostras (curva vermelha) os pontos quânticos têm o mesmo diâmetro, mesmo que com populações

Figura 90 – Espectro de fluorescência na base e no topo das amostras com QD=2,3nm

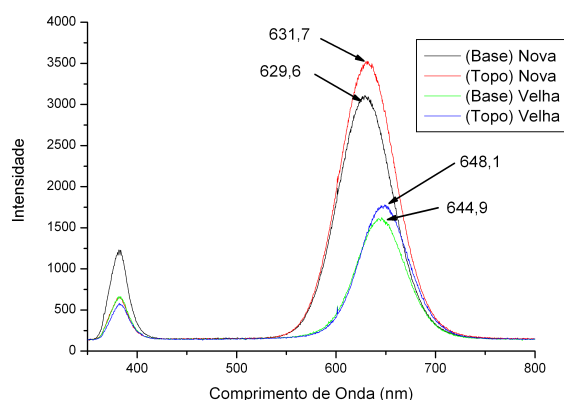
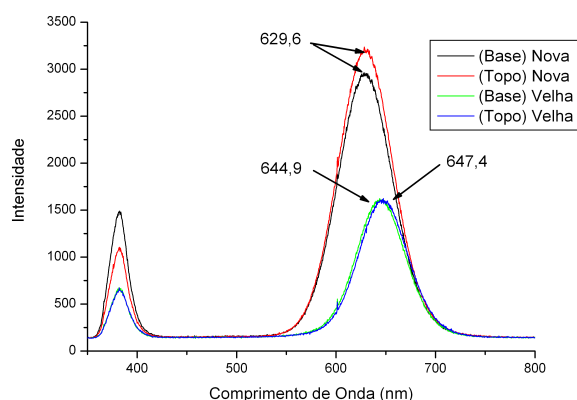
(a) Amostra QD1

(b) Amostra QD2

**Figura 91** – Espectro de fluorescência na base e no topo das amostras com QD=3,6nm

(a) Amostra QD3

(b) Amostra QD4



ligeiramente diferentes. Observando a parte inferior das amostras (curva preta), pode-se afirmar que na amostra QD1 os pontos quânticos presentes têm diâmetro ligeiramente menor, que na amostra QD2. As nanopartículas presentes em QD1 emitem em $\lambda = 579,6 \pm 0,3$ nm, enquanto que em QD2, nessa posição da amostra, a emissão é em $\lambda = 581,0 \pm 0,3$ nm.

Passados os 49 dias (curvas verdes e azuis), a população de pontos quânticos, ainda ativos, possuem o mesmo diâmetro, uma vez que o comprimento de onda emitido está centrado em ($\lambda = 591,2 \pm 0,3$ nm). Apesar disso, as concentrações dessas populações são diferentes, fato confirmado pela diferença nas intensidades de emissão da luz de fluorescência.

Nas Figuras 91a e 91b, fica evidente que a diferença do tamanho médio do QD na amostra QD3 praticamente não existe, uma vez que não há diferença no comprimento de onda de emissão, tanto na base, quanto no topo da amostra ainda nova, o comprimento de onda central é de $\lambda = 629,6$ nm.

Para a amostra QD4 é observada uma diferença de $2,4 \pm 0,3$ nm entre os picos de fluorescência na base e no topo da amostra recém produzida. Isso é um indício forte de que os tamanhos dos QD presentes nestas posições da amostra são ligeiramente diferentes. Quando envelhecidos os pontos quânticos de QD3 (curvas verde e azul) apresentam a mesma intensidade de emissão de luz, isso leva a acreditar que a concentração de fluoróforo é a mesma para estas posições, apesar do fato de que os tamanhos de QD ainda ativos são diferentes. Já na amostra QD4, existe uma diferença tanto na concentração dos QDs ativos, quanto no que diz respeito ao tamanho dos mesmos.

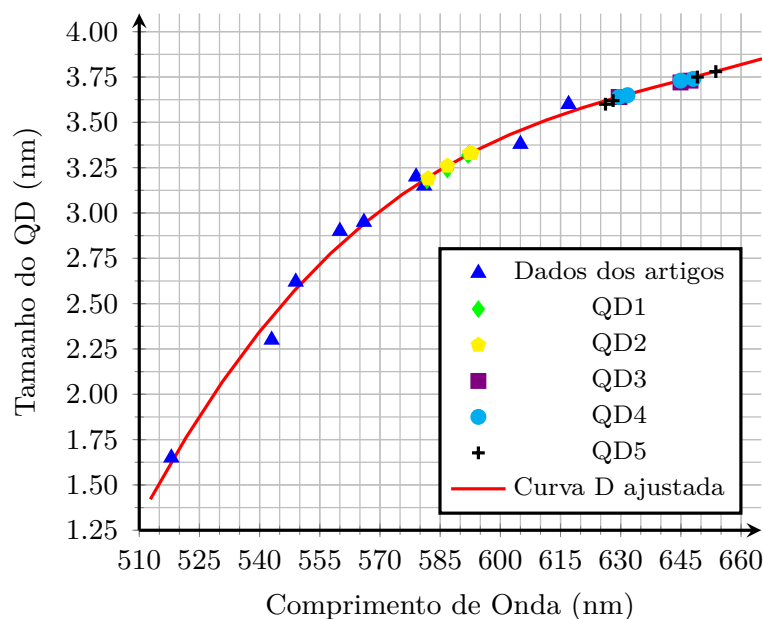
A partir de experimentos com alto grau de controle os autores YU et al. desenvolveram uma fórmula capaz de determinar o diâmetro do ponto quântico em função do comprimento de onda do primeiro pico de absorção excitônica (YU et al., 2003). É importante ressaltar que essa equação, capaz de estimar o diâmetro dos pontos quânticos, não foi desenvolvida para tratar a informação obtida pelos espectros de fluorescência.

Confrontado com essa limitação da literatura, passou-se a buscar uma alternativa para a determinação do diâmetro do QD, em função do pico da emissão de fluorescência. Neste sentido, com base nos comprimentos de onda dos picos de emissão dos espectros de fluorescência, para pontos quânticos de diferentes diâmetros, acondicionados em MPA-CdTe, relatados na literatura por diferentes autores, foi montado o gráfico que aparece na Figura 92. Do ajuste dos pontos compilados por um polinômio de terceira ordem, assim como no trabalho de Yu et al. (2003), foi obtida uma expressão *ad-hoc*, em primeira aproximação, para estimar os diâmetros dos pontos quânticos caracterizados neste trabalho de tese, Equação 4.2 (RODRIGUES et al., 2014; LIMA, 2014; LÓPEZ; VÁZQUEZ; GÓMEZ, 2013; SANTANA, 2014; BARBOSA et al., 2014).

$$D = (12, 2 \pm 6, 5) \cdot 10^{-7} \cdot \lambda^3 - (2, 1 \pm 1, 3) \cdot 10^{-3} \cdot \lambda^2 + (1, 2 \pm 0, 8) \cdot \lambda - (220, 4 \pm 174, 8) \quad (4.2)$$

Com base nos dados da Tabela 6 pode-se afirmar que os QDs com diâmetro de 3,6 nm (amostras QD3 e QD4) apresentam fluorescência no comprimento de onda esperado (629 ± 2 nm*), valor compatível com o obtido pelo Dr. Santana em sua Tese (617 ± 8 nm) [o desvio desta grandeza foi obtido por interpolação gráfica 95% do máximo de emissão]

* desvio determinado por consistência externa

Figura 92 – Curva D de aproximação de ordem 3 para o dimensionamento do tamanho do QD em função do λ de fluorescência para MPA-CdTe e os dados dos artigos utilizados.**Tabela 6** – Diâmetros dos QD em função da luz de fluorescência para as amostras de MPA-CdTe pela curva de aproximação D.

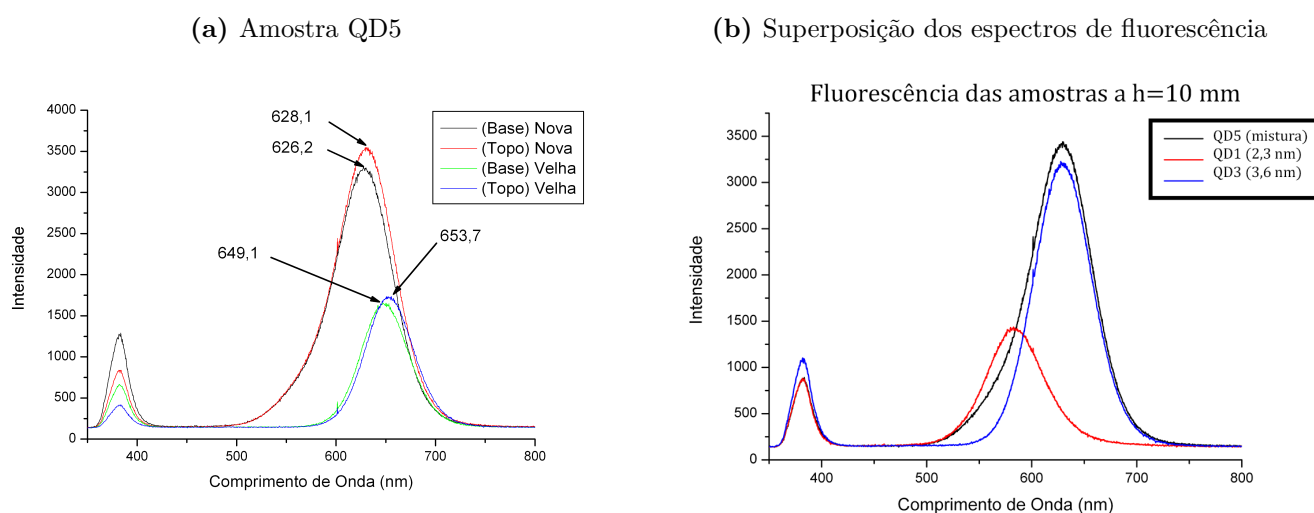
Amostra	Tempo	Posição	Centro de Fluorescência	Diâmetro Calculado
QD1	Nova	Base	581,7 ± 0,1 nm	3,18 ± 0,01 nm
		Topo	586,8 ± 0,2 nm	3,24 ± 0,01 nm
	Velha	Base	591,9 ± 0,3 nm	3,32 ± 0,01 nm
		Topo	592,3 ± 0,1 nm	3,33 ± 0,01 nm
QD2	Nova	Base	582,0 ± 0,1 nm	3,19 ± 0,01 nm
		Topo	587,8 ± 0,2 nm	3,26 ± 0,01 nm
	Velha	Base	592,4 ± 0,5 nm	3,33 ± 0,01 nm
		Topo	592,9 ± 0,1 nm	3,33 ± 0,01 nm
QD3	Nova	Base	629,5 ± 0,2 nm	3,64 ± 0,01 nm
		Topo	629,7 ± 0,1 nm	3,64 ± 0,01 nm
	Velha	Base	644,9 ± 0,2 nm	3,72 ± 0,01 nm
		Topo	647,4 ± 0,2 nm	3,73 ± 0,01 nm
QD4	Nova	Base	629,6 ± 0,2 nm	3,64 ± 0,01 nm
		Topo	631,7 ± 0,1 nm	3,65 ± 0,01 nm
	Velha	Base	644,9 ± 0,2 nm	3,73 ± 0,01 nm
		Topo	648,1 ± 0,1 nm	3,74 ± 0,01 nm
QD5	Nova	Base	626,2 ± 0,2 nm	3,60 ± 0,01 nm
		Topo	628,1 ± 0,1 nm	3,62 ± 0,01 nm
	Velha	Base	649,1 ± 0,2 nm	3,75 ± 0,01 nm
		Topo	653,7 ± 0,1 nm	3,78 ± 0,01 nm

(SANTANA, 2014). Já os QDs de 2,3 nm, amostras QD1 e QD2, com emissão média em (582 ± 3 nm), não apresentaram fluorescência no comprimento de onda esperado (543 ± 7 nm) (SANTANA, 2014), sinalizando um possível problema em sua preparação. Além disso, o envelhecimento parece alterar ainda mais o valor do comprimento de onda de emissão

dos QDs ativos das amostras com 2,3 nm de diâmetro, que alcançam (592 ± 1 nm) em média. Emissão 10 nm acima da observada para as amostras recém sintetizadas, apesar de mais bem agrupada em torno do valor central (± 1 nm), pode significar um efeito de relaxação do ponto quântico após sua síntese.

Vale ressaltar que o método gráfico para determinar indiretamente o tamanho do QD, proposto neste trabalho, precisa ser refinado a partir de uma quantidade maior de dados, isso para se tornar mais exato e ganhe maior precisão, passando a representar um método seguro de determinação do diâmetro de QD, como o método proposto por (YU et al., 2003).

Figura 93 – Espectros de fluorescência, (a), no início e no fim da amostra QD5 e (b), a superposição dos espectros de fluorescência das amostras QD1, QD3 e QD5 todos na altura de 1,8 mm da cubeta (b)



Na Figura 93a são apresentadas as curvas de emissão da amostra QD5, vale lembrar que esta é uma amostra composta pela mistura dos dois QDs sintetizados, a curva observada tem forma de sino. Os picos centrais de fluorescência, na posição da base e no topo da amostra recém preparada são representados pelas curvas preta e vermelha. Destas curvas se apreende que existe uma pequena discrepância entre os diâmetros médios da mistura das populações de QD, uma vez que a diferença entre os picos é de $2,0 \pm 0,3$ nm. A intensidade da luz emitida também apresenta pequena variação, quando comparada com as amostras QD1 e QD2. Assim, é possível afirmar que a amostra QD5 apresenta boa uniformidade, se comparada às amostras QD3 e QD4 e a sua espectrotopógrafia corrobora com essa hipótese, ver Figura 89a. Quando a amostra QD5 envelhece passa a apresentar um valor central de emissão de 651 ± 2 nm, que é um valor bem próximo aos valores apresentados pelas amostras envelhecidas com diâmetro de 3,6 nm (QD3 = 646 ± 1 nm e QD4 = 647 ± 2 nm), comprovando que a população com maior diâmetro se mantém ativa

por mais tempo. De certa maneira, é possível especular que essas amostras sofreram um processo de relaxação da geometria dos QD.

A Figura 93b ilustra os espectros individuais das amostras QD1, QD3 e QD5, medidos na altura de 18 mm. Comparando a curva de emissão da amostra QD5 (preta) com as curvas dos pontos quânticos de diâmetros fixos QD1 e Q3 (curvas azul e vermelha), percebe-se que a curva de fluorescência de QD5 possui uma base mais larga, como esperado, uma vez que essa amostra é uma mistura de pontos quânticos de dois diâmetros. Além disso, a amostra QD5 apresenta uma maior intensidade de luz emitida se comparada com a amostra QD3, que só possui uma determinada população de QD.

A perda na intensidade de emissão, bem como, o deslocamento no comprimento de onda de fluorescência das amostras envelhecidas podem ser justificadas pelo processo conhecido como supressão de fluorescência (*quenching of fluorescence*) uma vez que os QDs de menor diâmetro têm certa probabilidade de se dêsexcitarem sem a emissão de fótons (VALE et al., 2015; OMOGO; ALDANA; HEYES, 2013; LAKOWICZ, 2007). Amostras envelhecidas muito provavelmente sofreram oxidação, uma maior abundância de oxigênio, que tem características diamagnéticas, aumentam a probabilidade de dêsexcitação não radiante (LEE et al., 2012; HEZINOVÁ et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Outra linha de análise possível passa pela observação do perfil de distribuição do comprimento de onda do máximo de fluorescência em função da posição de medição. Nas Figuras 94 e 95 são mostrados os resultados para as amostras QD1, QD2, QD3 e QD4. As curvas em vermelho nessas figuras, mais lisa e bem comportada, foram obtidas pelo cálculo da média ascendente dos 15 valores próximos ao ponto de interesse.

Figura 94 – Pontos de máximos de fluorescência ao longo das amostras de pontos quânticos com diâmetro de 2,3 nm

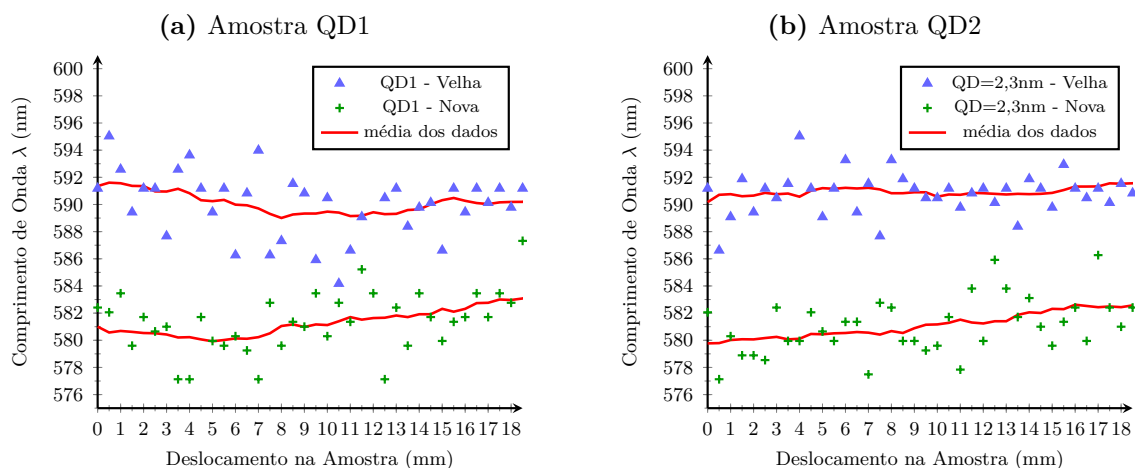
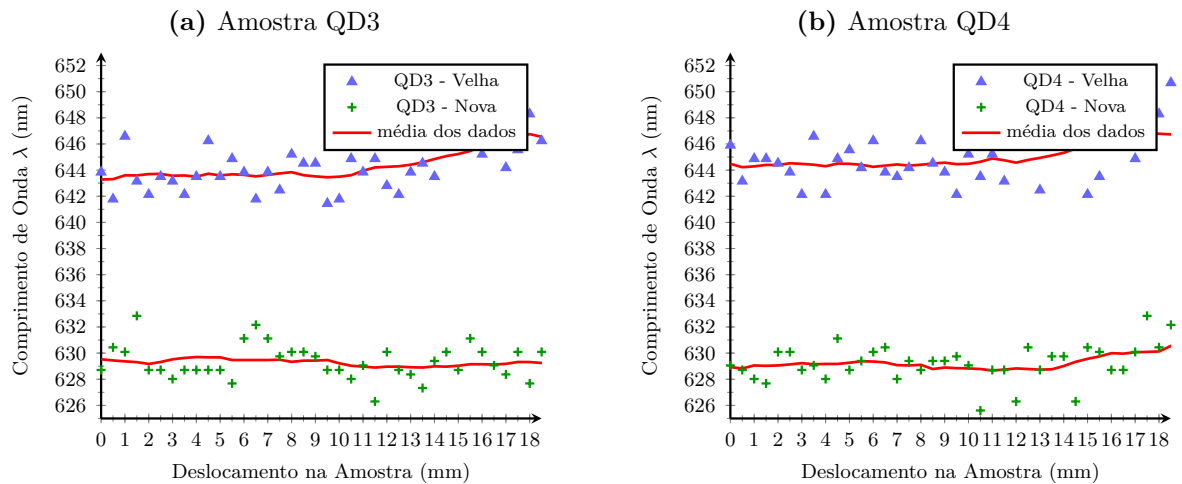


Figura 95 – Pontos de máximos da fluorescência ao longo das amostras de pontos quânticos com diâmetro de 3,6 nm

Nos gráficos da Figura 94, ambas as amostras QD1 e QD2, apresentam perfil com tendência ascendente, para as amostras recém produzidas. Para a amostra QD1 envelhecida esta tendência desaparece ou torna-se incerta. Entretanto, para QD2 a tendência ascendente se mantém para a amostra mesmo envelhecida. Nos gráficos da Figura 95 as amostras QD3 e QD4, quando são novas, apresentam curvas de tendência paralelas ao eixo das abscissas e quando envelhecem passam a ter uma tendência ascendente.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um equipamento analítico para caracterização de substâncias, por espectrofluorimetria, capaz de resolver espacialmente a amostra, mapeando a fluorescência de sua superfície. O mapa em três dimensões, obtido a partir do tratamento dos espectros de fluorescência, aferidos ponto a ponto, foi o resultado de um novo método de análise ótica, nomeado espectrotopógrafia de fluorescência. Atualmente, no mercado, não existe nenhum espectrofluorímetro capaz de fazer este tipo de medição, nem mesmo, algo correlato, o que deu lugar ao pedido de patente do equipamento desenvolvido.

O protótipo de engenharia projetado, desenvolvido e testado, apresentado nesta monografia, tem capacidade de detectar, adquirir, armazenar e analisar 5074 espectros de fluorescência ao longo de uma amostra, com comprimento máximo de $3172 \pm 6 \mu m$, ou, 5074 ± 1 passos de motor, na direção do eixo Z (altura) e $360,0^\circ \pm 0,9^\circ$ em torno do eixo azimutal θ .

O espectrotopógrafo de fluorescência foi munido de um porta-amostra capaz de receber cubetas de 4,5 mL e lâminas de microscópio para suporte dos materiais a serem caracterizados. LEDs e lâmpadas halógenas podem ser utilizados como fonte de luz de excitação da luminescência. Para controle da intensidade da luz do LED, uma fonte de corrente digital foi desenvolvida com 16 níveis de corrente, com resolução de $\pm 0,7$ mA/contagem, até um valor máximo de 10,3 mA. A fonte apresenta um zona morta de 3 níveis iniciais, partindo de um valor fixo de 2,78 mA. O porta-LED desenvolvido permite a troca do LED sem a necessidade de solda, preservando as pastilhas do super aquecimento e, por conseguinte, suas características de emissão.

Para preservar a lâmpada halógena, energizada por um fonte de tensão fixa de 1,4V, foi desenvolvido um sistema de temporização, que a mantém ligada por 15 s, controlado pelo microcontrolador que confere inteligência ao protótipo.

O sistema de detecção de fluorescência foi equipado com um espectrômetro dispersivo, com detecção por CCD de 2048 pontos, munido de uma fenda de entrada $5 \mu m$, uma rede de difração com resolução espectral de 0,3 nm, capaz de analisar luz entre 350 a 1050 nm. O tempo de integração da luz de fluorescência pode ser ajustado entre 1 ms a 65 s. A fibra ótica, que capta a luz de fluorescência emitida pela amostra, tem abertura de $100 \mu m$, coletando fótons em uma área de $0,786 mm^2$.

Para validar o equipamento, que se destina à caracterização de amostras não homogêneas, foram preparados dois experimentos. No primeiro, a amostra usada é um paralelogramo sólido de epóxi dopado com Saramanil (40 %), no qual foi introduzido artificialmente um defeito opaco. O defeito no caminho ótico foi criado pela pintura de uma faixa preta na superfície da amostra de epóxi e permitiu comprovar a precisão e exatidão do equipamento, utilizado para determinar o local e a extensão do defeito. Como resultado desse ensaio, o Spectratomus-UVIS foi capaz de determinar a posição do defeito com erro relativo de 11 % usando como observável a supressão da luz de excitação, enquanto que na determinação da largura da amostra o erro foi de 5 %. Observando a luz de fluorescência, os valores obtidos para a posição e a largura do defeito têm desvio relativo de 19 % e 39 %, respectivamente. Combinando os resultados obtidos para as duas técnicas, observação da supressão da luz de excitação e a intensidade da luz de fluorescência, o defeito foi localizado $15,4 \pm 0,2$ mm acima da base da amostra e se estende até $20,7 \pm 0,2$ mm, com uma largura de $5,3 \pm 0,2$ mm. Ou seja, um erro médio de 11 % para a posição do defeito e de 5 % para a sua largura. Em virtude dos resultados aqui apresentados pode-se dizer que o Spectratomus-UVIS resolve com relativa exatidão a posição e a extensão de um defeito ótico.

No segundo experimento, uma série de espectrotopógrafias de fluorescência foram geradas a partir de um conjunto de 5 amostras de pontos quânticos (QD1, QD2, QD3, QD4 e QD5) e o desenvolvimento de uma série de técnicas de análise de dados se fizeram necessárias. Com base nas espectrotopógrafias das amostras comprovou-se que a fluorescência ao longo do eixo Z variou. Assim, cabe supor que houve uma migração dos QDs enquanto a amostra era resfriada, apesar de todas as amostras terem sido sintetizadas ao mesmo tempo.

O envelhecimento das amostras foi evidenciado pelo Spectratomus-UVIS, o perfil de emissão de fluorescência ao longo delas foi modificado. A comparação das espectrotopógrafias antes e depois do envelhecimento (49 dias) não deixa dúvida.

Extraindo as curvas de fluorescência na base e no topo da amostra pode-se verificar que existiu um deslocamento na distribuição dos QDs durante a solidificação da gelatina. Os pontos quânticos com diâmetros menores, e, portanto, maior densidade ficaram mais concentrados na base, enquanto os menos densos, ou de maior diâmetro, ficaram acumulados no topo das amostras. Além disso, as amostras QD1 e QD2 quando envelhecidas, apresentaram uma emissão média deslocada de 10 ± 1 nm, acima do valor observado nas amostras recém-sintetizadas. Já nas amostras QD3 e QD4 o valor médio do desvio foi de 16 ± 3 nm, mesmo tendo estas amostras apresentado uma espectrotopógrafia de fluorescência mais uniforme quando novas.

Para estimar os diâmetros dos pontos quânticos a partir da fluorescência das amostras ensaiadas foi estabelecida uma curva com base em resultados reportados na literatura. Assim, as amostras QD1 e QD2 com diâmetro de 2,3 nm, que deveriam apresentar fluorescência em 543 ± 7 nm, na caracterização feita com o Spectratomus-UVIS apresentaram valor médio de 582 ± 3 nm. Utilizando a curva de interpolação, proposta neste trabalho, estimou-se um diâmetro de $3,2 \pm 0,1$ nm. As amostras QD3 e QD4, assumidas com diâmetro de 3,6 nm, deveriam emitir em 617 ± 8 nm, o valor médio encontrado para estas amostras foi de 630 ± 2 nm, ou um diâmetro de 3,65 nm, compatível, a menos de um desvio absoluto, com resultados de outros autores, corroborando com a validação do experimento submetido ao Spectratomus-UVIS.

Outra linha de análise explorada foi a observação do perfil de distribuição do comprimento de onda do máximo de fluorescência em função da posição de medida, o que permite visualizar o comportamento da fluorescência máxima ao longo da amostra.

Novos modos de investigação de amostras fluorescentes extensas foram aqui apresentados, indo muito além da informação posta à disposição do usuário por um espectrômetro de fluorescência convencional. A saber: (i) espectrotopógrafia de absorção e fluorescência, (ii) determinação do perfil da luz de excitação, ou da fluorescência, ou da absorção ao longo da amostra a partir das espectrotopógrafias, (iii) superposição dos resultados de diferentes espectros (fluorescência/absorção) e comparação dos resultados em diferentes posições de sua geometria, (iv) análise da tendência da fluorescência, (v) análise da migração e distribuição de fluoróforos em uma amostra, (vi) determinação com boa precisão de defeitos na superfície das amostras e (vii) determinação da posição específica de defeitos ou propriedade da superfície de amostras fluorescentes. Estima-se que um equipamento como este, seja comercializado num valor próximo U\$20.000,00.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

Apesar de se tratar de um protótipo de engenharia e ter um tamanho relativamente padrão para um equipamento de análise em laboratório, é possível se pensar em reduzir o seu tamanho e principalmente, simplificar o acesso a sua parte interna para manutenções.

Como idealizado, existe a possibilidade do acionamento de 4 motores de passo, hoje só são utilizados dois, fica a possibilidade de ser acrescentada a movimentação no eixos X e Y para o suporte da fibra. Movimentar o eixo X permitirá fazer uma investigação do comportamento da absorção e da fluorescência ao longo da amostra para uma altura (Z) fixa, criando outras possibilidades de análise para caracterização de amostras.

Já o deslocamento no eixo Y ajudará no ajuste da distância entre a amostra e a ponta da fibra. Esse ajuste está diretamente relacionado com área de coleta da luz, o que determina o ponto focal, diminuindo a perda de intensidade da luz de excitação no ar. A motorização do deslocamento em Y permitirá maior repetibilidade nos experimentos onde se faz necessário ajustar a distância fibra-amostra, melhorando a capacidade de análise do equipamento atual.

O Spectratomus-UVIS permite a iluminação pela base do porta amostra, esta variante ainda não foi implementada no firmware do protótipo, o que determinará um deslocamento azimutal restrito a uma única volta (360°).

Uma futura remodelagem no layout da mesa do sistema de posicionamento dos suportes do porta-LED e da fibra ótica pode ser executado em uma máquina de corte a laser, com grande precisão. Uma vez que estas peças foram realizadas de forma artesanal, com certo grau de imperfeição.

Para resolver o problema de comunicação entre a IHM e o *firmware* embarcado são plausíveis duas soluções, (i) o desenvolvimento de uma nova interface IHM rodando em Linux, mas com capacidade para outras plataformas como MAC OS e talvez dispositivos móveis como *tablets*, (ii) escrever uma nova biblioteca e drivers novos para a plataforma Windows, hoje utilizada.

Futura migração para linguagem Python+Kivy o que permitirá um suporte gráfico sem um, necessário, ambiente gráfico. Além disso, essa modificação dispensa o uso de um computador pessoal (PC), que poderia ser substituído por uma placa RaspberryPi, um computador do tamanho de um cartão de crédito. No SO Linux o driver de comunicação serial é nativo e não tem restrições de atividade, como as experimentadas no Windows, isto permitiria ao sistema realizar aquisições por dias. Essa combinação de Python+Kivy+RaspberryPi já foi testada no LaPO em outro projeto e funcionou muito bem.

REFERÊNCIAS

- ABREU, K. et al. Metodologia para caracterização e validação de LED para aplicações em Química Analítica, fluorimetria e luz de excitação. In: *Simpósio Bras. Automação Intel.* [S.l.: s.n.], 2013.
- ADAMSSON, N. *Mechatronics engineering : New requirements on cross-functional integration Mechatronics engineering.* 1–61 p. Tese (Doutorado) — KTH Royal Institute of Technology, 2005.
- ALCIATORE, D. G.; HISTAND, M. B. *Introdução à Mecatrônica e aos Sistemas de Medições.* [S.l.]: AMGH Editora, 2014. ISBN 9788580553413.
- ALVES, J. C. L.; POPPI, R. J. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Anal. Chim. Acta*, v. 642, n. 1–2, p. 212–216, 2009. ISSN 0003-2670.
- ATKINS, P.; PAULA, J. de. *Atkins' Physical Chemistry.* Ninth edit. [S.l.]: OUP Oxford, 2010. ISBN 9780199583966.
- BAEYENS, W. R. G. *Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis.* [S.l.]: CRC Press, 1990. v. 12.
- BAH, M. S. et al. *Método para monitorar qualidade em processos de obtenção de combustíveis e dispositivo sensor para sua operação.* 2013.
- BARBALHO, S. C. M. *Modelo de referência para o desenvolvimento de produtos mecatrônicos : proposta e aplicações.* 1–275 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2006.
- BARBOSA, J. A. C. et al. A CdTe – MPA quantum dot fluorescence enhancement flow method for chlorhexidine determination. *Anal. Methods*, v. 6, p. 4240–4246, 2014.
- BOHREN, C.; HUFFMAN, D. *Absorption and scattering of light by small particles.* New York: [s.n.], 1988. 544 p. ISBN 978-0-471-29340-8.
- BOYLESTAD, R. L.; NASHELSKY, L. *Dispositivos eletrônicos e teoria de circuitos.* 8 edição. ed. [S.l.]: Pearson Education do Brasil, 2004. ISBN 9788587918222.
- BRADLEY, D. A. *Mechatronics: Electronics in Products and Processes.* [S.l.]: Chapman & Hall, 1993. ISBN 9780412582905.
- CARTER, B.; BROWN, T. R. *Handbook of operational amplifier applications.* [S.l.], 2001. 1–94 p.
- CORPORATION, S. *Folha de dados - 2048-pixel CCD Linear Sensor (B/W) for Single 5V Power Supply Bar-code Reader ILX511B.* [S.l.], 2008. 1–16 p.
- CUNDALL, R. B.; EVANS, G. B. A fully compensated versatile spectrofluorimeter. *J. Phys. E.*, v. 1, n. 3, p. 305, 1968.

- DASGUPTA, P. K. et al. Light emitting diode-based detectors. *Anal. Chim. Acta*, v. 500, n. 1-2, p. 337–364, dec 2003. ISSN 00032670.
- DELUCA, J. a. An introduction to luminescence in inorganic solids. *J. Chem. Educ.*, v. 57, n. 8, p. 541, 1980. ISSN 0021-9584.
- DOYLE, W. M. *Apparatus and method for normal incidence reflectance spectroscopy*. [S.l.]: Google Patents, 1991.
- EISINGER, J.; FLORES, J. Front-face fluorometry of liquid samples. *Anal. Biochem.*, v. 94, n. 1, p. 15–21, 1979. ISSN 0003-2697.
- ENGELSEN, S. B. Explorative spectrometric evaluations of frying oil deterioration. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 74, n. 12, p. 1495–1508, dec 1997. ISSN 0003-021X.
- FILARDI, V. L. et al. *Espectrotógrafo de Fluorescência UV-VIS para caracterização de substâncias e meios homogêneos ou não homogêneos*. 2013.
- FILARDI, V. L. et al. Espectrotomógrafo de fluorescência UV-VIS para caracterização de substâncias e meios não homogêneos. In: *XI Congr. Ibero-Americano Eng. Mecânica*. [S.l.: s.n.], 2013.
- FILARDI, V. L. et al. Anais do XIX Congresso Brasileiro de Automática, CBA 2012. ~. In: *XIX Congr. Bras. Automática*. [S.l.: s.n.], 2012. p. 1734–1741. ISBN 9788580010695.
- FORTES, P. R. et al. Cadmium telluride nanocrystals as luminescent sensitizers in flow analysis. *Talanta*, Elsevier B.V., v. 84, n. 5, p. 1314–1317, 2011. ISSN 0039-9140. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.041>>.
- GIANNIG46. *Reflexao*. 2010. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lambert2.gif>>.
- GILBERT, Y. et al. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. v. 2011, n. September, p. 692–699, 2011.
- GOLDBERG, P. G. *Luminescence of inorganic solids*. [S.l.]: Academic Press, 1966.
- GUILBAULT, G. et al. *Practical fluorescence: theory, methods, and techniques*. [S.l.: s.n.], 1973.
- GUILBAULT, G. G. Practical Fluorescence. Modern Monographs in Analytical Chemistry. *CRC Press*, p. 1–12, 1990.
- HAMAMATSU. *NMOS linear image sensor*. 2016. Disponível em: <<http://www.hamamatsu.com/eu/en/product/alpha/I/4005/4120/S3903-1024Q/index.html>>.
- HEZINOVÁ, V. et al. CDTE quantum dots—preparation, physico-chemical properties and application as fluorescent markers. *Z{á}pado{č}esk{á} univerzita v Plzni, Fakulta elektrotechnik{á}*, 2009.
- HOEK, a. van; VERVOORT, J.; VISSER, a. J. A subnanosecond resolving spectrofluorimeter for the analysis of protein fluorescence kinetics. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 7, n. 3, p. 243–54, 1983. ISSN 0165-022X.

- INSTRUMENTS, T. *Folha de Dados - SN74HC574 Octal edge triggered D-type Flip-flop with 3-state outputs*. [S.l.], 1997. 1–6 p.
- INSTRUMENTS, T. *Folha de Dados - LM78XX Series Voltage Regulators*. [S.l.], 2013.
- INSTRUMENTS, T. *Folha de Dados - LMx24-N , LM2902-N Low-Power , Quad-Operational Amplifiers*. [S.l.], 2015. 1–34 p.
- IRVING, H. M. N. H.; FREISER, H.; WEST, T. S. *Compendium of Analytical Nomenclature*. [S.l.]: Blackwell Scientific Publications, 1987.
- JENSEN, P.; CHRISTENSEN, J.; ENGELSEN, S. Oxidative changes in pork scratchings, peanuts, oatmeal and muesli viewed by fluorescence, near-infrared and infrared spectroscopy. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 219, n. 3, p. 294–304, jul 2004. ISSN 1438-2377.
- KARNOPP, D. C.; MARGOLIS, D. L.; ROSENBERG, R. C. *System Dynamics: Modeling and Simulation of Mechatronic Systems*. [S.l.: s.n.], 2000. x, 507 p. p. ISBN 0471333018 (alk. paper).
- KINGBRIGHT. *Application Notes For Through-Hole LEDs Application Notes For Through-Hole LEDs*. [S.l.], 2016. 1–8 p.
- LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 edição. ed. [S.l.]: Springer US, 2007. ISBN 9780387463124.
- LEE, W. et al. An effective oxidation approach for luminescence enhancement in CdS quantum dots by H₂O₂. *Nanoscale Res. Lett.*, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2012. ISSN 1556-276X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1556-276X-7-672>>.
- LEES, E. E. et al. Experimental Determination of Quantum Dot Size Distributions , Ligand Packing Densities , and Bioconjugation Using Analytical Experimental Determination of Quantum Dot Size Distributions , Ligand Packing Densities , and Bioconjugation Using Analytical Ult. *Am. Chem. Soc.*, v. 8, n. July 2016, p. 2883–2890, 2008.
- LI, J.; DASGUPTA, P. K. A simple instrument for ultraviolet-visible absorption spectrophotometry in high temperature molten salt media. *Rev. Sci. Instrum.*, v. 71, n. 6, p. 2283, 2000. ISSN 00346748.
- LIMA, M. B. de. *Determinação quimiluminescente de ferro em óleos baseado em pontos quânticos de CdTe usando um sistema fluxo-batelada com extração em fase única e imagens digitais*. Tese (Doutorado) — UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, 2014.
- LÓPEZ, I. A.; VÁZQUEZ, A.; GÓMEZ, I. Microwave assisted synthesis of CdS nanoparticles and their size evolution. *Rev. Mex. Física*, v. 59, n. April, p. 160–164, 2013.
- MARTINHO, J. M. G. Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. *Bol. da Soc. Port. Química*, v. 52, p. 44–46, 1994.
- Minebea Group. *Precision Step Motors Catalog*. [S.l.], 2012. 32 p.
- MURRAY, C. B.; NORRIS, D. J.; BAWENDI, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites. *J Am Chem Soc*, v. 115, n. 4, p. 8706–8715, 1993.

- NATHAN, A. *Windows Presentation Foundation Unleashed (WPF) (Unleashed)*. Indianapolis, IN, USA: Sams, 2006. ISBN 0672328917.
- National Semiconductor. *Folha de Dados - LM723 LM723C Voltage Regulator*. [S.l.], 1995.
- NETO, P. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Quim. Nova*, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.
- Ocean Optics. *Folha de Dados - USB2000+*. [S.l.], 2007. 1–38 p.
- Ocean Optics. *Folha de Dados - USB2000 + Fiber Optic Spectrometer Installation and Operation Manual*. [S.l.], 2010.
- OMOGO, B.; ALDANA, J. F.; HEYES, C. D. Radiative and Non-Radiative Lifetime Engineering of Quantum J Phys Chem C Nanomater Interfaces Dots in Multiple Solvents by Surface Atom Stoichiometry and Ligands. *Phys Chem C Nanomater Interfaces*, v. 7, n. 5, p. 2317–2327, 2013.
- PEPE, I. M.; QUINTELLA, C. M. *Sistema de aquisição, controle e posicionamento automatizado*. 2012.
- PEPE, I. M. et al. *Método para prever propriedades químicas e físico-químicas de óleos através de análise multivariada associada com espectrofluorimetria*. 2013.
- PINA, F. Espectrofluorimetria. *Bol. da Soc. Port. Química*, v. 54, p. 88–91, 1994.
- PINA, F.; BERNARDO, M. A.; GARCIA-ESPANA, E. Fluorescent chemosensors containing polyamine receptors. *Eur. J. Inorg. Chem.*, n. 10, p. 2143–2157, 2000. ISSN 1434-1948.
- RENDELL, D.; MOWTHORPE, D. J. *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*. [S.l.]: Published on behalf of ACOL, London by Wiley, 1987. (Analytical Chemistry by Open Learning). ISBN 9780471913801.
- REZENDE, S. M. *Materiais e Dispositivos Eletrônicos*. [S.l.]: Editora Livraria da Física, 2004. ISBN 9788588325272.
- RIBEIRO, R. M. R. et al. Espectrofluorimetria comparada à cromatografia líquida de alta eficiência na detecção de ocratoxina A em café. *Ciências Aliment.*, v. 29, p. 331–338, 2008.
- RODRIGUES, S. S. M. et al. Fluorescence enhancement of CdTe MPA-capped quantum dots by glutathione for hydrogen peroxide determination. *Talanta*, v. 122, p. 157–165, 2014.
- SAMPAIO, R. C. L.; CAMACHO, L. *Quantificação espectrofotométrica de glicerol em biodiesel*. 2006.
- SANTANA, R. M.; KORN, M.; SANTOS, J. C. C. Influência de processos antagônicos no desenvolvimento de sistema de análises em fluxo para a determinação espectrofotométrica de Propiltiouracil em medicamentos. *Quim. Nova*, v. 36, n. 1, p. 91–96, 2013.
- SANTANA, R. M. et al. Enhancing reactive species generation upon photo-activation of CdTe quantum dots for the chemiluminometric determination of unreacted reagent in UV - Drug degradation process. *Talanta*, v. 135, p. 27–33, 2015. ISSN 00399140.

- SANTANA, R. M. M. *Estudos e aplicações do persulfato na degradação de compostos orgânicos*. 133 p. Tese (Doutorado) — UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2014.
- SCHENK, H. et al. Optical MEMS for Advanced Spectrometers. v. 1, p. 117–118, 2000.
- SEMICONDUCTOR, F. *NPN Epitaxial Darlington Transistor*. [S.l.], 2014. 1–5 p.
- SEMICONDUCTOR, O. *Folha de Dados - LM317, NCV317 1.5 A Adjustable Output, Positive Voltage Regulator*. [S.l.], 2016. 1–12 p.
- SILVA, C. E. T. da et al. Classification of food vegetable oils by fluorimetry and artificial neural networks. *Food Control*, v. 47, p. 86–91, 2015.
- SILVA, F. O. et al. O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais. *Quim. Nova*, v. 33, n. 9, p. 1933–1939, 2010.
- SILVESTRE, C. I. C. et al. Quantum dots assisted photocatalysis for the chemiluminometric determination of chemical oxygen demand using a single interface flow system. *Anal. Chim. Acta*, Elsevier B.V., v. 699, n. 2, p. 193–197, 2011. ISSN 0003-2670. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.05.018>>.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6 edição. ed. [S.l.]: Thomson Brooks, 2007. 1057 p. ISBN 9780495012016.
- SO, P. T.; DONG, C. Y. Fluorescence Spectrophotometry. *Encycl. Life Sci.*, p. 1–4, 2002.
- SONBUL, Y. *Topological near infrared analysis modeling of petroleum refinery products*. [S.l.]: Google Patents, 2004.
- SOUZA, C. V. et al. Medições de refletância luminosa total, direta e difusa em amostras planas. In: *6 Congr. Bras. Metrol.* [S.l.: s.n.], 2011.
- SU, S. Y.; ASAFU-ADJAYE, E.; Thomas Karnes, H. Room-Temperature Luminescence Analysis of Drugs with Application to the Toxi-Lab Drug Identification System. *J. Anal. Toxicol.*, v. 11, n. April, p. 70–74, 1987.
- TECHNOLOGY, O. *Wide Gap Slotted Optical Switch OPB800 & OPB810 (L and W Series)*. [S.l.], 2008. 1–5 p.
- TECHNOLOGY, O. *Slotted Optical Switch*. [S.l.], 2015. 1–5 p.
- THEIVASANTHI, T.; ALAGAR, M. Lead Nanopowder as Advanced Semi-Conductor , An Insight Lead Nanopowder as Advanced Semi-Conductor – An Insight. *Res. Appl. Mater.*, n. July 2013, p. 36–43, 2013.
- UDT Sensors, I. Silicon Photodiodes Physics and Technology. n. 02, p. 1–11, 1982.
- VALE, B. R. C. et al. Artigo. *Quim. Nova*, v. 38, n. 1, p. 22–29, 2015.
- VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. [S.l.]: Wiley, 2012. 592 p. ISBN 9783527600243.
- VIJ, D. R. *Luminescence of Solids*. [S.l.]: Springer US, 2012. ISBN 9781461553618.
- WELCH, W. T. et al. *Gasoline RFG analysis by a spectrometer*. [S.l.]: Google Patents, 2000.

WILLIAMS, A. R. *An Introduction to fluorescence spectroscopy*. [S.l.: s.n.], 2000. v. 65. 353 p. ISSN 0026265X. ISBN 978-0-387-46312-4.

YU, W. W. et al. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Am. Chem. Soc.*, v. 15, p. 2854–2860, 2003.

ZHENG, L.; HU, Y. The study of blue LED to induce fluorescence spectroscopy and fluorescence imaging for oral carcinoma detection. v. 7382, p. 73821B–73821B–6, jul 2009.

Apêndices

APÊNDICE A – DEPÓSITO DA PATENTE



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
		Código: FQ001	Versão: 2
Depósito de Pedido de Patente		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: VITOR LEÃO FILARDI

6.2 Qualificação: PROFESSOR EBT

6.3 CPF: 944.286.385.15

6.4 Endereço Completo: RUA CARMEM MIRANDA, 172, APTO. 901 - PITUBA

6.5 CEP: 41.810-670

6.6 Telefone: 71- 9199-4692

6.7 FAX:

6.8 E-mail: vitorleão@ifba.edu.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados	folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento da União (GRU).	01
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4 Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo.	10
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações.	03
<input type="checkbox"/>	11.7 Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo.	01
<input type="checkbox"/>	11.9 Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11 Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12 Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13 Outros (especificar) Anexo ;Cópia de declaração de Paartilha; Comprovante de pagamento GRU; Portaria; Cpóia DOU.	05

12. Total de folhas anexadas: 20 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Salvador, 08 de novembro de 2013.

Local e Data


Assinatura e Carimbo
Wagna Piler Carvalho dos Santos
Diretora de Pós-Graduação
SIAPE 0393182
IFBA

“ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU NÃO HOMOGÊNEOS”

Campo da Invenção

5 A presente invenção trata de um equipamento e método espectrofluorimétrico que permite realizar a caracterização de substâncias e meios homogêneos e não homogêneos através de uma varredura espacial (eixos Z e θ) ao longo da amostra podendo medir absorvância, transmitância, reflectância e fluorescência e assim caracterizar suas propriedades químicas e físico-químicas. Tem a versatilidade de se
10 utilizar de amostras em estado sólido, líquido ou gasoso, podendo as mesmas estarem acondicionadas em: cubêtas - de qualquer tipo de material como por exemplo plástico, quartzo ou vidro -, lâminas de vidro - na forma de esfregaço ou material para biópsia -, amostras em fluxo contínuo e dependendo da geometria da amostra diretamente no equipamento sem a necessidade de porta amostra.

15 Mais particularmente a invenção refere-se um dispositivo capaz de posicionar a amostra em diferentes eixos em face ao sistema de coleta de luz de forma a se obter curvas do espectro de absorvância, transmitância, reflectância e fluorescência de maneira coordenada, sincronizada através de um sistema microprocessado que por sua vez pode estar ou não embarcado no equipamento. Este sistema de posicionamento da
20 amostra deve possuir grande precisão e repetitividade de forma a garantir que os dados coletados tenham correlação entre a posição espacial da medida e a amostra.

 Mais especificamente a invenção se refere a um dispositivo com capacidade de ser facilmente transportável e capaz de realizar análises de espécies químicas distribuídas na geometria de amostras de tamanhos e formas variáveis. A partir dos
25 dados adquiridos os mesmos podem ser visualizados em forma de gráficos 2D de uma determinada posição da amostra ou através uma imagem 3D de toda a amostra.

Fundamentos da Invenção

A química analítica se utiliza de vários processos físico-químicos para mensurar diferentes aspectos químicos de uma substância ou composto químico e biológico. São equipamentos óticos de uso corrente na química analítica: os espectrômetros UV-VIS-
5 IR, os espectrofotômetros e os espectrofluorímetros. Em todos estes métodos a amostra é estimulada por diferentes comprimentos de onda de luz de forma que a sua reação ou resposta ao estímulo possa ser mensurada por sensores óticos, tais como: fotodiodo, fototransistor, fotomultiplicadora (PMT - *photomultiplier tube*), câmeras de CCD (*charge coupled device*), etc.

10 Desta maneira a luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética, geralmente na região do ultravioleta próximo-visível (UVIS) proveniente da excitação de moléculas ao retornarem ao seu estado fundamental (S0). Esse fenômeno é dividido em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo.

15 Os estados são arranjados verticalmente por energia e agrupados horizontalmente pela multiplicidade de spins. Quando a transição eletrônica do estado singleto excitado S1 para o estado singleto fundamental S0 ocorre mediante emissão de fótons, este fenômeno é chamado de fluorescência. As transições eletrônicas S1→S0 que acontecem sem emissão de fótons é chamada de conversão interna. As transição
20 eletrônicas entre o estado singleto excitado S1 e o estado tripleto excitado T1 (S1→T1) ocorrem por transições inter-bandas, caracterizado por um tempo de transição longo, sendo chamado de fosforescência.

A observação desses estados moleculares pode ser feita por diferentes métodos: absorvância, transmitância, reflectância e fluorescência. As diferentes substâncias
25 químicas possuem uma assinatura ótica padrão, seja na forma do seu espectro de

absorção, transmissão, reflexão ou de fluorescência, este espectro pode identificá-la, analisá-la ou qualificá-la em relação à sua pureza.

Para cada método supõe um elemento sensor posicionado segundo uma dada geometria, nas medidas de absorbância o elemento sensor deve ficar do lado oposto ao da fonte de excitação, com a amostra posicionada entre eles. Já nas medidas de reflectância o ângulo entre a fonte e a amostra pode assumir diferentes ângulos e nas medidas de fluorescência o sensor, geralmente, fica a 90^0 em relação à fonte de excitação.

Assim a espectrofluorimetria é uma técnica de importância analítica devido a sua simplicidade, rapidez de análise, sensibilidade e seletividade. A utilização desta técnica na análise de fluidos naturalmente fluorescentes possui a vantagem adicional por dispensar a preparação da amostra, por outro lado pode-se utilizar de aditivos químicos como marcadores fluorescentes, corantes ou traçadores óticos permitindo a caracterização de amostras preparadas por diferentes processos químicos, como: secagem, hidrogenação, derivatização e etc; não estando limitado á amostras em solução.

De maneira geral um aspecto negativo desses espectrofluorímetros atuais é o fato da medição se restringir a um ponto da amostra, em outras palavras, as amostras analisadas devem ser consideradas como homogêneas.

Assim a presente invenção se trata de um espectrofluorímetro de varredura espacial, ou, espectrotomógrafo de fluorescência UV-VIS (Spectratomus-UVIS), que busca ampliar e melhorar as análises químicas que usam fluorescência, possibilitando o estudo espacial de amostras de substancias puras ou misturas, o que certamente cria novas possibilidades de exploração de amostras complexas.

Um aspecto importante desse dispositivo é a precisão do posicionamento da

amostra realizada por motores de passo associados a fusos que não só permitem mapear a amostra, como também garantem a confiabilidade dos dados obtidos. Para amostras pequenas, por exemplo, da ordem de milímetros, torna-se necessário que os posicionadores tenham precisão ainda menor para garantir que a amostra seja mapeada de modo efetivo.

Técnica relacionada

As pesquisas empregando espectro-fluorescência vão desde análises laboratoriais à identificação de câncer. Diversas linhas de pesquisas, na atualidade, utilizam espectrofluorímetros para investigar, determinar a concentração e a qualidade das substâncias puras e misturas, identificar a natureza do material, determinar a taxa de concentração de mistura de substância entre outras aplicações os quais são aqui citados como referência. Além do uso de posicionadores para diversas outras aplicações.

Através da associação de espectrofluorimetria com PCA e PLS [Engelsen, S. B. - J. Am. Oil. Chem. Spectrosc., 74(12), 1997] foi possível avaliar a deterioração de óleo de fritura e seu conteúdo de anisidina, oligômeros, iodo e vitamina E. O uso da espectroscopia fluorescente síncrona associada à quimiometria permitiu distinguir diversos óleos vegetais [Sikorska, E.; Gorecki, T.; Khmelinskii, I. V.; Sikorski, M.; Koziol, J. - Food Chem., 89, 217-225, 2005]. Também através da espectroscopia fluorescente síncrona associada com PCA e PLS foi possível verificar alterações oxidativas de alimentos [Jensen, P. N.; Christensen, J.; Engelsen, S. B. - Eur. Food Res. Technol., 219, 294-304, 2004].

Na patente PII005638-6 A2 propõe um método de análise para prever as propriedades químicas e físico-químicas de óleos através de análise multivariada associada com espectrofluorimetria.

Nas publicações abaixo tratam da determinação da concentração e da qualidade das substâncias puras e misturas, Julio Cesar L. Alves e Ronei J. Poppi, "Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid, Paracetamol and Caffeine Using Solid-Phase Molecular Fluorescence and Parallel Factor Analysis," *Analytica Chimica Acta*, 642 (2009), 212–216 e Ricardo Marcelo e outros, "Espectrofluorimetria Comparada à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na detecção de Ocratoxina A em Café" *Ciências de Alimentos*, 29 (2008), 331–338.

A identificação da natureza do material, a determinação da taxa de concentração de mistura de substância podem ser exemplificadas o seu uso no artigo de PRC Neto e outros "Produção de Biocombustível Alternativo Ao Óleo Diesel Através Da Transesterificação de Óleo de Soja Usado Em Frituras," *Química Nova*, 23 (2000), 531–537; Jianzhong Li and Purnendu K. Dasgupta, "A Simple Instrument for Ultraviolet-Visible Absorption Spectrophotometry in High Temperature Molten Salt Media," *Review of Scientific Instruments*, 71 (2000), 2283.

Nas publicações US2004/033617, US6140647 e WO2006/126978 tratam da utilização da espectroscopia no infravermelho próximo associada a métodos de análise covariante para analisar, através de escores e *loadings*, os produtos do refino do petróleo e identificar seus constituintes.

Na patente PI0714469-2 A2 descreve um método para determinar a quantidade de ácido nucleico presente em uma amostra, no qual um fluoróforo é adicionado à amostra e são mensuradas as suas emissões de fluorescência para determinação da quantidade de ácido nucleico presente. Tal aplicação está diretamente relacionada a detecção de câncer através do ácido nucleico extraído do DNA. Assim como na publicação Longjiang Zheng e Yuanting Hu, "The Study of Blue LED to Induce Fluorescence Spectroscopy and Fluorescence Imaging for Oral Carcinoma Detection,"

ed. by Farzin Amzajerian, Chun-qing Gao, and Tian-yu Xie, 7382 (2009) onde o uso do espectro de fluorescência foi aplicado a detecção de câncer bucal.

O pedido de patente PI8706520-7A2 – Posicionador automático – concerne de um mecanismo para corte, estampa e cunhagem ou processos semelhantes em prensas.

5 Na patente PI0913765-3 A2 o sistema de aquisição, controle e posicionamento automatizado se refere a um sistema aplicável a fluorescência induzida por Laser em Fluxo Líquidos (PLE-FI) e para fluorescência induzida por Lazer em função do tempo de irradiação (LIFirr) mas tal técnica não se aplica por exemplo para a fluorescência induzida por lâmpadas frias, quentes ou diodos emissores de luz (LED).

10 No entanto, nenhum dos pedidos de patentes ou outras publicações acima citadas tratam de um espectrofluorímetro de varredura com capacidade de gerar gráfico 3D da superfície do espectro de absorbância, transmitância, reflectância e fluorescência de uma amostra em questão.

Assim, o objetivo da presente invenção é apresentar um dispositivo para análise
15 espectrofluorimétrica com software embarcado capaz de realizar medições do espectro de absorbância, transmitância, reflectância e fluorescência ao longo das amostras e assim levantar dados sobre as propriedades químicas e físico-químicas das ditas amostras.

Descobriu-se que existe a necessidade de tal aparato para análise química onde
20 certas propriedades ou processos químicos só poderão ser avaliados através de uma de uma imagem 3D da dispersão da fluorescência ao longo da amostra. Desta forma as amostras podem ser substâncias, puras ou em misturas homogêneas ou não homogêneas, isoladas de produtos naturais, substâncias sintéticas, medicamentos sintéticos, fitoterápicos, drogas lícitas e ilícitas, combustíveis (gasolina, diesel,
25 querosene) biocombustíveis (biodiesel), óleos vegetais e óleos e gorduras residuais. As

propriedades analisadas podem ser concentração, viscosidade, estabilidade oxidativa, massa específica, dispersão entre outras.

O software embarcado é capaz de realizar a varredura ao longo da amostra fazendo a coleta da medida ótica associada ao posicionamento da amostra face ao sensor e desta forma expor uma imagem 3D da superfície analisada.

Sumário da invenção

O requente desenvolveu um sistema que compreende de um posicionador automático em duas direções uma vertical e outra no próprio eixo com suporte de porta amostra para diferentes formatos, um conjunto de suportes para iluminação de tal forma a permitir diferentes tipos de medidas óticas tais como: absorbância, transmitância, reflectância e fluorescência, um sistema de controle de intensidade luminosa operada remotamente e uma interface de aquisição desses sinais que são enviados para um sistema microprocessado.

Breve descrição da Figura

O desenho que acompanha e integra este relatório representa uma realização preferida da invenção em caráter meramente ilustrativo sem nenhuma característica restritiva.

A figura 1 mostra um diagrama de blocos do dispositivo, nela é possível visualizar a fonte de luz (1) que excitará a amostra que será posiciona sobre o porta amostra (4). A amostra pode se deslocar no eixo Z (2) e o seu posicionamento em torno do próprio eixo (3) sendo este operado remotamente pelo computador. O equipamento ainda possui uma rotina interna de posicionamento inicial sendo o seu controle embarcado no mesmo. A coleta de luz é feita por uma fibra ótica (5) que transmite esta

luz até o aparato de aquisição (6). Dentro do aparato de aquisição tem-se um espelho côncavo (7) onde o ponto focal se encontra uma grade difração (9) que decompõe a luz sobre o espelho plano (8) e este reflete a luz decomposta sobre toda a matriz de CCD (10) que irá converter o estímulo de luz em um sinal digital. Uma vez o sinal adquirido
5 estas informações são passadas para um sistema microprocessado (11) o qual o usuário tem acesso as mesmas e podendo ser visualizada em forma de gráfico 2D ou 3D.

Descrição detalhada da invenção

O espectrotomógrafo Spectratomus-UVIS é um equipamento compacto, que usa
10 a tecnologia LED-CCD para excitar e detectar a luz de fluorescência. Este instrumento tem a capacidade de detectar, analisar e adquirir espectros de fluorescência ao longo de amostra com até 36 mm, na direção do eixo Z e em 2π radiano (360°) em torno do eixo de rotação θ . O equipamento desenvolvido cria um mapa fluorimétrico 3-D da superfície da amostra, como também o espectro 2D pontual de um determinado local da
15 amostra sendo esta imagem 2D semelhante a obtida nos tradicionais espectrofluorímetros.

A fonte de luz de excitação empregada é um LED, que eventualmente pode ser substituído por uma fonte continua de luz: lâmpada do tipo halogênio, por exemplo. O porta-amostra pode receber tanto cubêtas padrão de 3,5 mL, quanto lâminas de
20 microscópio. A coleção da luz de fluorescência é feita por uma fibra ótica montada em ângulo reto em relação ao eixo ótico da fonte de luz de excitação, a uma distância fixa, sendo possível diferentes distâncias de acordo com a necessidade da amostra a ser analisada. O LED emite em uma pequena faixa do espectro luminoso ($\lambda_{LED} \pm 10$ nm), podendo ser escolhido em função da amostra a ser investigada. Nos dias de hoje é
25 possível excitar amostras com diodos emissores de luz no intervalo entre 200 a 2000

nm, sem ter que fazer uso de filtros ou redes de difração.

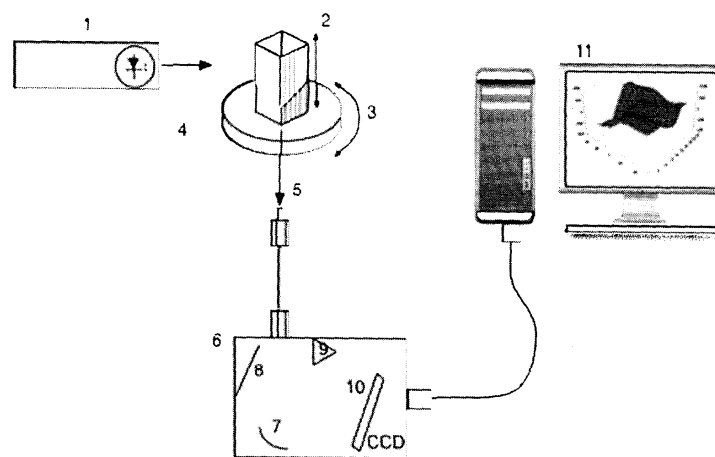
Na fluorescência, a luz de excitação de pequeno comprimento de onda ao interagir com a amostra faz surgir luz de fluorescência de comprimento de onda mais longo. Tanto a luz de fluorescência da amostra, quanto parte da luz do LED espalhada 5 chegam à fibra ótica que faz a coleção de luz, antes da análise pelo sistema ótico do detector. A ótica de análise dessa luz, é composta por um espelho côncavo, cuja função é concentrar a luz trazida pela fibra ótica no ponto focal onde estão posicionados uma rede de difração e um espelho plano. A rede de difração tem a função de decompor a luz nos diversos comprimentos de onda, transmitindo-a a um espelho plano. A luz 10 decomposta e refletida chega finalmente ao CCD montado do lado oposto a este espelho.

No Spectratomus-UVIS a perda de intensidade de luz na unidade ótica é consideravelmente menor que nos espectrofluorímetros clássicos. O CCD usado tem resolução de 0,3 nm e o sistema de decomposição da luz ocupa uma área menor que 400 15 mm². O conjunto ótica-detector pode ser energizado e transferir dados e comandos por uma porta USB (Universal Serial Bus) conectada a um sistema microprocessado do tipo PC. Um software de comunicação e de interface homem-máquina (IHM) torna possível a aquisição, em tempo real, dos espectros de fluorescência em cada ponto da amostra. A justaposição e um pós-tratamento numérico desses espectros criam a superfície espectral 20 de fluorescência da amostra em função da posição do eixo Z e do ângulo θ . Para variar o comprimento de onda de excitação basta trocar de LED.

O sistema posicionador eletromecânico do eixo Z possui resolução de 0.0072 mm e tem suas folgas minimizadas por um desenho do tipo rabo de andorinha, acionado por um motor de passo acoplado a um parafuso sem fim. O deslocamento angular no 25 eixo θ é feito com resolução de 0.9⁰ e ambos apresentam incerteza de 0.1%, também

comandado por um motor de passo. Em conjunto com estes sistema posicionador tem-se um circuito eletrônico microprocessado independente do aparato de aquisição e aliado a este tem-se outros elementos eletrônicos que são utilizados para a verificação da posição do sistema assim como estabelecer a posição inicial do mesmo.

5



10

Figura-1

REIVINDICAÇÕES

1. ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU
NÃO HOMOGÊNEOS **caracterizador por** ser um equipamento para
5 laboratórios de análises químicas, clínicas ou de pesquisa já que permite
caracterizar, investigar, identificar e determinar propriedades químicas e físico-
químicas de substâncias puras e de misturas homogêneas ou não homogêneas,
entre outras aplicações os quais são aqui citados como referência.
2. ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA
10 CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU
NÃO HOMOGÊNEOS **caracterizado por** permitir medir amostras em
diferentes formatos e em diferentes tipos de porta amostra que podem ser placas
sólidas, cubêtas, lâminas de vidro, fluxo contínuo, entre outros.
3. ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA
15 CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU
NÃO HOMOGÊNEOS **caracterizado por** possuir um sistema microprocessado
de posicionamento de precisão da amostra nos eixos Z e θ , controle das
variáveis auxiliares, sistema especializado para aquisição dos espectros e um
sistema de excitação de energia radiante nos comprimentos de onda de 200 a
20 2000 nm e de intensidade variável.
4. ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU
NÃO HOMOGÊNEOS **caracterizado por** possuir um conjunto de hardware
com motores de passo, guia linear ou trilho, sensores de fim de curso, porta

amostra para lâminas, cubéatas e microtubo, suporte para o sistema de excitação em várias posições a permitir medidas de : absorbância, transmitância, reflectância e fluorescência e ajuste da distância entre o sistema de excitação e a amostra.

- 5 5. ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU
NÃO HOMOGÊNEOS **caracterizado por** operar em três modos: rotina de
aquisição de espectro pontual, rotina de aquisição de espectro por varredura no
eixo Z e rotina de aquisição de espectro por varredura no eixo Z e
10 posicionamento variável em θ .
6. ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU
NÃO HOMOGÊNEOS de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5
caracterizado por compreender os seguintes componentes:
- 15
- Um sistema para investigar, caracterizar, determinar, identificar, quantizar substâncias puras ou sintéticas, medicamentos sintéticos, fitoterápicos, fragmentos, tecidos biológicos, misturas homogêneas e não homogêneas.
 - Um sistema de porta amostra cambiável para o tipo de amostra a ser analisada;
- 20
- Um sistema microprocessado de posicionamento de precisão no eixo Z e no eixo θ ;

- O microprocessador é responsável pelo controle de variáveis auxiliares do sistema de posicionamento como chaves de fim de curso e controle da intensidade da energia radiante;
- 5 • Um sistema especializado para detectar as emissões de energia radiante da faixa de comprimento de onda de 200 a 2000 nm;
- O conjunto posicionador constituído de trilhos ou guia linear escalonável por um fuso sendo este por sua vez acionados por motores de passo;
- Um conjunto de suportes para o sistema de excitação de forma a permitir as medidas de: absorbância, transmitância, reflectância e fluorescência, assim como o ajuste da distância entre o sistema de excitação e a amostra;
- 10 • Um conjunto de rotinas de aquisição de dados de tal forma que possa realizar medidas, pontuais, varredura em um ou dois eixos, sendo um deles o eixo de rotação da amostra.

RESUMO

A presente Patente de Invenção: **“ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU NÃO HOMOGÊNEOS”** desenvolvido como

5 instrumento de apoio para laboratórios de análises químicas, clínicas ou de pesquisa uma vez que permite realizar a caracterização de substâncias e meios homogêneos e não homogêneos através de uma varredura espacial (eixos Z e θ) ao longo da amostra podendo medir absorvância, transmitância, reflectância e fluorescência e assim caracterizar suas propriedades químicas e físico-químicas, o mesmo é constituído de

10 uma ou várias fontes radiantes (1), sistema de posicionamento Z (2) e posicionamento no próprio eixo de rotação (3), que por sua vez fica apoiado num porta amostra (4), a captação da fonte radiante se dá através de um fibra ótica (5) que conduz a luz captada até o espelho côncavo (7) com o ponto focal na rede de difração (9) onde a saída do espectro decomposto incide no espelho plano (8) e sendo captado pela matriz CCD (10),

15 assim o aparato de aquisição (6) conectado a um sistema microprocessado (11) é capaz de comandar, armazenar, adquirir dados de todo o sistema e exportar dados em formato de gráfico 2D, 3D e dados brutos para serem analisados por outros softwares.

ANEXO: DADOS OUTROS INVENTORES (72)

Nome: Iuri Muniz Pepe

Qualificação: Professor

CPF: 328.133.845-34

Endereço Completo: Av. Ademar de Barros s/nº , Ondina, Salvador-Bahia, CEP: 40.210-340

Laboratório de Propriedades Ópticas – LAPO. Universidade Federal da Bahia - UFBA

Tel: (71) 3283 6619

E-mail: lapo.if@gmail.com

Nome: Ivanoé João Rodowanski

Qualificação: Professor

CPF: 942.156.261-53

Endereço Completo: Av. Ademar de Barros s/nº , Ondina, Salvador-Bahia, CEP: 40.210-340

Laboratório de Propriedades Ópticas – LAPO. Universidade Federal da Bahia - UFBA

Tel: (71) 3283 6619

E-mail: ivanoeh@gmail.com

Nome: Carlos Eduardo Tanajura da Silva

Qualificação: Engenheiro

CPF: 007.738.515-26

Endereço Completo: Av. Ademar de Barros s/nº , Ondina, Salvador-Bahia, CEP: 40.210-340

Laboratório de Propriedades Ópticas – LAPO. Universidade Federal da Bahia - UFBA

Tel: (71) 3283 6619

E-mail: eduardotanajura@yahoo.com.br

Nome: Angelo Oliveira dos Santos

Qualificação: Engenheiro Eletricista

CPF: 284.028.555-04

Endereço Completo: Av. Ademar de Barros s/nº , Ondina, Salvador-Bahia, CEP: 40.210-340

Laboratório de Propriedades Ópticas – LAPO. Universidade Federal da Bahia - UFBA

Tel: (71) 3283 6619

E-mail: angelo.osantos@gmail.com

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins, que nos comprometemos a repartir quaisquer dividendos, vantagens, etc, do percentual destinado aos inventores relativos à patente "ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS HOMOGÊNEOS OU NÃO HOMOGÊNEOS", atendendo a proporção discriminada abaixo:

Inventor	Instituição	CPF	Email	%	Assinatura
Iuri Muniz Pepe	UFBA	328.133.845-34	Lapo.if@gmail.co m	30	
Vitor Leão Filardi	IFBA	944.286.385-15	vitorleao@ifba.ed u.br	34	
Ivanoé João Rodowski	UFBA	942.156.261-53	ivanoeh@gmail.c om	8	
Carlos Eduardo Tanajura da Silva	UFBA	007.738.515-26	eduardotanajura @yahoo.com.br	8	
Angelo Oliveira dos Santos	UFBA	284.028.555-04	Angelo.osantos@ gmail.com	20	

Salvador, 5 de novembro de 2013.



SIAFI2013-DOCUMENTO-CONSULTA-CONGRU (CONSULTA GUIA DE RECOLHIMENTO DA UNIAO
07/11/13 17:04 USUARIO : ELSON

DATA EMISSAO : 05Nov13 TIPO : 1 - PAGAMENTO NUMERO : 2013GR800106
UG/GESTAO EMITENTE : 158145 / 26427 - INST.FED.DE EDUC.,CIENC.E TEC.DA BAHIA
UG/GESTAO FAVORECIDA : 183038 / 18801 - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDU
RECOLHEDOR : 158145 GESTAO : 26427

CODIGO RECOLHIMENTO : 72200 - 6 COMPETENCIA: NOV13 VENCIMENTO: 05Nov13

DOC. ORIGEM: 158145 / 26427 / 2013NP002000 PROCESSO :

RECURSO : 1

(=)VALOR DOCUMENTO : 95,00

(-)DESCONTO/ABATIMENTO:

(-)OUTRAS DEDUCOES :

(+)MORA/MULTA :

(+)JUROS/ENCARGOS :

(+)OUTROS ACRESCIMOS :

(=)VALOR TOTAL : 95,00

NOSSO NUMERO/NUMERO REFERENCIA : 00000000221307992670

CODIGO DE BARRAS : 89620000000 9 95000001010 4 95523127220 9 00360640000 4

OBSERVACAO

PAGAMENTO DE PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO(ESPECTROTOMOGRFAO DE FLUORESCENCIA UV
-VIS P CARACT. DE SUBST. E MEIOS HOMOGENEOS E NAO HOMOGENEOS),MEMO N.59 CIT/PR
LANCADO POR : 93234147515 - ELIENE UG : 158145 05Nov2013 13:37
PF1=AJUDA PF3=SAI PF2=DADOS ORC/FIN PF4=ESPELHO PF12=RETORNA

APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS

ESPECTROTÓMOGRAFO DE FLUORESCENCIA UV-VIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E MEIOS NÃO HOMOGÊNEOS

Filardi, V.L.¹, Santos, A.O.², da Silva, C.E.T.³, Rodowanski⁴, I., Moreira, J.M.A.⁵Pepe, I.M.⁶

1-Instituto Federal da Bahia, Travessa Emídio dos Santos s/n, Salvador, Brasilvitorleao@ifba.edu.br
2-Instituto de Física, Rua Barão de Geremoabo S/N, Salvador, Brasilangelo.osantos@gmail.com
3-Instituto de Física, Rua Barão de Geremoabo S/N, Salvador, Brasil eduardotanajura@yahoo.com.br
4-Instituto de Física, Rua Barão de Geremoabo S/N, Salvador, Brasil ivanoeh@gmail.com
5-Instituto de Física, Rua Barão de Geremoabo S/N, Salvador, Brasil b2.lapo@gmail.com
6-Instituto de Física, Rua Barão de Geremoabo S/N, Salvador, Brasil lapo.if@gmail.com

Palavras-chave: espectrofluorímetro, espectrofluorimetria, aquisição de dados, fluorescência.

Resumo

Os espectrofluorímetros são usados para identificar diferentes tipos de componentes químicos através de sua fluorescência. Muitos grupos de pesquisa utilizam espectrofluorímetros buscando investigar adulterações de óleos, determinar a concentração e a qualidade de substâncias, identificar a natureza do material, determinar a taxa de concentração de mistura de uma dada substância em um meio solvente, etc. Neste artigo é apresentado um equipamento que permite determinar a fluorescência em varredura espacial (Z e θ), possibilitando a análise de espécies químicas distribuídas na geometria de amostras de tamanhos e formas variáveis. Este novo equipamento pode ser usado para a caracterização de amostras líquidas, sólidas ou esfregado em lâminas de vidro. Neste método de análise é possível utilizar a fluorescência natural ou por uso de aditivos químicos como marcadores fluorescentes, corantes ou traçadores óticos permitindo a caracterização de amostras preparadas por diferentes processos químicos, como: secagem, hidrogenação, derivatização e etc; não estando limitado a amostras em solução. O espectrotomógrafo de fluorescência Spectratomus-UVIS proposto varre a amostra ao longo do eixo Z (0 e 36 mm) e em torno do eixo angular θ , entre 0 e 360°, com resolução de 0.0072 mm em Z e 0.9° em θ , sendo assim é possível estabelecer a superfície de fluorescência da amostra. Os espectrofluorímetros convencionais só são capazes de efetuar a medição de fluorescência em substância homogênea ou quase homogênea, determinando a média dos fótons produzidos em um spot (100 mm²) da amostra. Uma amostra dotada de uma descontinuidade ótica de 5,6 mm de espessura foi testada e a espessura da descontinuidade medida com incerteza de 2.8%. Este novo equipamento ainda se encontra na fase de protótipo, porém já com patente requerida.

1. Introdução

A química analítica se utiliza de vários processos físico-químicos para mensurar diferentes aspectos químicos de uma substância ou composto químico e biológico. São equipamentos óticos de uso corrente na química analítica: os espectrômetros UV-VIS-IR, os espectrofotômetros e os espectrofluorímetros[1], [2], [3]. Em todos estes métodos a amostra é estimulada por diferentes comprimentos de onda de luz de forma que a sua reação ou resposta ao estímulo possa ser mensurada por sensores óticos, tais como: fotodiodo, fototransistor, fotomultiplicadora (PMT - photomultiplier tube), câmeras de CCD (charge coupled device), etc [4], [5].

Em homenagem ao físico polonês Aleksander Jablonski, o diagrama de Jablonski (Figura 1) ilustra os estados energéticos de uma molécula e suas transições quando excitados por um determinado comprimento de onda da radiação eletromagnética.

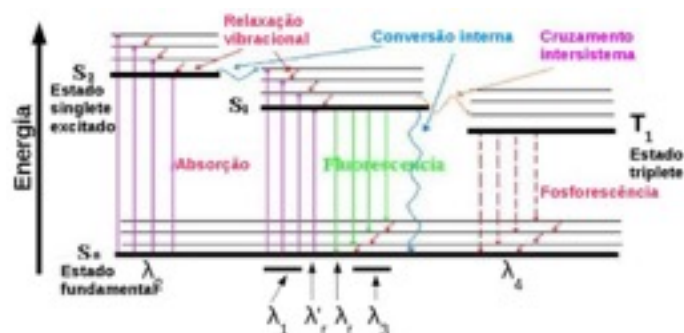


Figura 1- Diagrama de Jablonski

Os estados são arranjados verticalmente por energia e agrupados horizontalmente pela multiplicidade de spins. As transições radiativas são indicadas por flechas retas e transições não radiativas por flechas onduladas. Quando a transição eletrônica do estado singleto excitado S1 para o estado singleto fundamental S0 ocorre mediante emissão de fótons, este fenômeno é chamado de fluorescência. As transições eletrônicas S1→S0 que acontecem sem emissão de fótons é chamada de conversão interna. As transição eletrônicas entre o estado singleto excitado S1 e o estado tripleto excitado T1 (S1→T1) ocorrem por transições inter-bandas, caracterizado por um tempo de transição longo, sendo chamado de fosforescência [1], [3].

A observação desses estados moleculares pode ser feita por diferentes métodos: absorvância, transmitância, reflectância e fluorescência. As diferentes substâncias químicas possuem uma assinatura ótica padrão, seja na forma do seu espectro de absorção, transmissão, reflexão ou de fluorescência, este espectro pode identificá-la, analisá-la ou qualificá-la em relação à sua pureza.

Cada método supõe um elemento sensor posicionado segundo uma dada geometria, nas medidas de absorvância o elemento sensor deve ficar do lado oposto ao da fonte de excitação, com a amostra posicionada entre eles. Já nas medidas de reflectância o ângulo entre a fonte e a amostra pode assumir diferentes ângulos e nas medidas de fluorescência o sensor, geralmente, fica a 90° em relação à fonte de excitação [3], [6].

Diversas linhas de pesquisas, na atualidade, utilizam espectrofluorímetros para investigar adulterações em óleos, determinar a concentração e a qualidade das substâncias puras e misturas [7], [8], identificar a natureza do material, determinar a taxa de concentração de mistura de substância [9], [10] entre outras aplicações [11]. As pesquisas empregando espectrofluorescência vão desde análises laboratoriais à identificação de câncer [12], [13], [14] e [14].

Um aspecto negativo dos espectrofluorímetros atuais é o fato da medição se restringir a um ponto da amostra, em outras palavras, as amostras analisadas devem ser consideradas como homogêneas. A proposta de um espectrofluorímetro de varredura espacial, ou, espectrotomógrafo de fluorescência UV-VIS (Spectratomus-UVIS), desenvolvido pelo grupo de Instrumentação Científica do Laboratório de Propriedades Óticas (LaPO) da Universidade Federal da Bahia, busca ampliar e melhorar as análises químicas que usam fluorescência, possibilitando o estudo espacial de amostras de substâncias puras ou misturas, o que certamente cria novas possibilidades de exploração de amostras complexas.

2. Materiais e Métodos

Os equipamentos que medem a fluorescência de uma amostra possuem pelo menos quatro elementos básicos: uma fonte de luz de excitação, um porta amostra, um sistema análise da luz de fluorescência e um sensor de luz.

Como fontes de luz de excitação, quase sempre, são empregadas lâmpadas de corrente contínua, que emitem em uma larga, ou mesmo muito larga, faixa do espectro eletromagnético. São comuns as lâmpadas de filamento de tungstênio, lâmpadas de halogênio, lâmpada de deutério, xenônio, e só muito recentemente são usados diodos emissores de luz ou LEDs.


O porta-amostra, em geral, de material transparente, desempenha a função de ancorar de forma rígida e precisa a amostra em relação aos elementos da ótica do instrumento de medida.

O sistema de análise da luz a ser detectada é geralmente composto por um guia de luz, uma fenda de entrada, elementos de ótica, filtros passa-banda ou filtros de interferência, ou ainda, uma rede de difração, um sistema mecânico; opcional; de deslocamento da rede, que permite a varredura do espectro difratado e uma fenda de saída.

Como elementos sensor são utilizados foto-resistores, células fotoelétricas, fotodiodos ou foto-transistores, fotomultiplicadoras (PMT) ou matrizes de CCD, dispositivos que convertem luz em uma grandeza elétrica de interesse.

2.1 O Espectrotomógrafo de fluorescência UV-VIS (Spectratomus-UVIS)

O espectrotomógrafo Spectratomus-UVIS é um equipamento compacto, que usa a tecnologia LED-CCD para excitar e detectar a luz de fluorescência. Este instrumento tem a capacidade de detectar, analisar e adquirir espectros de fluorescência

ao longo de amostra com até 36 mm, na direção do eixo Z e em 2π radiano (360°) em torno do eixo de rotação . O equipamento desenvolvido cria um mapa fluorimétrico 3-D da superfície da amostra. Na Figura 2 é apresentado o diagrama de blocos do Spectratomus-UVIS.

A fonte de luz de excitação empregada é um LED, que eventualmente pode ser substituído por uma fonte contínua de luz: lâmpada de halogênio, por exemplo. O porta-amostra pode receber tanto cubetas padrão de 3,5 mL, quanto lâminas de microscópio. A coleção da luz de fluorescência é feita por uma fibra ótica montada em ângulo reto em relação ao eixo ótico da fonte de luz de excitação, a uma distância fixa. O LED, que emite é uma pequena faixa do espectro luminoso (LED +/- 10 nm), pode ser escolhido em função da amostra a ser investigada. Nos dias de hoje é possível excitar amostras com diodos emissores de luz no intervalo entre 200 a 2000 nm, sem ter que fazer uso de filtros ou redes de difração.

Na fluorescência, a luz de excitação de pequeno comprimento de onda ao interagir com a amostra faz surgir luz de fluorescência de comprimento de onda mais longo. Tanto a luz de fluorescência da amostra, quanto parte da luz do LED espalhada chegam à fibra ótica que faz a coleção de luz, antes da análise pelo sistema ótico do detector. A ótica de análise dessa luz, é composta por um espelho côncavo, cuja função é concentrar a luz trazida pela fibra ótica no ponto focal onde estão posicionados uma rede de difração e um espelho plano. A rede de difração tem a função de decompor a luz nos diversos comprimentos de onda, transmitindo-a a um espelho plano. A luz decomposta e refletida chega finalmente ao CCD montado do lado oposto a este espelho.

No Spectratomus-UVIS a perda de intensidade de luz na unidade ótica é consideravelmente menor que nos espectrofluorímetros clássicos. O CCD usado tem resolução de 0,3 nm e o sistema de decomposição da luz ocupa uma área menor que 400 mm². O conjunto ótica-detector pode ser energizado e transferir dados e comandos por uma porta USB (Universal Serial Bus) conectada a um computador pessoal (PC). Um software de comunicação e de interface homem-máquina (IHM) torna possível a aquisição, em tempo real, dos espectros de fluorescência em cada ponto da amostra. A justaposição e um pós-tratamento numérico desses espectros criam a superfície espectral de fluorescência da amostra em

função da posição do eixo Z e do ângulo θ . Para variar o comprimento de onda de excitação basta trocar de LED.

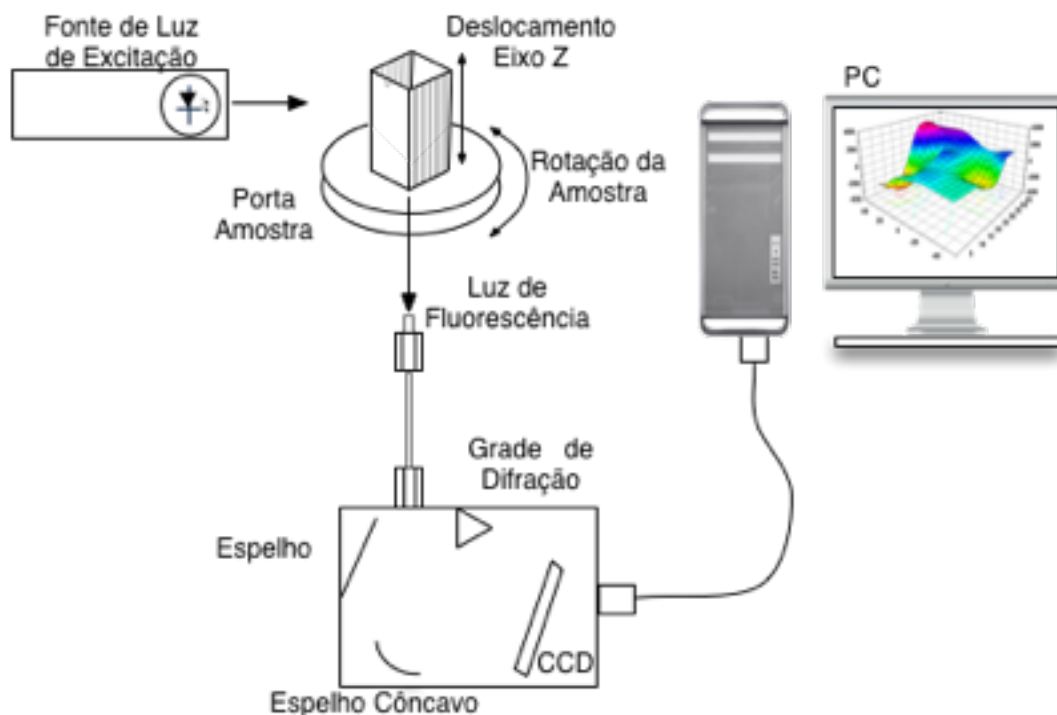


Figura 2 - Diagrama funcional do Espectrotomógrafo de fluorescência UV-VIS (Spectratomus-UVIS).

3. Teste e validação do Spectratomus-UVIS

Para testar o funcionamento do Spectratomus-UVIS foi usada uma amostra sólida composta por resina epóxi dopada com uma substância fluorescente. Nesta amostra sólida foi criada uma descontinuidade ou defeito de ótica (5,6mm de espessura média) pela pintura de uma faixa preto fosco, com a intenção de testar a sensibilidade e capacidade de discriminação do tomógrafo a um defeito de superfície, conforme ilustrado na Figura 3A. A amostra foi então acondicionada em uma cubeta de plástico padrão, conforme ilustrado na Figura 3B.

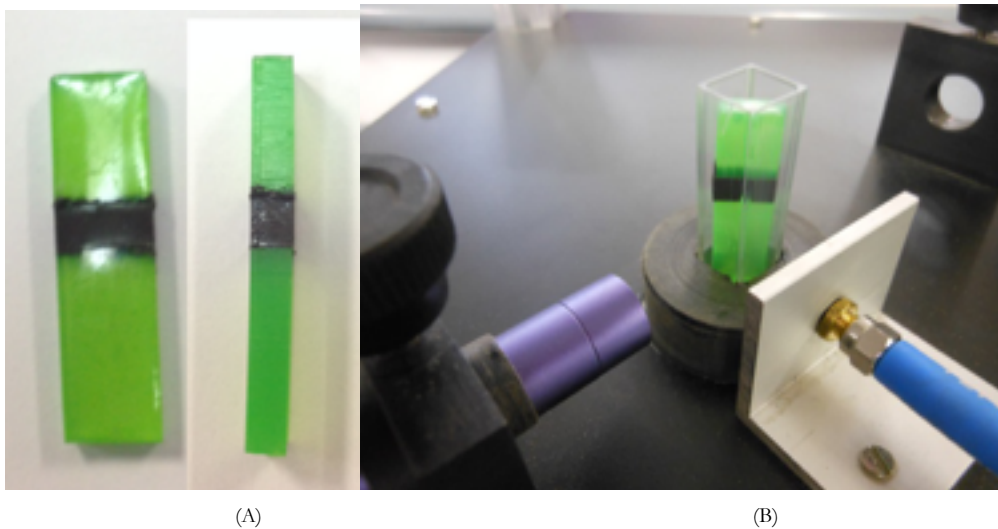


Figura 3 – (A) Fotos da amostra utilizada para testar o equipamento, vista frontal e lateral. (B) Foto do Espectrotômetro de fluorescência UV-VIS (Spectratomus-UVIS) com a amostra.

Na Figura 3B pode-se visualizar o porta LED na cor violeta no canto esquerdo inferior. A cubeta de quartzo possui duas faces lisas e duas faces rugosas, conforme ilustra a Figura 4. Desta maneira a luz de excitação passará pela face lisa (A) da cubeta e a coleção de luz de fluorescência pela face rugosa (B). A cubeta foi rotacionada no sentido anti-horário por passos de 90 ou $\pi/2$ radiano, o que possibilitou coletar a fluorescência nas quatro faces.



Figura 4 - Cubeta de plástico com a identificação de suas faces.

A aquisição dos espectros de fluorescência foi feita com a cubeta vazia, e em seguida com a amostra em seu interior. Os espectros com a cubeta vazia servem para determinar uma eventual interferência do porta-amostra na absorbância e na fluorescência. Para ambos os casos utilizou-se as seguintes configurações de aquisição:

- Luz de excitação incidindo na face lisa (A) e coleção da luz de fluorescência através da face rugosa (B)
- Luz de excitação incidindo na face rugosa (D) e coleção da luz de fluorescência através da face lisa (A)
- Luz de excitação incidindo na face lisa (C) e coleção da luz de fluorescência através da face rugosa (D)
- Luz de excitação incidindo na face rugosa (B) e coleção da luz de fluorescência através da face lisa (C)

A aquisição de dados foi realizada utilizando o Spectratomus-UVIS, usando um LED de 393 nm como fonte de excitação, polarizado por 16 mA de corrente. O tempo de integração do CCD foi programado em 42 ms, ao final deste intervalo de tempo o espectro de fluorescência da amostra, para um determinado par (Z, φ) , era transferido para o PC. O espectro é uma matriz de dados composta pelo comprimento de onda (variável independente) e a intensidade de luz para cada comprimento de onda (variável dependente). A amostra foi analisada ao longo de seu comprimento no eixo Z, com passos de 0,36 mm ao final de cada tempo de integração. Foi gerado um conjunto de 100 espectros de fluorescência da amostra para cada face da amostra. O Spectratomus-UVIS em sua versão 1.0 tem capacidade de varrer o eixo Z com taxa de avanço de 0,0072 mm e incerteza de 0.1%. A varredura em Z é possível graças a um posicionador mecânico, com folgas minimizadas por um desenho do tipo rabo de andorinha, acionado por um motor de passo acoplado a um parafuso sem fim. O deslocamento angular no eixo φ é feito com resolução de 0.90 e incerteza também de 0.1%, também comandado por um motor de passo.

4. Resultados

Os resultados obtidos foram agrupados em função da face da cubeta por onde incidiu a luz de excitação. As superfícies espectrais obtidas podem ser visualizadas nas Figuras 5A e B e Figuras 6A e B. Nestas figuras devem ser destacadas duas regiões de interesse, uma em torno dos 400 nm, que diz respeito a luz de excitação refletida pela amostra e outra próxima ao 510 nm, que corresponde a luz de fluorescência produzida.

Analisando a Figura 5A, nota-se que a luz de excitação refletida varia ao longo da amostra. É importante ressaltar que a amostra sólida, quando inserida na cubeta, não a preenche por completo, existindo uma interface de ar entre o plástico da cubeta e o epóxi da amostra, esta interface favorece o fenômeno da reflexão, mas não de forma uniforme. Isto significa que o conjunto cubeta-amostra pode ter uma taxa de reflexão que varia ao longo do comprimento. Como mencionado anteriormente, foi criado na amostra, pela pintura em posição arbitrária de uma faixa preta, uma superfície opaca que impede a passagem da luz de excitação, mas também o escape da luz emitida pela amostra. Observa-se um vale na intensidade da luz refletida (400 nm) na posição 2000, da varredura ao longo do eixo Z. Em relação à luz de fluorescência (510 nm) o vale aparece na posição 3000 da varredura. Isto se deve ao fato da faixa preta ter sido posicionada com certo

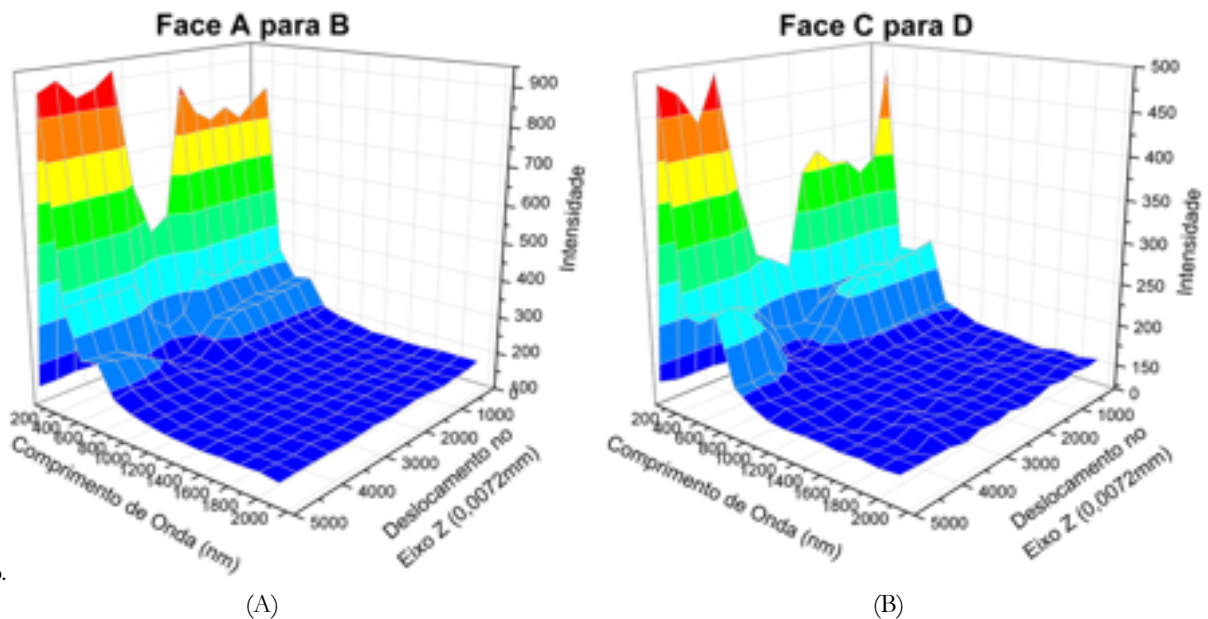


Figura 5– Superfície Espectral da amostra ao longo do eixo Z da face Lisa para rugosa

Na Figura 5B é observado um comportamento similar, sendo possível observar um vale pronunciado da luz refletida na posição 2000 do deslocamento do eixo linear e o pequeno vale da luz de fluorescência entre a posição 2500 e 3000 deste mesmo eixo.

Um fato ainda não muito claro é o aparecimento de uma certa flutuação da intensidade a partir de 1200 nm no mapa de fluorescência da Figura 5B, a caracterização por espectrofluorescência simples dessa amostra leva a crer que não há componente da luz de fluorescência no IR. Entretanto, o mapa feito pela compilação dos 100 espectros, iluminando a amostra pela face C da cubeta e coletando a fluorescência através da face D, indica uma certa atividade de emissão em comprimentos de ondas mais longos do que o esperado. É importante ressaltar, todavia, que um parecer ou diagnóstico final carecem de uma investigação mais aprofundada.

Nas Figuras 6A e 6B nota-se que o vale observado anteriormente entre a luz de excitação e a luz de fluorescência (próximo a 450 nm) nesta configuração de iluminação desaparece. As estruturas que na figura anterior (5A e B) estavam resolvidas, nesta figura aparecem juntas, formando uma estrutura mais alargada e sem diferenciação entre a luz de excitação e a luz de fluorescência. Com a cubeta nesta posição, a luz de excitação passa pela superfície rugosa do porta-amostra, ilumina a amostra pela parte posterior da mesma e a coleta da fluorescência é feita pela face frontal da amostra. Desta forma é de se esperar que a luz de excitação seja absorvida pela amostra e que também seja mais espalhada pelo conjunto formado pelo caminho óptico da amostra e o porta-amostra. No ponto onde está pintada não há fluorescência. Na Figura 6A e em especial na 6B, observa-se o mesmo comportamento anômalo, discutido anteriormente e ainda sem explicação, percebe-se uma flutuação nos grandes comprimentos de onda, a partir de 1000nm.

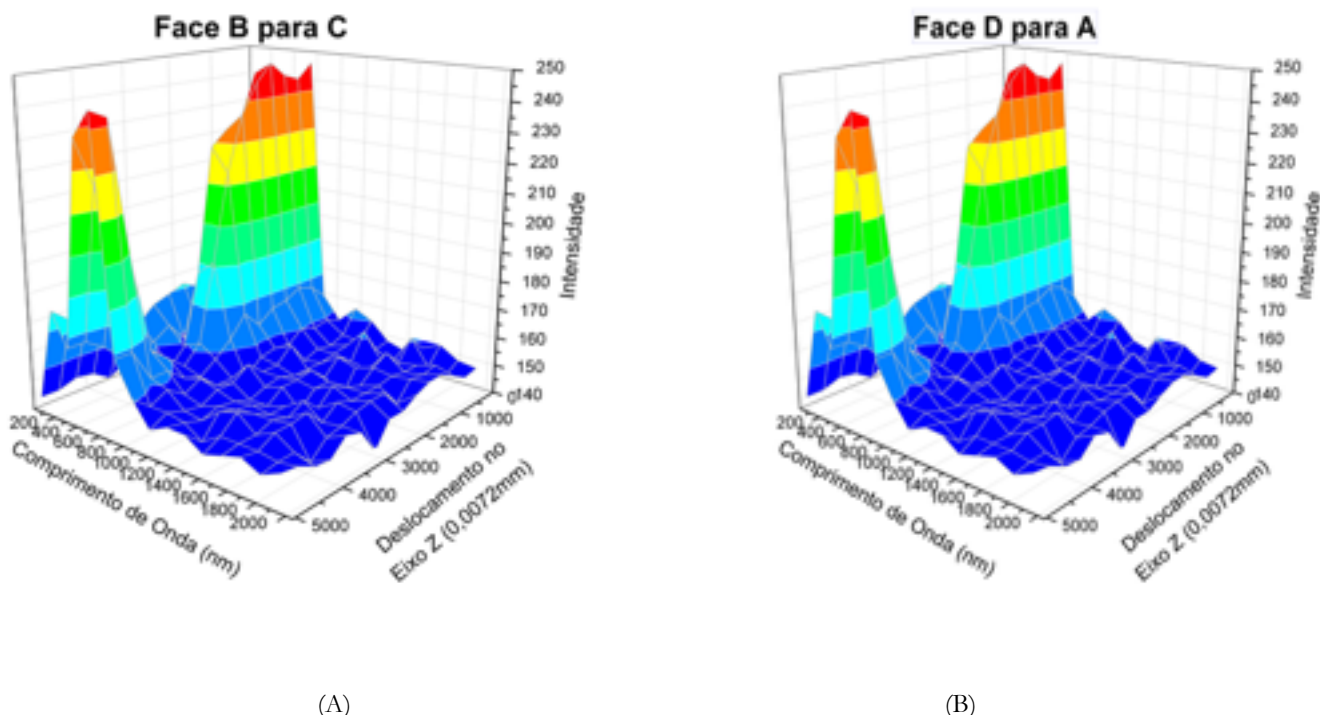


Figura 6 – Superfície Espectral da amostra ao longo do eixo Z da face Lisa para rugosa

A faixa pintada na superfície da amostra criou uma descontinuidade na luz gerada na amostra e, pelo fato de ser de preta, na luz de excitação refletida pela amostra, este fato pode ser observado pela formação dos vales que aparecem nas Figuras 5A e B, 6A e B. Estes vales possuem extensão de aproximadamente de 800 passos, multiplicando este valor pela resolução do sistema de deslocamento (0.0072 mm) chega-se a conclusão que a descontinuidade do caminho ótico é de aproximadamente 5,76 mm, valor muito próximo da largura média da faixa pintada (5,6 mm) mencionada anteriormente. A discrepância relativa observada é de 2,8%, o que demonstra que o equipamento tem a capacidade de, não só analisar a amostra em seu comprimento, como também de determinar com boa exatidão o local e a extensão onde o fenômeno observado ocorre.

5. Conclusão

O equipamento se mostrou capaz de analisar a amostra ao longo do eixo Z e assim levantar uma imagem 2D extensa da dispersão da luz gerada por fluorescência. As informações obtidas demonstraram que a absorção da luz ao longo da amostra e sua fluorescência não são constante o que comprova que a amostra não é homogênea. Os resultados deixam exemplificados que para as mesmas condições de iluminação o equipamento responde praticamente da mesma maneira, ou seja, o equipamento possui repetitividade em função da posição do eixo Z e na posição angular φ . A interferência no caminho ótico criada pela pintura de uma faixa preta na superfície de uma amostra de epóxi, dopado com corante, permitiu comprovar a precisão e exatidão do equipamento em determinar o local onde se havia pintado e a espessura da mesma. O resultado obtido apresenta uma discrepância relativa de 2,8%, o que aumenta a confiança do uso do Spectratomus-UVIS em estudos baseados em espectrofluorescência de amostras e sistemas extensos, onde o fenômeno ótico não ocorre num ponto, mas aparece de forma deslocalizada.

O Spectratomus-UVIS encontra-se na sua versão 1.0, já com patente requerida, outras amostras deverão ser ensaiadas de forma dar continuidade à validação deste equipamento, demonstrando sua capacidade de medir a difusão de espécies químicas em meios sólidos, líquido e gel, percolação dessas espécies em função do meio, micro correntes de difusão e deriva, etc. Os resultados apresentado neste artigo demonstram que esta nova metodologia de análise tem futuro promissor. Em breve este equipamento possibilitará o estudo de micro poros em formação rochosa, concentração de óleo em amostras de solo, qualidade, homogeneidade de substâncias, verificação de tumores em biópsias de tecidos, entre muitas outras aplicações.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESB pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho e ao LaPO (Laboratório de Propriedades Óticas) pelo suporte técnico e pessoal na elaboração deste trabalho e ao IFBA – Instituto Federal da Bahia.

Referencias

- [1] C. Albrecht, "Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 390, no. 5, pp. 1223–1224, 2008.
- [2] G. Guilbault, "Practical fluorescence," 1990.
- [3] G. Guilbault, R. Chen, S. Govindjee, and G. Papageorgiou, "Practical fluorescence: theory, methods, and techniques," 1973.
- [4] P. K. Dasgupta, I.-Y. Eom, K. J. Morris, and J. Li, "Light emitting diode-based detectors," *Analytica Chimica Acta*, vol. 500, no. 1–2, pp. 337–364, Dec. 2003.
- [5] I. UDT Sensors, "Silicon Photodiodes Physics and Technology," no. 02, pp. 1–11, 1982.
- [6] J. Monti and J. Casciero, Performance validation in UV-VIS and fluorescence spectroscopy: it meets specification but does it work?, vol. 6, no. null. Elsevier, 1995.
- [7] L. C. Silva, M. G. Trevisan, R. J. Poppi, M. M. Sena, and U. E. De Campinas, "Metodologia quimiométrica para a determinação direta de propranolol em urina por espectrofluorimetria," pp. 492–497.
- [8] R. Marcelo, R. Ribeiro, S. Fujii, M. Silva, A. B. Nogari, M. Brígida, E. Yurie, S. Ono, O. Kawamura, and E. Y. Hirooka, "Espectrofluorimetria comparada à cromatografia líquida de alta eficiência na detecção de ocratoxina A em café Ochratoxin A detection by spectrofluorimetry compared with high performance liquid chromatography in coffee," *Ciências de Alimentos*, vol. 29, pp. 331–338, 2008.
- [9] P. Neto, L. Rossi, G. Zagonel, and L. Ramos, "Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras," *Química Nova*, vol. 23, no. 4, pp. 531–537, 2000.
- [10] J. Li and P. K. Dasgupta, "A simple instrument for ultraviolet-visible absorption spectrophotometry in high temperature molten salt media," *Review of Scientific Instruments*, vol. 71, no. 6, p. 2283, 2000.
- [11] P. C. Isolani and K. Zinner, "Adaptações em espectrofluorímetro para usos em experimentos não-convencionais," *Química Nova*, vol. 17, no. 1, pp. 65–67, 1993.
- [12] L. Zheng and Y. Hu, "The study of blue LED to induce fluorescence spectroscopy and fluorescence imaging for oral carcinoma detection," vol. 7382, p. 73821B–73821B–6, Jul. 2009.
- [13] R. W. Glenny, Blood flow measurements using fluorescent microspheres, vol. 6, no. null. Elsevier, 1995.
- [14] S. R. Huckins and J. L. Taylor, Bioluminescent determination of TP using the Perkin-Elmer LS-50B & luminometer accessory, vol. 6, no. null. Elsevier, 1995.
- [15] Chien, G. L., C. G. Anselone, R. F. Davis and D. M. Van-Winkle. Fluorescent vs. radioactive microsphere measurement of regional myocardial blood flow. *Cardiovasc Res.* 30:405-12, 1995.



Classification of food vegetable oils by fluorimetry and artificial neural networks



Carlos Eduardo Tanajura da Silva^a, Vitor Leão Filardi^a, Iuri Muniz Pepe^a,
Modesto Antonio Chaves^{b,*}, Carilan Moreira S. Santos^b

^a Optical Properties Laboratory, Institute of Physics, Federal University of Bahia (UFBA) PPGM – Graduate Program in Mechatronics, Rua Barão de Geremoabo, S/N – Campus Ondina, Salvador, Bahia, Brasil

^b CEDETEC Centre for Development and Diffusion of Technologies, State University of Southwest Bahia (UESB) – Graduate Program in Food Science and Engineering, Campus Juvino Oliveira, Itapetinga, Bahia, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2013

Received in revised form

16 May 2014

Accepted 16 June 2014

Available online 26 June 2014

Keywords:

Food quality
Chemometrics
Spectrometry
Vegetable oils quality

ABSTRACT

There is a large variety and trademarks of vegetable oils in Brazil. Vegetable oils have characteristics quite similar to each other and often cannot be distinguished by only observing the color, odor or taste. Methods for classification of these oils are often costly and time consuming and they usually take advantage of techniques from analytical chemistry and mathematical methods such as PCA (Principal Component Analysis), PCR (Principal Components Regression) or PLS (Properties of Partial Least Squares) and ANN (Artificial Neural Networks) to increase their efficiency. Due to the wide variety of products, more efficient methods are needed to qualify, characterize and classify these substances, because the final price should reflect the excellence of the product that reaches the consumer. This paper proposes a methodology to classify vegetable oils like: Canola, Sunflower, Corn and Soybean from different manufacturers. The method used is characterized by a simple mathematical treatment, a light emission diode and CCD array sensor to capture the spectra of the induced fluorescence in diluted oil samples. An ANN that has three layers, each one with 4 neurons is responsible to perform the spectra classifications. The methodology is capable of classifying vegetable oil and allows fast network training using very few mathematical manipulations in the spectra data with 72% a rate of success.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rapid and nondestructive measurements of quality-related parameters in foods are advancing due to progress in spectroscopy and development of new sensor technology including cameras and spectrophotometers (Skjervold et al., 2003). Advances in spectroscopy now enable researchers to obtain information about chemical and physical components in food or biological materials at the molecular level. Various spectroscopic techniques (e.g., atomic absorption spectroscopy, Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy, near infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectroscopy, X-ray fluorescence spectroscopy, ultra-violet spectroscopy) have been used to study

structure-function relationships in foods (both liquid and solid) to improve overall food quality, safety and sensorial characteristics; to investigate fungal infections in plant materials (e.g., fruits, seeds); or to study the mobility of different chemical components in food materials. Processing, analyzing, and displaying these data can often be difficult, time-consuming, and problem-specific. Chemometrics is well established for calibrating the spectral data to predict concentrations of constituents of interest (Ghosh & Jayas, 2009). The fluorescence signals are complex data with fluorophore fingerprints that overlap themselves. Their processing take a long time and require powerful hardware and software (Vasilscu, Marmureanu, & Carstea, 2011). Fluorescence spectroscopy has been investigated among other uses as a tool for quantification of components of meat (Wold, Lundby, & Egelandsdal, 1999), and also related to structural properties of meat and cheese (Dufour, Devaux, Fortier, & Herbert, 2001; Dufour & Frenchia, 2001; Lopez & Dufour, 2001), polyphenolic content in beverages (Andreu-Navarro, Fernandez-Romero, & et al., 2012) and to differentiate yeast and bacterial cells (Bhatta, Goldys, & Learmonth, 2006).

* Corresponding author.

E-mail addresses: eduardotanajura@yahoo.com.br (C.E. Tanajura da Silva), mrfilardi@gmail.com (V.L. Filardi), mpepe@gmail.com (I.M. Pepe), modestochaves@hotmail.com (M.A. Chaves).

Chemometrics is related to all those processes which transform analytical signals and complex data into useful information (Mujica-Ascencio, Moreno-Garcia, Stolik-Isakina, & de la Rosa-Vazquez, 2010). Traditional analysis of fluorescence spectroscopy is either uni- or multi-variate. Univariate analysis focuses in finding a pair of excitation-emission wavelengths where there is only one or a few known components giving rise to the signal. Wold et al. (1999) introduced the advantages of combining fluorescent images with fluorescence spectra.

During the last years, the Artificial Neural Networks and Channels Relationships methods have been frequently used to process spectral signals (Almhdi, Valigi, Gulbinas, Westphal, & Reuter, 2007). Artificial Neural Networks (ANNs) for modeling and simulating have become popular in energy sources, chemical engineering, water treatment, and control domain, among others (Jaafarzadeh, Ahmadi, Amiri, Yassin, & Martinez, 2012). ANN and their application in food chemistry and food science are described by Goyal (2013) and Marini (2009). ANN can be described as a mathematical model of a specific structure, consisting of a number of the single processing elements (nodes, neurons), arranged in inter-connected layers. An active neuron multiplies each input vector by its weight, sums the products and passes the sum through a transfer function to produce the output (Bieroza, Baker, & Bridgeman, 2011). The ANN is made up of a group of inter-connected artificial neurons. It consists of an input, hidden and an output layers. Each layer is also composed of neurons. Each neuron transforms input and sends outputs to other neurons to which it is connected. Weights and bias are determined from the receiving neurons. The network is trained with a subset or dataset of observations and optimized based on its ability to predict a set of known outcomes (Klaypradit, Kerdpi boon, & Singh, 2011).

Marine, Dyer, and Jochemsen (2007) employed a combination of two different neural networks architectures for the resolution of simulated binary blends of olive oils from different cultivars. Cámara, Fernández-Ruiz, Redondo, Sánchez-Mata, and Torrecilla (2012) modeled Lycopene degradation kinetics in tomato-based products using a radial basis network (RBN) obtaining a mean prediction error lower than 2.62% and a correlation coefficient higher than 0.983, they concluded that the RBN mathematical approach proposed can be considered as a reliable tool to monitor the stability of lycopene in tomato products (juices, sauces and ketchups) during its shelf life and may be a useful tool for tomato industry. Scott, James, Ali, O'Hare, and Rowell (2003) used ANNs for pattern recognition of olive oil fluorescence spectra. Chen et al. (2012) used ANN to classify honeys by their near infrared spectra. Groseelj, Vracko, Pierna, Baeten, and Novic (2008) studied olive oil adulteration with hazelnut oils using the Counter-propagation Artificial Neural Networks (CP-ANN) model. Torrecilla, Rojo, Oliet, Domínguez, and Rodríguez (2010) used self-organizing maps and learning vector quantization networks as tools to identify vegetable oils and detect adulterations of extra virgin olive oil.

In the food industry, food safety and quality are considered important issues worldwide that are directly related to health and social progress. Consumers are increasingly looking for trusted brands of food products, and expect manufacturers and retailers to provide high quality products (Gori, Cevoli, Fabbri, Caboni, & Losi, 2012).

Increased consumer awareness of food safety and quality issues has led to the development of new and increasingly sophisticated techniques for food product authentication. However, most of these techniques are time consuming, and require extensive sample preparation and hazardous chemicals as well as skilled and experienced operators (Gori et al., 2012). These disadvantages have prompted for the adoption of new and simpler methods such as fluorimetry.

Due to the large variety of brands and trademarks of vegetable oils in the Brazilian market, it is common not to know for sure if the substance that is being bought is really a product without adulteration. Vegetable oils have characteristics quite similar to each other and often cannot be distinguished by only observing of the color, odor or taste. In this work we propose a method to classify vegetable oils: Canola, Sunflower, Corn and Soybean using a very few mathematical manipulation and ANN – Artificial Neural Networks as a tool to differentiate the fluorescence spectrum of these oils.

2. Material and methods

2.1. Instrument developed

The instrument used in data acquisition is a spectrofluorometer type LED/CCD that has been developed in the Laboratory of Optical Properties (LAPO) at the Federal University of Bahia (UFBA)-Brazil. This equipment is able to obtain fluorescence spectra between 350 nm and 1050 nm. This equipment was patented in 2012 and can be found in the QUIMIS catalog under the ticker Q-798FIL.

The spectrofluorometer schematic diagram is shown in Fig. 1. As a source of excitation light, a LED (Light Emitting Diode) is used. The sample holder can receive standard cuvettes of 3.5 mL, micro cuvette or microscope slides. Fluorescence light collection is made at 90° from the light source excitation at a fixed distance. The LED emits light with short wavelength on the sample, which, in its turn, emits fluorescent light at another wavelength. The detector captures both the fluorescence light from the sample and the scattered light of the LED optical system.

The LED used as the excitation light source was manufactured by Nichia Corp. Am. (part number NSPu510CS) type ub9. The choice of this particular LED is due to its known ensured traceability (a nearly Gaussian emission profile centered at 382 nm, with a width of 13.054 nm) that guarantees the quality of the light source and ensure standard exchange for maintenance.

2.2. Samples

At local shops in the city of Salvador, one can find 10 trademarks of vegetable oils. Some of them produce more than one kind of vegetable oil. Choosing four vegetable oils (Canola, Sunflower, Corn and Soybean) they can be grouped at 6 different trademarks for each vegetable oil. Twenty dilutions were produced for each oil,

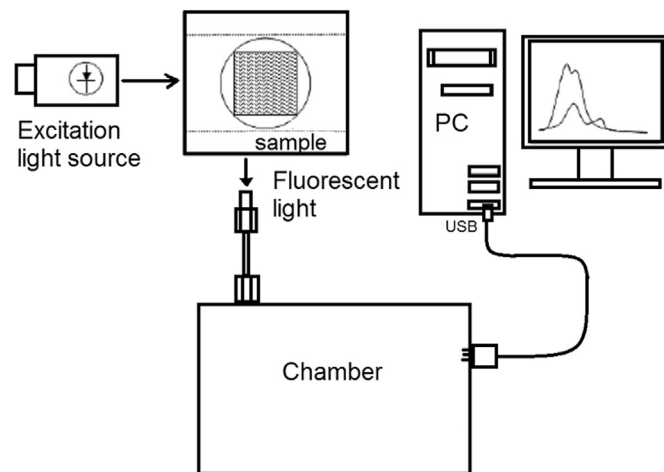


Fig. 1. Diagram of the spectrofluorimeter LED/CCD Q-798FIL.

generating a total of 480 samples. They were used to train the neural network. To build the validation set we produced, with the same methodology, 160 extra samples from another lot, using 2 trademarks for each oil. Each sample was achieved by dilution of the vegetable oil in heptane (C₇H₁₆), with a volume of 30 mL and concentration of the vegetable oil ranging from 5% to 100% in steps of 5%.

The heptane was chosen because of its large power of oil dilution and it is relatively easy to find with high purity and absence of residues that could contaminate the samples (Souza et al., 2004). Besides that, heptanes do not show fluorescence induced by the excitation light used. The heptane used is marketed and distributed by VETEC INC. under code 189, type PA (mixture of isomers).

To validate the network and the classification method developed, oils of the same brands used during training were used but from different manufacturing batches.

2.3. Data acquisition and treatment

The fluorescence spectra were acquired using as source of excitation a 382 nm light-emitting diode. In order to perform the fluorescence light collection the CCD was kept active for 1000 milliseconds. This period is called integration time which it is the time for charging the MOS structure of each CCD pixel. The CCD works like an "almost capacitor" being charged with the electrons coming from its active outer layer where photoelectric effect occurs. This process results in the accumulation of information brought by the fluorescence photons, in the form of electrical charge. At the end of the integration time the device (or CCD pixel array) is emptied of its contents. The voltage accumulated in each pixel is applied to the input of an analog to digital converter (ADC) that converts the voltage value in a digital word, generating a two-dimensional array with the wavelength data (pixel number) and the intensity of light (quantity of charge in each pixel).

Independent of the fluorescence technique and type of measurement i.e., spectrally resolved or integrated over a small wavelength interval, the final signal is affected by both the fluorescent analyte(s) and the instrument (Resch-Genger et al., 2005). In cases where the contribution of the lamp scatter profile is minimal, for instance, transparent solutions measured using right-angle geometry, the intensity enhancement of fluorimetric light results in a significant increase in sensitivity for fluorescence based analysis and detection. However, the advantages of fluorimetric measurement are compromised if the contribution from lamp scatter is appreciable as in the case of translucent solutions. The lamp scatter profile and the fluorescence spectral profile are, however, additive. Thus the lamp scatter profile can be independently obtained for the translucent media and this profile can be subtracted from the overall fluorescence spectrum to obtain a pure fluorescence spectrum. Therefore, software (Microcal Origin 7.0) was used for treatment of the experimental data in order to obtain the fluorescence spectrum free of LED influence. All samples were exposed to light during 15 s to collect the spectral data for each one. Some mathematical operations were performed:

1. Initially, the LED spectrum A was subtracted from the total spectrum obtaining the sample fluorescence called FLU.
2. Afterwards, this FLU was divided by a constant C.

In this work, $C = 10,422.95$ meaning the highest fluorescence intensity obtained for the total of 640 samples (100% corn oil). This division serves to obtain normalized spectra (NOR) facilitating comparisons.

The spectra were limited to the range running from 400 to 700 nm, since the 640 samples studied show no relevant information at 700 nm.

At Filardi, Silva, Santos, Pepe (2012) they used the full spectrum of the samples running from 350 to 1050 nm and the same mathematical treatment of the data used in this work and his input ANN used a set of 88 points of a biodiesel sample fluorescence spectrum. However, the convergence of the network was very slow and could take several hours. To avoid this delay, it was designed a new arrangement of the data to be used as input parameters, where a selection of the characteristics of greatest importance in the fluorescence spectrum was made. After several attempts the characteristics were chosen: intensity of the fluorescence light at 400 nm, the wavelength of the maximum intensity of fluorescence of the sample, intensity of the fluorescence light at 700 nm, sum of the intensities observed at 400 and 700 nm.

2.4. Artificial neural network training

In assembling the ANN, the number of neurons in the hidden layer varied from 3 to 13 in order to achieve the greatest possible of success in classifying samples. It was observed that from 8 neurons in the hidden layer the cases of success were dwindling. The number of neurons in the hidden layer with the highest number of successful cases was four. Various ranges of weights were tested and the highest performance was between 1 and 4000 nm. Using shorter intervals for the weights, the network errors were very disparate.

Fig. 2 illustrates the model of the ANN used in this work, for this training method it was applied the feedforward supervised method. The ANN has three layers, each one with 4 neurons. The output layer describes the substance to be classified as follows: the output of each neuron assumes a binary value 0 (false) or 1 (true) and combinations with more than one neuron with true value are not allowed. Therefore, the possible situations are [1 0 0 0] for Canola, [0 1 0 0] for Sunflower, [0 0 1 0] for Corn and [0 0 0 1] for Soybean.

The neural network was programmed in MATLAB[®]. Many different arrangements and network settings were tested as already said and the strongest performance was the setting with 4 neurons in each layer.

3. Results and discussion

In order to acquire the spectrum A, described above, an empty bucket was placed in the sample holder. In other words, a device with no sample inside. The spectrum of the LED excitation is shown

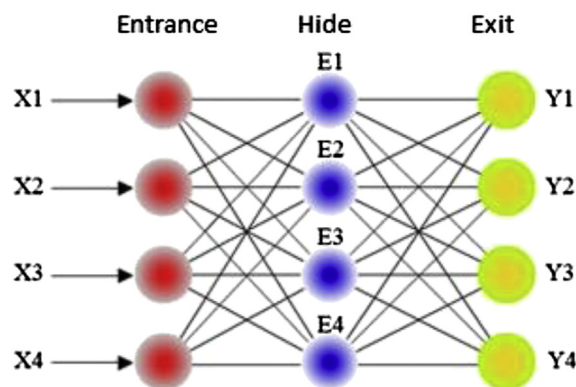


Fig. 2. Artificial Neural Network model.

in Fig. 3. The light reaching the detection fiber is the light scattered by the walls of the bucket. This figure shows that the spectrofluorimeter used is capable of measuring fluorescence light between 350 nm and 1050 nm. For some samples, the observed spectra clearly showed that the presence of the LED light (382 nm) was dependent of the amount of scattered excitation light without interacting with the fluorescent medium. For the different dilutions of the oils, the scattered light from the LED was more prevalent for small concentrations. This phenomenon can be seen in Fig. 4 where the spectra of samples from canola oil (trademark Bom Preço) at dilutions from 5 to 100% are plotted.

The spectra for the excitation light (LED) centered at 382 nm for all vegetable oils used (canola, sunflower, corn and soybean) at the concentration of the 100% are plotted in Fig. 5. The spectra were similar with peaks very close to each other, but the light intensity was quite different. Even very close peaks could be numerically distinguished. Therefore, the fluorescence spectra were very individual and could be used to identify the type of the oil.

Similar spectra were found by [Nikolova, Eftimov, Perifanova, and Brabant \(2012\)](#). These authors used these spectra to group the oils according to their chemical composition. [Mbesse Kongbonga et al. \(2011\)](#) used a Lorentzian profile deconvolution to group vegetable oils according to Vitamin E content also using their fluorescence spectra. In both cases, a large amount of mathematical process was used before the identification. In this work a ANN with few entrance parameters was able to simplify the vegetable oil classification.

Comparing the training time for this methodology to the methodology that was used before in all the spectra ([Filardi et al., 2012](#)) it was found that the network training was 1.2 times faster. As formerly describe the only mathematical treatment made with the spectra was to subtract the LED spectrum from the total spectrum and divide the result by 10.42295. The result of this mathematical treatment is shown in Fig. 6, where the spectra for the different vegetable oils used in ANN training are presented.

Among the 160 samples used in the network test, 115 samples were classified with accuracy and in 45 cases the network was not successful. One possible explanation for this level of the ANN error is the fact that some of the tested oils have radical carbon chains similar to each other; this may create a certain similarity in the fluorescence of these substances. Vegetable oils are composed primarily of triacylglycerols which, in refined oils, can reach over 99% ([Costa, Mafra, & Oliveira, 2012](#)). Therefore, one way to classify

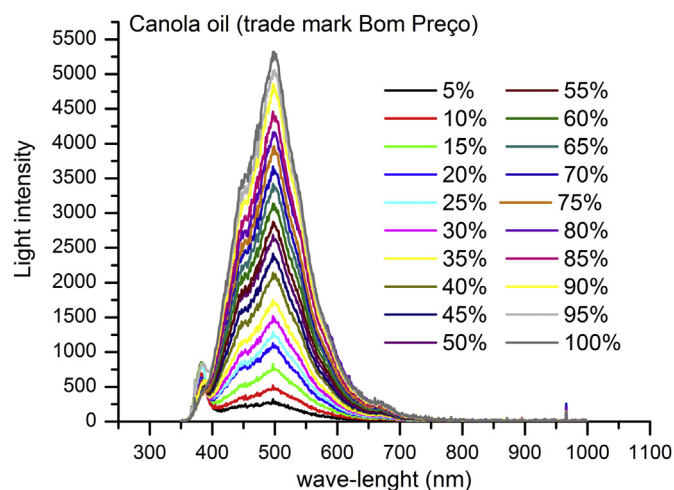


Fig. 4. Light spectra for Canola Oil (trademark Bom Preço) with concentrations ranging from 5% to 100%.

Vegetable oils is to determine the primary fatty acids in its composition and there are 6 possible classifications: lauric, palmitic, oleic, linoleic medium, high linoleic and erucic ([Maurera, Hatta-Sakodab, Pascual-Chagmanb, & Rodriguez-Saonaa, 2012](#)). However, the industrial processing may rearrange the fatty acids and bring some difficulty to classify highly processed vegetable oils using ANN ([Vieira, Pierre, e Castro, 2005](#)). On the other hand, the vegetable oils were not submitted to any kind of chemical analysis test to determine if they were adulterated, but it is worth emphasizing the importance of the quality of the samples, mainly the methodology for its collection and preparation. Other factors such as the optical adjusting characteristics of the fluorimeter and the parameterization of the data acquisition software had to remain the same way throughout the process of fluorescence spectra acquisition. Based in the results found, it became clear that the methodology proposed in this work attended these quality criteria and, therefore, it could ensure a good classification in future works.

Table 1 shows the responses of the ANN in the validation tests. There were two cases in which the method had 100% success (Corn – trademark Mazola and Soybean - trademark Liza), One can see

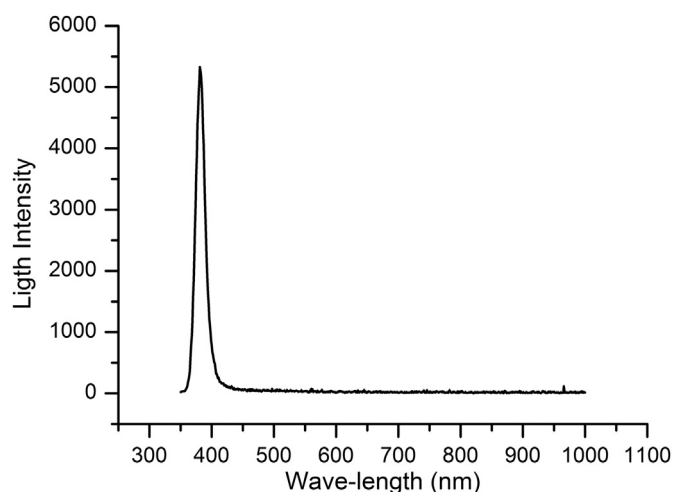


Fig. 3. Light spectrum of the empty fluorimeter (LED spectrum).

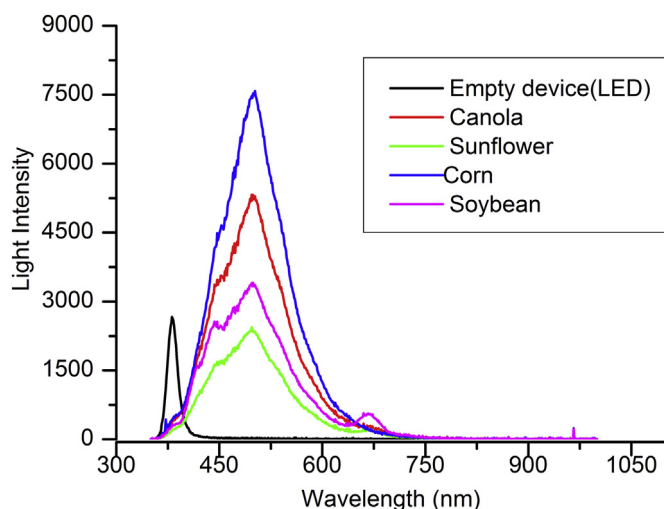


Fig. 5. Light spectra of four vegetable oils and the empty device.

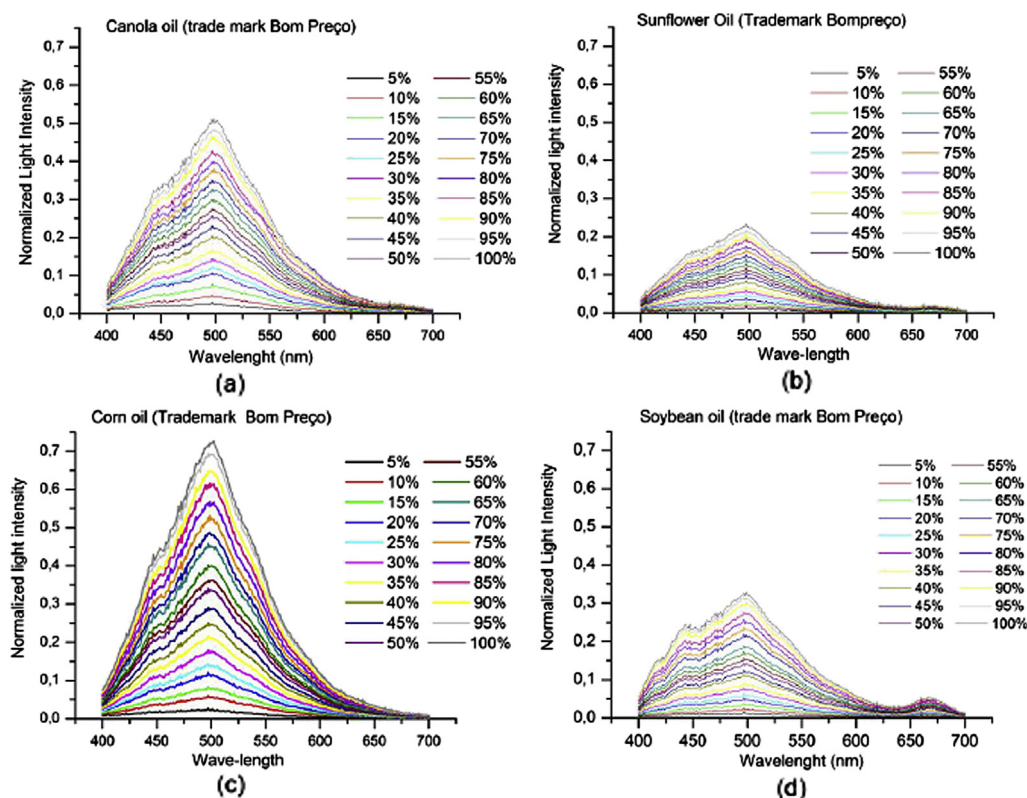


Fig. 6. Spectra of canola, sunflower, com and soybean oils (trade mark Bom Preço) after the mathematical.

that the best results are in corn and soybean oils. The worst result was in the sample of Sunflower oil (trademark Bom Preço), where only 5 samples were correctly classified. During the previous tests, it was observed that the fluorescence spectra of some Sunflower samples were quite similar to samples of canola oil and the network could not distinguish those.

To meet the market needs and to provide uniform product from raw variables, technical modification of oils and fats allow greater flexibility in the choice of raw materials and help to balance the trends between local availability and demand. Among modification techniques we highlight the hydrogenation, which is the most versatile and used processing method, which can change the fatty acid profile of a vegetable oil. Therefore, the processing can lead to oil coming from the same plant may have different physical and chemical characteristics. Processing can also approximate the physical and chemical characteristics of different vegetable oils (O'Brien, 2010). This can be one of the possible causes why for the ANN implemented confused samples of sunflower oil with canola oil, although only a deeper chemical analysis can prove this hypothesis.

Table 1
Responses of the ANN in 160 validation tests.

Trade mark	Oil	Total success in 20 samples
Bom Preço	Canola	17
Qualitá	Canola	10
Bom Preço	Sunflower	5
Liza	Sunflower	18
Salada	Corn	19
Mazola	Corn	20
Liza	Soybean	20
Soya	Soybean	19

4. Conclusion

A methodology based in artificial neural network was developed. This methodology allows fast network training and uses very few mathematical manipulations in the spectra data.

This is a promising technology from the standpoint of the quality control of vegetable oils and can be thought as a starting point to design future studies focused on the resolution of real blends of oils from different cultivars mainly for Corn and Soybean Oils. Sunflower and Canola oils need more studies to improve precision in their classification.

This new methodology by using the most relevant parameters of the fluorescence spectrum as input data for ANN confirms the need for systematic study of the details that characterize the regions of interest over the fluorescence spectrum. Thus, studying the fluorescence of the primary substances that make up the samples to be analyzed, becomes a crucial step in the process of analyzing the information from fluorescence spectra of vegetable oils and other more complex substances.

References

- Almhdi, K. H., Valigi, P., Gulbinas, V., Westphal, R., & Reuter, R. (2007). Classification with artificial neural networks and support vector machines: application to oil fluorescence spectra. *EARSeL eProceedings*, 6.
- Andreu-Navarro, A., Fernandez-Romero, J. M., et al. (2012). Determination of polyphenolic content in beverages using laccase, gold nanoparticles and long wavelength fluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 713, 1–6.
- Bhatta, H., Goldys, E. M., & Learmonth, R. P. (2006). Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(1), 121–126.
- Bieroza, M., Baker, A., & Bridgeman, J. (2011). Classification and calibration of organic matter fluorescence data with multiway analysis methods and artificial neural networks: an operational tool for improved drinking water treatment. *Environmetrics*, 22(3), 256–270.

- Cámara, M., Fernández-Ruiz, V., Redondo, D. F., Sánchez-Mata, M. C., & Torrecilla, J. S. (2012). Radial basis network analysis to estimate lycopene degradation kinetics in tomato-based products. *Food Research International*, 49(1), 453–458.
- Chen, L., Wang, J., Ye, Z., Zhao, J., Xue, X., Heyden, Y. V., et al. (2012). Classification of Chinese honeys according to their floral origin by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 135(2), 338–342.
- Costa, J., Mafra, I., & Oliveira, M. B. P. P. (2012). Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers. *Trends in Food Science & Technology*, 26(1), 43–55.
- Dufour, E., Devaux, M. F., Fortier, P., & Herbert, S. (2001). Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy –relationship with texture. *International Dairy Journal*, 11, 465–473.
- Dufour, E., & Frencia, J. P. (2001). Les spectres de fluorescence frontale – une empreinte digitale de la viande. *Viandes & Produits Carnés*, 22, 9–14.
- Filardi, V. L., Silva, C. E. T., Santos, N. A. C., & Pepe, I. M. (2012). Sistema de identificação e detecção da concentração da mistura diesel/biodiesel por espectrofluorimetria utilizando rede neural. XIX Congresso Brasileiro de Automática.
- Ghosh, P., & Jayas, D. (2009). Use of spectroscopic data for automation in food processing industry. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3(1), 3–11.
- Gori, A., Cevoli, C., Fabbri, A., Caboni, M. F., & Losi, G. (2012). A rapid method to discriminate season of production and feeding regimen of butters based on infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 525–530.
- Goyal, S. (2013). Artificial neural networks (ANNs) in food science – a review. *International Journal of Scientific World*, 1(2), 19–28.
- Groselj, N., Vracko, M., Pierna, J. A. F., Baeten, V., & Novic, M. (2008). The use of FT-MIR spectroscopy and counter-propagation artificial neural networks for tracing the adulteration of olive oil. *Acta Chemical Slavenia*, 55, 935–941.
- Jaafarzadeh, N., Ahmadi, M., Amiri, H., Yassin, M. H., & Martinez, S. S. (2012). Predicting fenton modification of solid waste vegetable oil industry for arsenic removal using artificial neural networks. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(6), 873–878.
- Klaypradit, W., Kerdpi boon, S., & Singh, R. (2011). Application of artificial neural networks to predict the oxidation of menhaden fish oil obtained from fourier transform infrared spectroscopy method. *Food and Bioprocess Technology*, 4(3), 475–480.
- Lopez, C., & Dufour, E. (2001). The composition of the milk fat globule surface alters the structural characteristics of the coagulum. *Journal of Colloid Interface Science*, 233, 241–249.
- Marine, J.-C. W., Dyer, M. A., & Jochemsen, A. G. (2007). MDMX: from bench to bed side. *Journal of Cell Science*, 120, 371–378.
- Marini, F. (2009). Artificial neural networks in foodstuff analyses: trends and perspectives a review. *Analytica Chimica Acta*, 635(2), 121–131.
- Maurera, N. E., Hatta-Sakodab, B., Pascual-Chagmanb, G., & Rodriguez-Saonaa, L. E. (2012). Characterization and authentication of a novel vegetable source of omega-3 fatty acids, sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Food Chemistry*, 134(2), 1173–1180.
- Mbesse Kongbonga, Y. G., Ghalila, H., Boyomo Onana, M., Majdi, Y., Ben Lakhdar, Z., Mezlini, H., et al. (2011). Characterization of vegetable oils by fluorescence spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*, 2(7), 692–699.
- Mujica-Ascencio, C., Moreno-Garcia, E., Stolik Isakina, S., & de la, Rosa-Vazquez (2010). Fluorescence spectroscopy and chemometric techniques to identify compounds in a mixture. In: *Electronics, Communications and Computer (CON-IELECOMP), 2010 20th International Conference on. IEEE* (pp. 136–141).
- Nikolova, K., Eftimov, T., Perifanova, M., & Brabant, D. (2012). Quick fluorescence method for the distinguishing of vegetable oils. *Journal of Food Science and Engineering*, 2, 674–684.
- O'brien, R. D. (2010). *Fats and oils: formulating and processing for applications*. Crc Press.
- Resch-Genger, U., Hoffmann, K., Nietfeld, W., Engel, A., Neukammer, J., Nitschke, R., et al. (2005). How to improve quality assurance in fluorometry: fluorescence-inherent sources of error and suited fluorescence standards. *Journal of Fluorescence*, 15(4), 337–362. <http://dx.doi.org/10.1007/s10895-005-2630-3>.
- Scott, S. M., James, D., Ali, Z., O'Hare, W. T., & Rowell, F. J. (2003). Total luminescence spectroscopy with pattern recognition for classification of edible oils. *Analyst*, 128(7), 966–973.
- Skjervold, P. O., et al. (2003). Development of intrinsic fluorescent multispectral imagery specific for fat, connective tissue, and myofibers in meat. *Journal of Food Science*, 68(4), 1161–1168.
- Souza, J. C., Costa, J. L. O., Lima, A. G., Pontes, L. A. M., Guimarães, P. R. B., Sobrinho, E., et al. (2004). Validação do uso do n-heptano recuperado na análise de goma lavada em gasolina automotiva. *Revista Analytica*, 25–29.
- Torrecilla, J. S., Rojo, E., Oliet, M., Domínguez, J. C., & Rodríguez, F. (2010). Self-organizing maps and learning vector quantization networks as tools to identify vegetable oils and detect adulterations of extra virgin olive oil. In S. Pierucci, & G. B. Ferraris (Eds.), *Computer aided chemical engineering* (pp. 313–318). Elsevier.
- Vasilcsu, J., Marmureanu, L., & Carstea, E. (2011). Analysis of seawater pollution using neural networks and channels relationship algorithms. *Romanian Journal of Physics*, 56(3–4), 530–539.
- Vieira, F. C. V., Pierre, C. T., & e Castro, H. F. (2005). Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática, in Unicamp. In VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (pp. 1–6).
- Wold, J. P., Lundby, F., & Egelandsdal, B. (1999). Quantification of connective tissue (hydroxyproline) in ground beef by autofluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, 64(4), 377–385.

SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO E DETECÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA MISTURA DIESEL/BIODIESEL POR ESPECTROFLUORÍMETRIA UTILIZANDO REDE NEURAL

VITOR LEÃO FILARDI*, CARLOS EDURADO TANAJURA DA SILVA*, NÁDIA ALESSANDRA CARMO DOS SANTOS†, IURI MUNIZ PEPE*

*Laboratório de Propriedades Óticas, Instituto de Física, Universidade Federal da Bahia
PPGM - Programa de Pós-Graduação em Mecatrônica - Rua Barão de Geremoabo, S/N - Campus Ondina - Salvador, Bahia

†Laboratório de Propriedades Óticas, Instituto de Física, Universidade Federal da Bahia
PEI - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Industrial - Rua Aristides Novis, 02, Federação - Salvador, Bahia

Emails: mrfilardi@gmail.com, eduardotanajura@yahoo.com.br, nadia.alessandra@gmail.com, mpepe@gmail.com

Abstract— Across the world biodiesel is offered as a mixture of diesel and biodiesel. In Brazil, all vehicles transporting heavy loads by 2013 will have to use the bio-fuel called B5, which means a composition of 95% diesel oil and 5% biodiesel. The diesel/biodiesel proportion has a direct influence on the engine performance, rate of pollutant emission and in the cold flow properties of the fuel. This paper presents an innovative approach able to identify and determine the concentration of diesel and biodiesel in the mixture by spectrofluorimetry, applying an artificial neural network for pattern recognition. By using a small biodiesel sample, this methodology allows one to determine the mixing ratio and identify the raw material used in the biodiesel production. This method does not use chemical additives or chemical processes to prepare the sample (derivatization), sample can be directly analyzed by the equipment. Samples presenting no adulteration can return to the tank and be used as fuel again. The fluorescence spectrum of the diesel and biodiesel has a unique signature, from this signature an artificial neural network was trained to identify and classify different biodiesel's. The results for a small number of samples on raw material identification was 90%, on the other hand, the neural network had 50% success on titration of the diesel-biodiesel mixture.

Keywords— Biodiesel, Diesel, Artificial Neural Network, Spectrofluorimetry

Resumo— Em todo o mundo o biodiesel é oferecido como uma mistura de óleo diesel com biodiesel. No Brasil, todos os veículos de transporte de cargas até 2013 serão obrigados a usar o combustível conhecido como B5, ou seja, uma composição de 95% de óleo diesel e 5% de biodiesel. Este nível de concentração tem influência direta no rendimento do motor, na taxa de emissão de poluentes e nas propriedades de fluidez a frio do combustível. Neste artigo, apresenta-se uma proposta inovadora capaz de identificar e determinar a concentração dessa mistura diesel/biodiesel por espectrofluorimetria aplicando uma rede neural artificial. Tal metodologia permite que com uma pequena quantidade de amostra do biodiesel possamos determinar a proporção da mistura e identificar a matéria-prima que foi utilizada na fabricação do mesmo. Este método não utiliza aditivos químicos ou processos químicos para preparar a amostra (derivatização). A amostra utilizada pode ser analisada diretamente no equipamento. Por não adulterar a amostra a mesma pode ser devolvida ao tanque ou reutilizada no veículo. O espectro de fluorescência do diesel e do biodiesel tem uma assinatura padrão e a partir dessa assinatura padrão foi aplicada uma rede neural artificial para identificar e classificar esse biodiesel. Os resultados encontrados para uma pequena quantidade de amostras apresentam uma taxa de acerto de 90% para identificação da matéria-prima utilizada na fabricação do biodiesel e de 50% para a titulação da mistura.

Palavras-chave— Biodiesel, Espectrofluorimetria, Diesel, Biocombustíveis, Rede Neural Artificial.

1 Introdução

Na busca por alternativas renováveis para os combustíveis derivados do petróleo, o biodiesel tem se mostrado como o mais promissor. O biodiesel é um combustível quimicamente formado por ésteres de ácidos graxos e alquila (metila, etila ou propila). O grande interesse no biodiesel se deve ao fato dele ser um combustível menos poluente, menos agressivo ao ambiente, biodegradável e renovável. A sua fabricação é simples, podendo ser obtido através da reação química dos lipídios: óleos ou gorduras de origem animal ou vegetal, com um álcool, na presença de um catalisador, processo conhecido como transesterificação. Outros processos podem ser

utilizados como craqueamento e esterificação para a sua fabricação.

As misturas de biodiesel e diesel derivado do petróleo são comumente distribuídas no mercado de varejo de combustível sob o nome comercial de biodiesel. Em todo o mundo utiliza-se um sistema padronizado conhecido como “fator B” para indicar a quantidade de biodiesel na mistura combustível:

- Biodiesel a 100% é referido como **B100**
- Biodiesel a 20% é rotulado **B20**
- Biodiesel a 5% é rotulado **B5**
- Biodiesel a 2% é rotulado **B2**

O governo brasileiro estabeleceu que até 2013 todos os veículos de carga deverão utilizar o biodiesel B5 e já se fala em aumentar para B10 até 2020.

A importância de se identificar o percentual da mistura biodiesel/diesel está diretamente relacionada com as recomendações dos fabricantes e ao próprio desempenho do motor. O ponto de sublimação, ponto de ignição e a fluidez de biodiesel são geralmente maiores do que no diesel, o que melhora o desempenho do motor. Em contra partida, um maior percentual de mistura faz com que este bicombustível seja inadequado ou de difícil queima em condições de tempo frio, abaixo de -12°C . Nessas temperaturas são necessários ajustes na temporização da injeção do motor a fim de melhorar a emissão dos gases de queima e seu desempenho. O ajuste automático desse parâmetro poderia ser feito em função da detecção automática do percentual de mistura do combustível encontrada no tanque do veículo ((Tat and Van Gerpen, 2003) e (Zawadzki et al., 2007)).

Hoje no Brasil o interesse maior na caracterização automatizada da mistura diesel-biodiesel é a criação de um método/equipamento simples, rápido e eficaz, capaz de tipificar este bio-produto, tanto no que diz respeito à fração misturada ao diesel, quanto ao que concerne a matéria-prima utilizada em sua fabricação.

A Agência Nacional de Petróleo (ANP) nos últimos anos tem buscado melhorar os métodos de análise da qualidade e outras formas de identificar adulterações nos combustíveis comercializados no país. Em 2000, estudos da ANP mostraram que 12.5% das amostras de gasolina e 7.3% das amostras de diesel, coletadas em território brasileiro, apresentaram alguma forma de adulteração. Apesar desse percentual ter diminuído nos últimos anos, o problema ainda persiste (Oliveira et al., 2007).

Fatores como a composição da matéria-prima (óleo ou gordura) para fabricação de biodiesel, o processo de produção (reação químicas e catalisadores), as etapas de purificação do produto final e o armazenamento deste produto podem influenciar na qualidade final do biodiesel. A avaliação da qualidade do biodiesel é feita hoje pela determinação da composição química e a investigação de suas propriedades físicas. De fato, alguns contaminantes e outros componentes de menor relevância são os principais vilões quando o assunto é a qualidade do biodiesel, isso porque este bicombustível pode sofrer modificações ao longo do seu tempo de armazenamento, ou por erros básicos no seu manuseio. Por exemplo, num sistema de armazenamento ou transporte inadequado, o biodiesel pode absorver água ou sofrer oxidação, alterando assim a sua qualidade

(Monteiro et al., 2009).

A qualidade do biodiesel vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa utilizando, tanto métodos químicos analíticos convencionais, quanto métodos estatísticos ou matemáticos tais como: PCA (*Principal Component Analysis*), PCR (*Principal Components Regression*) ou PLS (*Properties of Partial Least Squares*) e RNA (Redes Neurais Artificiais). Além disso, o acompanhamento da reação de transesterificação, aliado à determinação do percentual da mistura são aspectos importantes na análise deste combustível ((Soares et al., 2009), (Corgozinho et al., 2008)).

Os parâmetros mais importantes de biodiesel (mono-alquil ésteres graxos, ácidos graxos livres, glicerol e seus acil derivados) são comumente analisados por cromatografia gasosa (GC - *Gas Chromatography*) e por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*). Na verdade, GC tem sido a técnica mais utilizada, devido à sua alta precisão para a quantificação dos componentes minoritários e também pela natureza das amostras. Entretanto, a variação da linha de base, a sobreposição dos sinais, o envelhecimento dos padrões utilizados e das amostras podem afetar severamente a precisão do GC (Monteiro et al., 2008).

Além disso, análises de GC frequentemente requerem derivatização da amostra, o que exige mais de uma etapa no processo de análise, que depende de reagentes relativamente caros. Embora este procedimento melhore a separação cromatográfica, aumenta também o tempo de análise. Os detectores de ionização em chama (FID) são os mais utilizados em GC, mas a utilização de um espectrômetro de massa acoplada ao GC também aumenta a sua precisão. Com isso, sua aplicação elimina quaisquer ambiguidades sobre a identificação dos materiais amostrados, apesar de não ser o instrumento mais adequado para a quantificação, que pode ser afetada pelos fatores mencionados anteriormente ((Knothe, 2001), (Cooper et al., 1997) e (Veras et al., 2010)).

Análise por HPLC é menos empregada na caracterização de biodiesel, entretanto apresenta um tempo de análise bem mais curto se comparada com a GC, sem a necessidade de derivatização da amostra. Além disso, esta técnica pode ser aplicada em diferentes tipos de matérias-primas do biodiesel, sendo mais apropriada para análise da proporção da mistura biodiesel/diesel do que o GC (Sinfield et al., 2010).

Análises espectroscópicas são mais utilizadas para o monitoramento da reação de transesterificação e para a determinação da proporção da mistura. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*) e as várias técnicas

baseadas em espectroscopia de infravermelho (IR - *Infrared*) são comumente aplicadas no estudo espectroscópico do biodiesel. NMR é uma técnica excelente, mas os custos da instrumentação e de sua manutenção são relativamente elevados (Mahamuni and Adewuyi, 2009).

A aplicação dos métodos estatísticos de análise de dados está, quase sempre, associada a pelo menos um método de química analítica convencional. A obtenção de informações a partir desses dados envolve a análise de um número considerável de variáveis. Sendo que, frequentemente, apenas um pequeno número destas variáveis tem maior importância, o restante do conjunto de dados pode ser redundante ou não ter maior relevância. A análise por PCA, PCR e PLS são métodos amplamente utilizados na análise de dados em química. Estes métodos têm por objetivo reduzir o número de dimensões do conjunto de dados sem a perda das informações relevantes. Obtendo um novo conjunto de parâmetros com menor número elementos, facilitando a interpretação dos dados.

Em outros casos, onde se verifica a existência de um comportamento padrão no conjunto de dados, pode-se aplicar um algoritmo capaz de reconhecer padrões e assim classificá-los. Um dos métodos mais utilizados para o reconhecimento de padrões é RNA (Pontes et al., 2011), (Perez et al., 2000).

Nos dois últimos anos uma equipe de pesquisadores do LaPO (Laboratório de Propriedades Óticas) da UFBA (Universidade Federal da Bahia), financiados pelo CNPq e FAPESB, em parceria com a empresa Quimis Aparelhos Científicos Ltda., desenvolveu um espectrofluorímetro do tipo LED/CCD. Este equipamento é capaz de obter espectros de fluorescência entre 339 nm e 1030 nm. Os estudos preliminares da determinação da qualidade de biodiesel e adulterações, usando este equipamento, serão mostrados a seguir. Esse novo método de obtenção do espectro de fluorescência do biodiesel tem aberto novas possibilidades de análise rápida deste bio-produto quando associado ao método RNA. Assim como no HPLC, na espectrofluorimetria não é necessário a derivatização da amostra e o resultado pode ser obtido em questão de minutos.

Esse equipamento de patente nacional estará em breve no catálogo da QUIMIS sob o código Q-798FIL. Estando agora em processo de validação para a produção em série.

2 Espectrofluorímetro LED/CCD

O espectrofluorímetro LED/CCD é um equipamento compacto e portátil com a capacidade de monitorar de forma rápida a qualidade de combustíveis como: gasolina,

biodiesel, diesel, suas misturas e adulterações.

Infelizmente os métodos atuais de controle da qualidade de tais insumos não são capazes de apresentar resultados em tempo real, ou com confiabilidade aceitável.

Na Figura 1 é apresentado o diagrama de blocos do Q-798FIL. A fonte de luz de excitação é um LED (*Light Emitting Diode*), o porta amostra pode receber tanto cubetas padrão de 3,5 mL ou lâminas de microscópio e a coleção da luz de fluorescência é feita à 90° em relação à fonte de luz, a uma distância fixa. O LED emite luz com pequeno comprimento de onda sobre a amostra, que por sua vez, emite luz de fluorescência de maior comprimento de onda. Tanto a luz de fluorescência da amostra, quanto parte da luz do LED espalhada serão captadas pelo sistema ótico do detector.

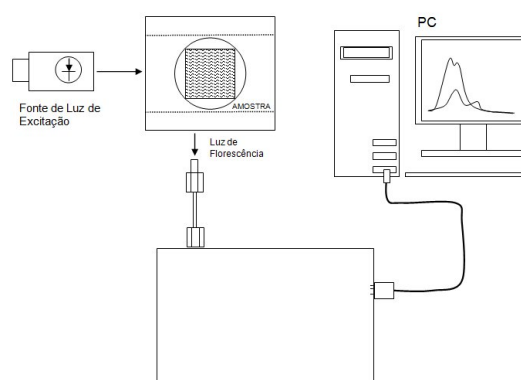


Figura 1: Diagrama de funcionamento do espectrofluorímetro.

Com este detector ligado a uma entrada USB (*Universal Serial Bus*) de um computador pessoal e usando um software de comunicação e de interface homem-máquina (IHM), é possível obter em tempo real o espectro de fluorescência das amostras. Na Figura 2 é apresentado o espectro da luz de excitação de um LED UV de 393 nm. Para variar o comprimento de onda de excitação, basta trocar de LED.

Este método de obtenção da fluorescência da amostra difere dos outros, pois os espectrofluorímetros clássicos, existentes no mercado, utilizam uma única fonte extensa de luz, capaz de emitir em uma faixa larga do espectro luminoso (UV-visível ou visível-IR). Essa luz passa por uma rede de difração para se obter um determinado comprimento de onda ou são utilizados filtros de interferência na seleção da luz de excitação.

Os espectrômetros baseados em rede de difração também estão presentes na etapa de detecção dos espectrofluorímetros clássicos. A perda de luz nos elementos de ótica e nas redes de difração, ou nos filtros óticos, é muito grande, o que obriga o uso de fotomultiplicadoras

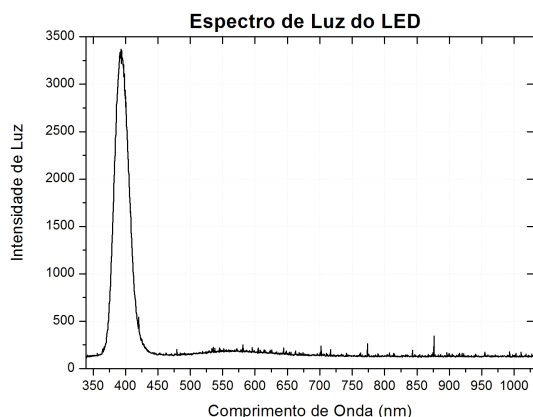


Figura 2: Espectro de luz do LED de excitação em 393nm.

frágeis, volumosas e custosa nos equipamentos convencionais. O Q-798FIL, onde a perda de intensidade na ótica é consideravelmente menor, usa como detector da luz de fluorescência uma pastilha do tipo CCD, com resolução de 0,3 nm.

3 Metodologia utilizada na preparação das amostras de biodiesel

Com a intenção de aplicar uma metodologia controlada e repetível para os primeiros ensaios do equipamento foram produzidos, em laboratório, amostras dos biodieseis utilizados nas análises de fluorescência. Isto pelo fato de que para o biodiesel comercial não se sabe qual o tipo da matéria-prima utilizada em sua fabricação, ou quais aditivos químicos foram adicionados para a sua conservação (de Vasconcelos et al., 2012).

Neste trabalho para a preparação do biodiesel foi utilizado óleo comercial de Canola (A), Girassol(B), Milho (C), Soja (D) e Oliva (E), metóxido de potássio recentemente preparado, metanol, hidróxido de potássio (KOH), sulfato de sódio anidro, ácido clorídrico e cloreto de sódio (NaCl).

3.1 Preparação do Biodiesel

A solução de metóxido de potássio foi preparada, em laboratório, dissolvendo-se 0,75 g de hidróxido de potássio em 17,5 mL de metanol com o auxílio de agitação magnética e controle de temperatura (45 °C), até a completa dissolução de KOH.

Para a reação de transesterificação foi utilizado um balão de fundo chato (250 mL) onde foram adicionados 50 mL do óleo, para cada um dos óleos vegetais. Esse material foi aquecido em banho-maria, sob agitação com o auxílio de um agitador magnético, até atingir a temperatura de 45 °C. Em seguida, foi adicionada a solução de metóxido de potássio recentemente preparada, e a mistura reacional permaneceu por dez minutos a 45 °C sob agitação (Geris et al., 2007).

3.2 Purificação do biodiesel

Posteriormente, a mistura reacional foi transferida para um funil de separação, permitindo a decantação e separação das fases. A fase superior contendo biodiesel e a inferior composta de glicerol, sabões, excesso de base e álcool. O tempo de espera para a separação das fases foi de quinze minutos.

No funil de separação foram realizados os procedimentos de lavagem, inicialmente com 25 mL da solução aquosa de ácido clorídrico a 0,5% (v/v). Em seguida, uma lavagem com 25 mL de solução saturada de NaCl e, finalmente, com 25 mL de água destilada. A ausência do catalisador básico no biodiesel foi confirmada pela medida do pH da última água de lavagem, que apresentou um pH neutro. Nos casos em que houve a formação de emulsão, esta foi desfeita com auxílio de um bastão de vidro, agitando-se lentamente a camada emulsificada. O tempo gasto para os procedimentos de lavagem foi de uma hora e trinta minutos. Para remoção dos traços de umidade, o biodiesel foi filtrado utilizando-se sulfato de sódio anidro e transferido para um frasco de amostra, para armazenamento e posterior análise. Os diferentes biodieseis aparecem como um líquido límpido.

4 Aquisição e tratamento dos dados

A aquisição de dados foi realizada utilizando o Q-798FIL, munido de um LED de 393 nm como fonte de excitação, o CCD esteve ativo por 150 ms, período denominado de tempo de integração. Ao final deste intervalo de tempo o dispositivo adquire a resposta da amostra, gerando uma matriz de dados composta pelo comprimento de onda (variável independente) e a intensidade de luz para cada comprimento de onda (variável dependente). Na Figura 3 pode-se visualizar o conjunto de dados brutos a partir da fluorescência adquirida pelo equipamento.

A metodologia usada na análise dos dados de fluorescência inclui um tratamento matemático simples, que busca obter espectros puros de fluorescência. Utilizando inicialmente o programa OriginLab v.7.0 é aplicado o procedimento matemático descrito abaixo através das equações 1 à 5.

Inicialmente foi tomado o espectro da amostra (A). Foi realizada a soma das contribuições da intensidade associada a cada comprimento de onda (SOMA). Em seguida o espectro é dividido pelo valor da soma e multiplicado por 100. A esse novo conjunto de pontos dá-se o nome de espectro normalizado (Norm). A partir do espectro normalizado é encontrada a contribuição do pedestal ou *offset* do espectro. Esse número médio foi abatido do espectro normalizado. Para

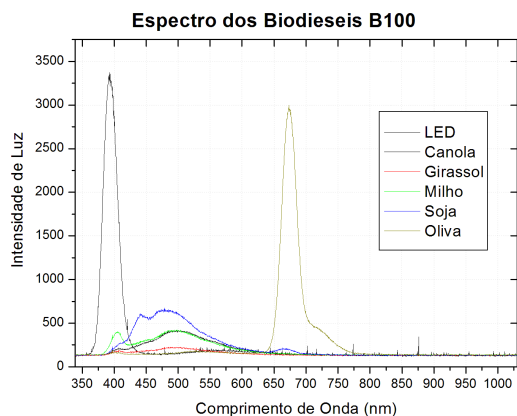


Figura 3: Espectrofluorescência dos biodieseis excitados com 393 nm e tempo de integração de 150ms.

evitar divisões por zero é somado a este espectro o valor de 0,01 a todos os comprimentos de ondas do espectro, resultando em **FLU**. Após as etapas descritas resulta na fluorescência pura da amostra, sem a luz espalhada do LED, sem picos espúrios e com *offset* padronizado em 0,01.

$$A = \text{EspectroAmostra} \quad (1)$$

$$\text{Soma} = \sum A \quad (2)$$

$$\text{Norm} = \left(\frac{A}{\text{Soma}} \right) \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Offset} = \text{MenorValor}(\text{Norm}) \quad (4)$$

$$\text{FLU} = (\text{Norm} - \text{Offset}) + 0,01 \quad (5)$$

Depois de aplicado o tratamento matemático obtém-se as seguintes curvas para cada amostra conforme ilustra a Figura 4.

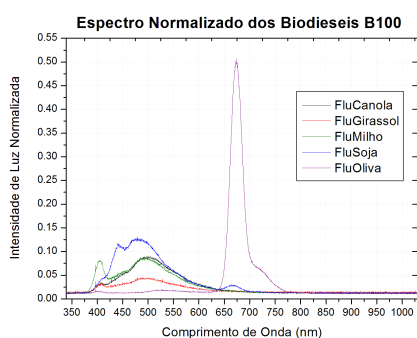


Figura 4: Espectrofluorescência dos biodieseis puros (B100) após o tratamento matemático.

Os espectros de fluorescência dos biodieseis puros (B100) de cada matriz são bastante distintos, como pode ser visto na Figura 4. Entretanto, na medida em que se aumenta a concentração do diesel puro nas amostras, estas perdem algumas das características específicas

e se tornam mais semelhantes entre si, com fluorescência próxima da do diesel puro. Estes novos espectros podem ser vistos na Figura 5.

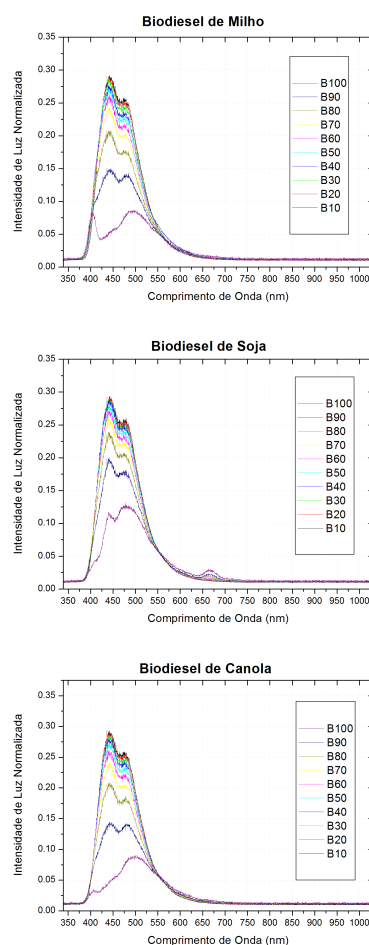


Figura 5: Conjunto dos espectros de fluorescência dos biodieseis de Milho, Soja e Canola normalizados com a variação das concentrações de B100 a B10.

5 Treinamento da rede neural artificial

O treinamento da RNA foi feito utilizando o software MATLAB 7.10.0 (R2010a). Criaram-se duas redes distintas. Uma para identificar a matéria-prima de cada biodiesel e a outra a titulação da mistura biodiesel em diesel. O conjunto de dados aplicado no treinamento de cada rede passou pelo tratamento matemático descrito anteriormente.

O sucesso do método de reconhecimento de padrões por RNA em várias outras áreas do conhecimento, tais como: matemática, engenharia, medicina e muitos outros, motivou o seu uso neste trabalho ((Ramadhas et al., 2006), (van der Smagt, 1991), (Mashford, 1995) e (*Proceedings of the 7th IASTED International Conference on Signal Processing, Pattern Recognition and Applications, SPPRA*

2010, 2010)).

Uma rede neural é uma forma de processamento paralelo-distribuído que tem uma tendência natural de armazenar conhecimento experimental e torná-lo disponível para o uso (Haykin, 1999). Assemelha-se ao cérebro humano em dois aspectos:

- O conhecimento é adquirido pela rede através de um processo de aprendizagem.
- Forças inter-neurônais de ligação, conhecidas como pesos sinápticos, são usadas para armazenar o conhecimento.

5.1 RNA de identificação da matéria-prima

O conjunto de espectros obtidos a partir das diferentes amostras foi agrupado por matéria-prima e suas concentrações variando de B10 a B100. Um exemplo desse conjunto de dados pode ser visualizado na Figura 5. Esta rede foi criada a partir de 50 amostras, sendo 40 amostras para treinamento e 10 para validação. Destas 10 amostras, foram selecionadas duas de cada matéria-prima. No treinamento realizado aplicou-se o método *feedforward* supervisionado.

O conjunto de dados da camada de entrada foi reduzido para 88 pontos, aplicando uma média entre os pontos, conforme ilustrado na Figura 6. Trabalhar com espectros com 2048 pontos não seria computacionalmente viável e comprometeria a convergência da rede como foi comprovada em ensaios anteriores.

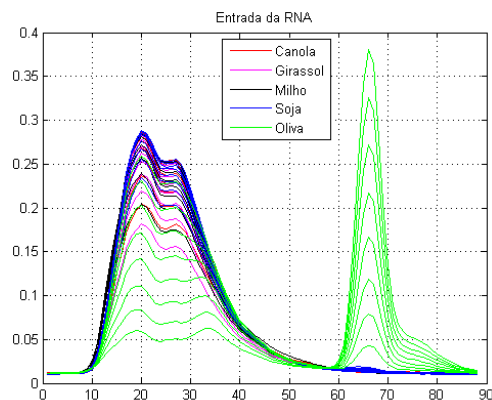


Figura 6: Conjunto de dados selecionados para a RNA de identificação da matéria-prima do biodiesel.

Para a camada da rede escondida foram testados diversos tamanhos entre 10 e 30. A que apresentou melhor resultado foi a de tamanho 12 e 14, sendo que o tempo de convergência de 12 foi menor do que com 14. Para a camada de saída usou-se a mesma quantidade de matérias-primas, cinco.

Para validar a rede treinada foram escolhidas aleatoriamente duas amostras de cada matéria-prima, conforme ilustra a Figura 7.

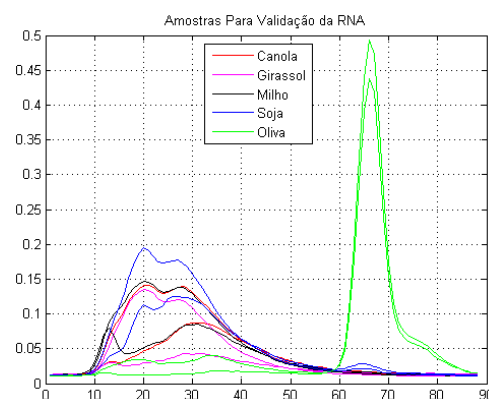


Figura 7: Conjunto de validação para a RNA de matéria-prima do biodiesel.

O resultado obtido nesse treinamento foi de 90% de acerto. A rede conseguiu identificar com precisão todas as matérias-primas Canola, Girassol Milho e Oliva. O erro encontrado foi na matriz Soja, onde uma das amostras foi confundida com a matriz Canola.

5.2 RNA do título do biodiesel em diesel

A matéria-prima Oliva não foi colocada em análise na segunda rede treinada. Isso porque a Oliva difere muito por ter um pico de fluorescência em torno de 675nm (vide Figura 3). Essa diferença fez com que a rede não convergisse, o que inviabilizou ou seu uso nesta etapa.

Para esta segunda rede o conjunto de dados foi agrupado por título independente da matéria-prima. Um exemplo desse conjunto de dados pode ser visualizado na Figura 8. Esta rede, criada com o espectro de quatro amostras para cada concentração, sendo três amostras para treinamento e uma para validação.

O conjunto de dados para essa segunda rede é bem menor se comparado com a rede anterior. Tem-se então um conjunto de quarenta amostras, sendo apenas quatro de cada título.

Os parâmetros utilizados foram similares aos da rede anterior. Foram utilizados 88 pontos para a camada de entrada, na camada escondida foram testados valores entre 10 e 30 e o melhor resultado obtido foi utilizando o tamanho de 15 e na camada de saída tamanho 10, o que corresponde ao número de títulos investigados. Na figura 8 podemos visualizar todos os dados aplicados no treinamento da rede.

Para validar a rede treinada foi escolhido aleatoriamente um espectro de cada título, conforme ilustra a Figura 9. O resultado obtido nesse treinamento foi de 50%. A rede conseguiu identificar com precisão os títulos: B90, B80, B60,

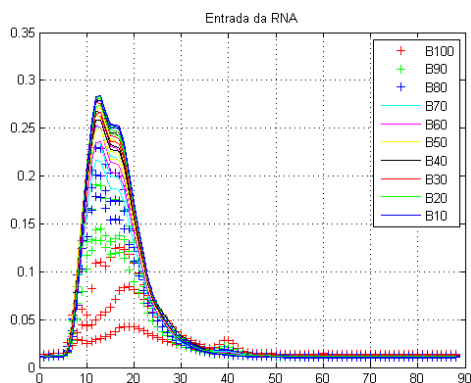


Figura 8: Conjunto de dados selecionados para a segunda RNA agrupadas por título de biodiesel em diesel.

B20 e B10. Três títulos, contados como erros, apresentaram certa proximidade na avaliação da rede. Assim, a mistura B70 foi identificada como B80, já no caso da mistura B50, esta foi confundida com a B60. Finalmente a mistura B30 foi identificada como B40. Os outros erros foram mais discrepantes e sem correlação aparente.

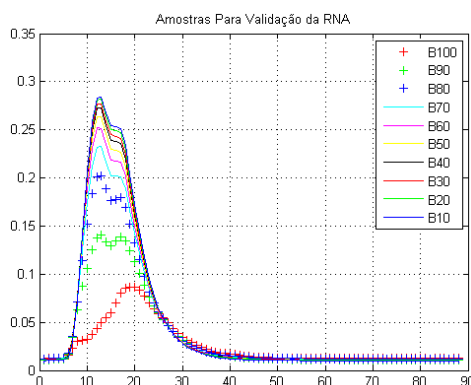


Figura 9: Conjunto de validação para a segunda RNA de título de biodiesel em diesel.

6 Discussões e Conclusões

A fluorescência do biodiesel e dos óleos é causada pela excitação-emissão dos elétrons π das ligações insaturadas geralmente encontradas nas moléculas dos triglicerídeos. Estes lipídeos possuem três cadeias carbônicas como radicais, podendo variar na quantidade de carbonos, nas posições das ligações insaturadas e na quantidade dessas ligações.

Alguns óleos podem ter radicais de cadeias carbônicas iguais ocasionando uma semelhança na fluorescência, como foi o caso da canola, milho e da soja. Estas substâncias têm como componentes principais dos óleos o ácido linoléico e o linolênico (Vieira et al., 2005), o que resultou em certa dificuldade para classificá-los usando RNA sem refinamentos no treinamento.

Os resultados da primeira rede foram relativamente exitosos, mostrando que é possível a utilização do método de RNA para classificar matéria-prima por sua fluorescência. Este sucesso cria a expectativa do uso de RNA na classificação de outras substâncias, não necessariamente combustíveis. Entretanto, um melhor desempenho da rede depende de um conjunto maior de amostras. A pequena quantidade de amostra foi crítica para o desempenho da segunda rede, usada para identificar o título do biodiesel em diesel.

Apesar disso, este método de análise se mostra promissor, bastando para tanto uma base de dados maior e mais robusta, além da troca de experiência com outras equipes e grupos de pesquisa trabalhando na mesma temática.

Aplicar RNA na classificação de substâncias puras ou misturas em análises físico-químicas ainda é uma técnica pouco explorada, sendo pequeno o número de trabalhos publicados nesta linha. Geralmente a química analítica lança mão das técnicas de PCA, ou PLS apenas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq e FAPESB pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, à empresa QUIMIS Equipamentos Científicos Ltda. que foi parceira no desenvolvimento do equipamento.

Referências

- Cooper, J. B., Wise, K. L., Welch, W. T., Sumner, M. B., Wilt, B. K. and Bledsoe, R. R. (1997). Comparison of near-ir, raman, and mid-ir spectroscopies for the determination of btex in petroleum fuels, *Applied Spectroscopy* **51**(11): 1613–1620.
- Corgozinho, C. N., Pasa, V. M. and Barbeira, P. J. (2008). Determination of residual oil in diesel oil by spectrofluorimetric and chemometric analysis, *Talanta* **76**(2): 479 – 484.
- de Vasconcelos, F. V. C., de Souza, P. F. B., Pimentel, M. F., Pontes, M. J. C. and Pereira, C. F. (2012). Using near-infrared overtone regions to determine biodiesel content and adulteration of diesel/biodiesel blends with vegetable oils, *Analytica Chimica Acta* **716**: 101 – 107.
- Geris, R., Santos, N. A. C. d., Amaral, B. A., Maia, I. d. S., Castro, V. D. and Carvalho, J. R. M. (2007). Biodiesel de soja - reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica, *Química Nova* **30**: 1369 – 1373.

- Haykin, S. (1999). *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, Prentice Hall.
- Knothe, G. (2001). Determining the blend level of mixtures of biodiesel with conventional diesel fuel by fiber-optic near-infrared spectroscopy and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **78**(10): 1025 – 1028.
- Mahamuni, N. N. and Adewuyi, Y. G. (2009). Fourier transform infrared spectroscopy (ftir) method to monitor soy biodiesel and soybean oil in transesterification reactions, petrodiesel- biodiesel blends, and blend adulteration with soy oil, *Energy and Fuels* **23**(7): 3773 – 3782.
- Mashford, J. (1995). Neural network image classification system for automatic inspection, Vol. 2, Perth, Aust, pp. 713 – 717.
- Monteiro, M. R., Ambrozini, A. R. P., da Silva Santos, M., Boffo, E. F., Pereira-Filho, E. R., Liao, L. M. and Ferreira, A. G. (2009). Evaluation of biodiesel-diesel blends quality using ¹H nmr and chemometrics, *Talanta* **78**(3): 660 – 664.
- Monteiro, M. R., Ambrozini, A. R. P., Liao, L. M. and Ferreira, A. G. (2008). Critical review on analytical methods for biodiesel characterization, *Talanta* **77**(2): 593 – 605.
- Oliveira, F. C., Brandao, C. R., Ramalho, H. F., da Costa, L. A., Suarez, P. A. and Rubim, J. C. (2007). Adulteration of diesel/biodiesel blends by vegetable oil as determined by fourier transform (ft) near infrared spectrometry and ft-raman spectroscopy, *Analytica Chimica Acta* **587**(2): 194 – 199.
- Perez, C. A., Gonzalez, G. and Salinas, C. (2000). Neural versus difference equation modeling for 2d pattern recognition problems, Vol. 4, Nashville, TN, USA, pp. 2851 – 2856.
- Pontes, M. J. C., Pereira, C. F., Pimentel, M. F., Vasconcelos, F. V. C. and Silva, A. G. B. (2011). Screening analysis to detect adulteration in diesel/biodiesel blends using near infrared spectrometry and multivariate classification, *Talanta* **85**(4): 2159 – 2165.
- Proceedings of the 7th IASTED International Conference on Signal Processing, Pattern Recognition and Applications, SPPRA 2010* (2010). Innsbruck, Austria.
- Ramadhass, A., Jayaraj, S., Muraleedharan, C. and Padmakumari, K. (2006). Artificial neural networks used for the prediction of the cetane number of biodiesel, *Renewable Energy* **31**(15): 2524 – 2533.
- Sinfield, J. V., Colic, O., Fagerman, D. and Monwuba, C. (2010). A low cost time-resolved raman spectroscopic sensing system enabling fluorescence rejection, *Applied Spectroscopy* **64**(2): 201–210.
- Soares, I. P., Rezende, T. F. and Fortes, I. C. P. (2009). Study of the behavior changes in physical-chemistry properties of diesel/biodiesel (b2) mixtures with residual oil and its quantification by partial least-squares attenuated total reflection-fourier transformed infrared spectroscopy (pls/at-ir), *Energy and Fuels* **23**(8): 4143 – 4148.
- Tat, M. E. and Van Gerpen, J. H. (2003). Biodiesel blend detection with a fuel composition sensor, *Applied Engineering in Agriculture* **19**(2): 125 – 131.
- van der Smagt, P. (1991). Comparative study of neural network algorithms applied to optical character recognition, Charleston, SC, USA, pp. 1037 – 1044.
- Veras, G., Gomes, A. D. A., Silva, A. C. D., Brito, A. L. B. D., Almeida, P. B. A. D. and Medeiros, E. P. D. (2010). Classification of biodiesel using nir spectrometry and multivariate techniques, *Talanta* **83**(2): 565 – 568.
- Vieira, F. C. V., Pierre, C. T. and Castro, H. F. (2005). Influência da composição em ácidos graxos de diferentes óleos vegetais nas propriedades catalíticas de uma preparação comercial de lipase pancreática, *in* Unicamp (ed.), *VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, pp. 1–6.
- Zawadzki, A., Shrestha, D. S. and He, B. (2007). Biodiesel blend level detection using ultraviolet absorption spectra, *Transactions of the ASABE* **50**(4): 1349 – 1353.

METODOLOGIA PARA CARACTERIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE LED PARA APLICAÇÕES EM QUÍMICA ANALÍTICA, FLUORIMETRIA E LUZ DE EXCITAÇÃO.

KELLY ABREU¹, IURI PEPE¹, VITOR L. FILARDI¹, GEYDISONDEMETINO¹, JOAO MOREIRA¹.

1. *Laboratório de Propriedades Ótica (LaPO), Universidade Federal da Bahia
Rua Baraao de Jeremoabo, sem numero, Ondina, Salvador Bahia, CEP:40210-340
E-mails: kelly.abreusilva@gmail.com, lapo.if@gmail.com, mrfilardi@gmail.com, jdementino@gmail.com, b2.lapo@gmail.com*

Abstract— This work consists of a development of an experimental methodology for validation and characterization of LEDs in several wave lengths. The wave lengths used were: 398nm which corresponds to the color violet, 470nm which corresponds to the color blue, 587nm to the color yellow, 530nm to the color green and 631nm to the color red. The present work is based in international standards and calibration devices. The methodology consisted of using commercial devices calibrated for other analyses and applying them to obtain the commercial LED characteristics. It was developed in three basic steps. First, a spectrofluorometer was used to obtain the spectrum of response of each LED. The second step was to obtain the amount of radiance through the relationship between the response of a photodiode in mA (miliamperes) and the wavelength of the LED acquired by the spectrofluorometer. This was calculated by a software developed specifically for this application, through the curve of response of the photodiode (SM1PD2A). Later, several measurements were made totalizing 116, in consideration for the angular position of the LED. The range of positioning of the LEDs changes the measured irradiance, that is, the LED emits differently in each direction. This way, a mechanical device was built to allow the study of this irradiance related to the angle. Based on the acquired information, it is possible to certify low price high brightness commercial LEDs for chemical analyses, fluorometry and other applications.

Keywords—Semiconductor, Electroluminescence, LED, Irradiance and spectrofluorometer.

Resumo—Este trabalho consiste no desenvolvimento de uma metodologia experimental para a validação e caracterização de LED em diversos comprimentos de onda. Os comprimentos de onda utilizados foram: 398 nm que corresponde ao violeta, 470nm que corresponde a cor azul, 587 nm cor amarela, 530 nm cor verde e 631 nm cor vermelha. O presente trabalho é fundamentado em normas e aparatos de calibração internacional. A metodologia consistiu em utilizar equipamentos comerciais calibrados para outras análises e aplica-los para obtenção das características de LED comerciais. Desta forma o método foi desenvolvido em três etapas basicamente. Primeiramente utilizou-se um espectrofluorímetro para a obtenção do espectro de resposta individual de cada LED (diodo emissor de luz) em estudo. Na segunda etapa foi a obtenção dos valores da radiancia em $\frac{W}{m^2}$ através da relação entre a resposta do fotodiodo em mA (miliamperes) com o comprimento de onda do LED obtido com o espectrofluorímetro. Este cálculo foi realizado através de um software desenvolvido especificamente para tal com a curva de resposta do fotodiodo (SM1PD2A). Em seguida foram realizadas diversas medidas num total de 116, onde se leva em consideração a posição angular dos LED. A variação da posição dos LED altera a irradiância medida, ou seja, o LED emite diferentemente em cada direção. Assim foi montado um aparato mecânico para que fosse possível estudar essa irradiância em função do ângulo. Com base nas informações obtidas é possível certificar LED de alto brilho comerciais de baixo custo para uso em análise química, fluorimetria e outras aplicações.

Palavras-chave—Semicondutor, Eletroluminescência, LED, Irradiância e espectrofluorimetria.

1 Introdução

A eletroluminescência é um fenômeno óptico e elétrico que envolve a emissão de luz como resposta a passagem de corrente elétrica em um semicondutor. Nos diodos emissores de luz ou a eletroluminescência ocorre quando uma junção P-N diretamente polarizada, se recombina com elétrons do lado N, que acabaram de ultrapassar a junção, com lacunas do lado P. Essa recombinação exige que a energia adquirida pela aceleração do elétron, que até então era livre seja novamente “perdida”. Esta perda de energia ocorre de duas formas, por um processo não radiativo (emissão de fônons), pelo aquecimento de um cristal semicondutor, ou pela emissão de fótons de luz. Nos LED (*Light Emitting Diode*), a transformação de energia elétrica em luz é feita na matéria, sendo por isso seu estudo atribuído ao estudo do estado sólido.

Ao longo de décadas, os LED se mantiveram limitados nas cores vermelho, amarelo e verde, e foram associados às lâmpadas piloto, montadas nos painéis de equipamentos ou mostradores. Porém, nos anos 90, no Japão, se deu início a produção de LED-Dazuis, cuja combinação com os LEDs vermelhos e verdes resultava em luz branca, este fato abriu um campo inteiramente novo para a tecnologia (NAKAMURA, 1996). É possível observar as combinações obtidas a partir das cores primárias, como mostrado na figura 1:

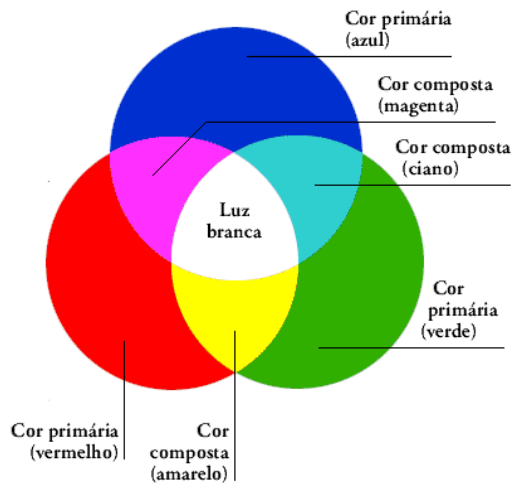


Figura 1: Ilustração da obtenção das cores compostas a partir das primárias.

No entanto, já é possível obter um espectro total do diodo emissor de luz, tornando assim o dispositivo mais generalizado. As aplicações de LED no que se refere à iluminação se mostram mais promissoras que a incandescente já existente. O LED branco é considerado como um forte candidato para tecnologia de iluminação do futuro próximo, se comparado com o método convencional de iluminação, o mesmo tem baixo poder de consumo e baixa tensão, um tempo de vida útil longo, o que promete abranger tanto a iluminação pública e residencial, bem como a iluminação veicular e de máquinas em geral. Uma vez aliado a alta eficiência e a produção de luz deste diodo, estes dispositivos têm uma vida útil pelo menos cerca de vinte e cinco vezes maior que as lâmpadas convencionais e pelo menos dez vezes maior que as lâmpadas de descarga em gás, não sendo difícil visualizar uma substituição da iluminação como conhecemos hoje, por ter se tornado obsoleta diante das novas descobertas (NAKAMURA, 1996). O LED não é apenas usado como dispositivo de iluminação, mas também usado como dispositivo de comunicação. Comunicação óptica sem fio, por exemplo, usa a luz branca como um meio de transmissão, ela é baseada na comutação rápida de LED e na modulação das ondas de luz visível para a comunicação livre no espaço (NAKAMURA, 1996).

2 Diodo PIN

O nome PIN é devido à existência de uma camada I (“intrínseca” – por exemplo, silício sem dopagem) entre as camadas P e N. Quando há polarização direta, lacunas e elétrons são injetados na camada intrínseca I e suas cargas não se anulam de imediato, elas ficam ativas por um determinado período. Isso resulta em uma carga média na camada, que possibilita a condução. Na polarização nula ou inversa, não há carga armazenada e o diodo se comporta como um capacitor em paralelo com a resistência própria do conjunto.

O diodo PIN é fabricado normalmente baseado em semicondutores de silício, que consiste em duas regiões, uma do tipo P e outra do tipo N. Entre estas regiões há uma região intrínseca I de alta resistividade. Para todos os efeitos o diodo PIN pode se comportar como um curto-circuito ou um circuito aberto, quando diretamente polarizado ou inversamente polarizado, respectivamente (BOYLESTAD e NASHELKY, 1999).

Quando polarizados diretamente, os elétrons iniciam o trajeto, pela parte P do diodo, deslocando-se até a junção PI. Os fótons incidem nos átomos da parte I transferindo elétrons para a banda de condução e criando assim buracos na banda de valência. Estes buracos recebem elétrons que chegam da parte P. Esses elétrons absorvem a energia dos fótons e se transferem também para a banda de condução e assim sucessivamente. Desta maneira ocorre o estabelecimento de uma corrente elétrica que só pode ocorrer devida à incidência de fótons na região compreendida entre as junções PI e IN do diodo PIN, conforme ilustrado na Figura 2.

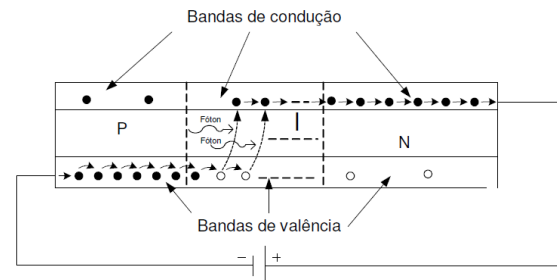


Figura 2: Ilustração do funcionamento de um diodo PIN polarizado diretamente.

A região I tem baixa condutividade (alta resistência). Mas pode vir a se tornar uma região de elevada condutividade sob polarização direta.

Quando se possui uma ação de polarização reversa, praticamente não se tem condutividade oferecendo assim uma alta tensão de ruptura, cuja ordem é de centenas de volts atuando como um capacitor. A resistência variável de baixo valor se encontra mediante polarização direta.

A construção desse diodo é feita acrescentando-se um material (cristal semiconductor puro) intrínseco entre as junções P e N convencionais de um diodo comum.

3 LED

A luz pode ser produzida e/ou controlada eletronicamente. Para o caso do diodo emissor de luz, a luz emitida é adquirida através de um procedimento do estado sólido chamado de eletroluminescência. Em termos gerais a eletroluminescência é a excitação provocada por meio de um campo elétrico aplicado a um sistema.

Os maiores resultados da eletroluminescência ocorrem na junção de um semiconductor do tipo P-N. A emissão de luz observada pela primeira vez no

material carbeto de silício (SiC) é o resultado da recombinação de portadores minoritários injetados com portadores majoritários do material. O comprimento de onda da emissão é correspondente a uma energia igual à energia da lacuna da banda proibida do material.

Os diodos emissores de luz comerciais são fabricados a partir dos semicondutores que constituem os grupos III-V da tabela periódica. Estes compostos contêm elementos como, por exemplo, gálio, alumínio e índio, da coluna III ou do grupo 13; o arsênio, fósforo e nitrogênio da coluna V ou do grupo 15. Existem também LED produzidos a partir das colunas II-VI ou dos grupos 12-16 respectivamente, semicondutores como, por exemplo, o ZnSe. Tomados em conjunto esses semicondutores possuem bandas de energias adequadas para a produção de radiação em todos os comprimentos de onda de interesse de estudo. Uma grande parte desses semicondutores possuem *gap* direto e como consequência são eficientes na transformação de energia elétrica em luz. Com a adição de determinadas impurezas químicas, chamadas de dopantes, tanto compostos de III-V como II-VI, podem se tornar semicondutores do tipo P ou do tipo N, com a finalidade de formar junções do tipo P-N.

4 Aparato experimental aplicado

Para a realização do experimento foi utilizado um cilindro de poliestireno de 40mm de diâmetro e 150 mm de comprimento que foi projetado e usinado no LaPO (Laboratório de Propriedade Óticas) da UFBA (Universidade Federal da Bahia), chamado como RRLED (Radiômetro de referencia para LED). Tal usinagem seguiu a norma internacional de metrologia de LED (Instrument Systems, 2000) (CIE, 1986) (Y. Ohno, 1997). Na suas extremidades foram acoplados um suporte de LED (que está conectada ao circuito de corrente de polarização) e na outra extremidade o fotodiodo Hamamatsu SM1PD2A, Figura 4, cuja área ativa é de 100 mm², conforme pode ser visualizado na Figura 3.

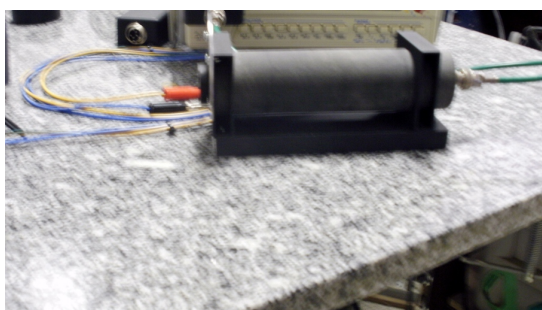


Figura 3: Foto do RRLED que foi projetado e usinado no LaPO

A distância efetiva entre LED e o fotodiodo (sensor) é exatamente 100mm, onde esta distância é fundamental para que o aparato de medida seja compatível com a norma internacional. A Figura 5 traz a configuração do aparato de medida.



Figura 4: Fotodiodo utilizado, imagem extraída da folha de dados do componente (datasheet) (Thorlabs, 2012).

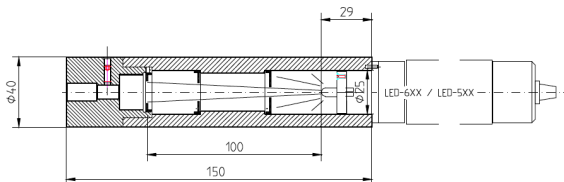


Figura 5: Configuração em corte do aparato de medição da fotocorrente da luz emitida pelo LED.

O circuito de polarização dos LED foi montado de forma a garantir a integridade dos mesmos. A fonte de corrente foi especialmente projetada de tal forma a garantir uma faixa segura da corrente de polarização do LED entre 3 e 42 mA, valores obtidos através do multímetro de bancada MDM-8146 da marca MINIPA. Para atingir o objetivo de controle da intensidade da potência de Luz do LED, foi utilizado o circuito integrado LM723 na configuração de fonte de corrente. Esse CI é muito utilizado também em outras aplicações tais como: fonte de tensão, regulador de desvio e controlador de temperatura.

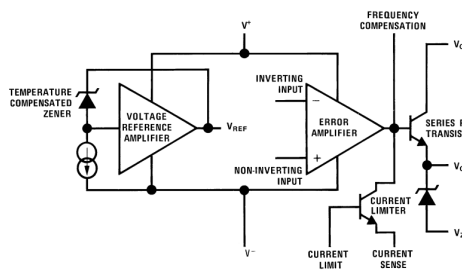


Figura 6 – O circuito equivalente extraído da folha de dados do componente (datasheet).

O controle da corrente sobre o LED é garantido pelo LM723 e está associado à conexão da saída de tensão referência diretamente à entrada não inversora (Figura 6) estabelecendo uma comparação entre a tensão de referência interna e a tensão sobre o resistor de pull-down corrigindo a corrente de saída mantendo-a constante em um determinado valor estabelecido sobre um potenciômetro de precisão da marca ALPES (R2 na Figura 7).

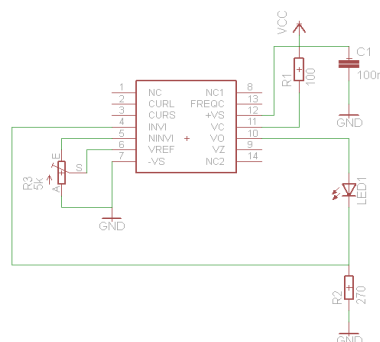


Figura 7 – Diagrama de montagem da fonte de corrente.

De modo geral não é encontrado na literatura os detalhes da montagem de um LED, nem como as pastilhas semicondutoras são depositadas dentro do cone para a confecção dos diodos emissores de luz. No entanto, sabe-se que o modo como essas pastilhas são depositadas, interferem na qualidade e no resultado dos LED. Baseado nessa premissa foi incluído no trabalho uma forma de medir e variar a posição angular de cada LED, pois a maneira como as pastilhas semicondutoras são depositadas, muitas vezes de forma aleatória, tem-se uma diferença significativa de irradiação, que poderá ser visualizado nas figuras 15, 16 e 17.

5 Resultados

A partir do conhecimento prévio a respeito da corrente de saída de um fotodetector (fotodiodo), que deve ser igual intensidade da luz emitida por uma fonte de luz (caso estudado: LED), confirmou-se a existência de uma relação linear entre a corrente gerada e a potencia óptica incidente sobre a superfície ativa do diodo, desde que essa potencia se mantenha dentro de determinados limites (Heidel, 1997) (Sauter, 1999).

O aparato experimental montado no laboratório, é constituído de uma fonte de corrente constante ajustável, que polariza o LED, possibilitando variar a corrente aplicada, determinando assim a irradiância que chega no fotodetector. O valor mínimo depende da corrente de polarização do LED, assim como da área fotossensível do detector. O limite máximo está associado às características construtivas do componente, tendendo a ocorrer uma saturação quando o LED é polarizado com correntes a partir de 30 mA.

Nas Figuras 9, 10, 11, 12 e 13 é possível visualizar os valores obtidos experimentalmente e suas curvas lineares, assim como o seu coeficiente linear, respectivamente para os LED amarelo, azul, verde, vermelho e violeta, que será chamado de Potencial de irradiância.

Para conseguir a irradiância, foi usado um software desenvolvido no LaPO, onde utiliza-se a curva do diodo, fornecida pelo fabricante (Figura 8), a fotocorrente medida pelo fotodiodo em μA e comprimento de onda de emissão do LED em teste, obtido através de um espectrofluorímetro Q798-FIL da Quimis, que também foi desenvolvido em parceria com o LaPO. O software criado fornece a irradiância medida em unidades de $\frac{\text{W}}{\text{m}^2}$, de modo que, é possível obter o coeficiente angular da curva em $\frac{\text{W}}{\text{m}^2 \cdot \text{A}}$, que foi aqui tratado como Potencial de irradiância.

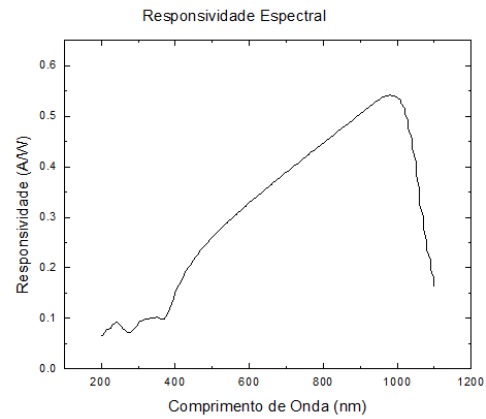


Figura 8: Curva de Responsividade Espectral do diodo Hamamatsu SM1PD2A dado pelo fabricante (datasheet, 2012).

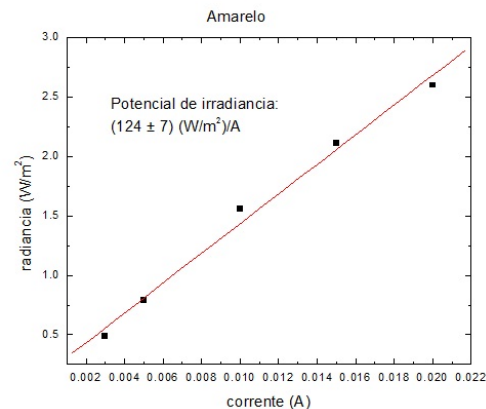


Figura 9: Radiância pela corrente no LED Amarelo

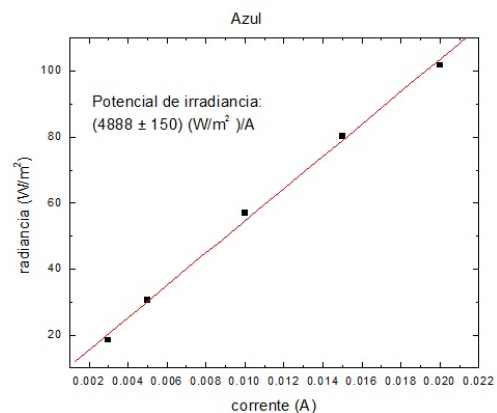


Figura 10: Radiância pela corrente no LED Azul

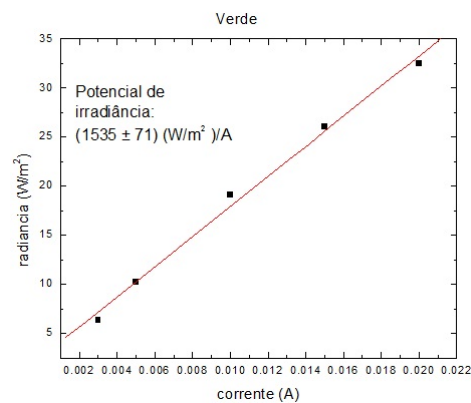


Figura 11: Radiância pela corrente no LED verde

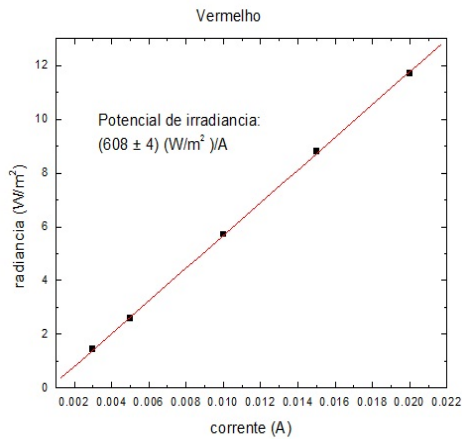


Figura 12: Radiância pela corrente

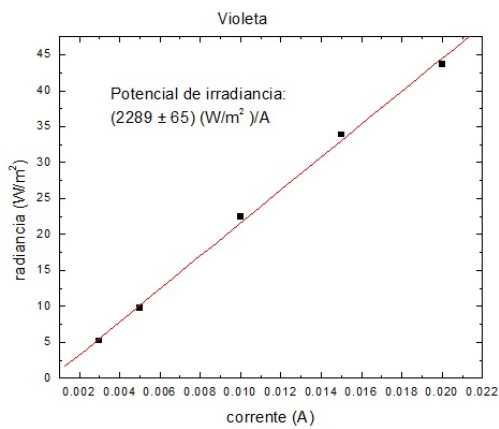


Figura 13: Radiância pela corrente

5.1 Posições angulares

Para a realização deste estudo foi acoplado ao RRLED um transferidor na extremidade de entrada do LED, para que fosse possível avaliar a diferença da luz medida pelo diodo em função do ângulo. Um suporte para o LED também foi desenvolvido de forma que se relacione a posição do LED com o transferidor na parte externa ilustrado na figura 14.



Figura 14: Foto do suporte para LED

Para cada uma das correntes 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 42 mA, foi feita uma varredura de 0 a 360 graus medindo-se a cada 10 graus, esse processo foi realizado para dez LED de cada cor individualmente (azul, verde e vermelho), obtendo assim curvas semelhantes a uma curva cossenoidal explicitadas nas figuras 15, 16 e 17.

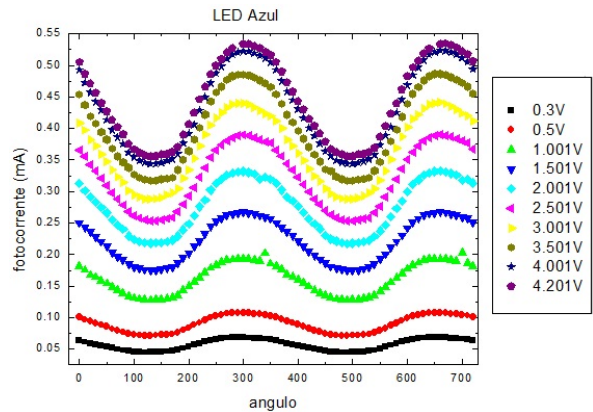


Figura 15: Gráfico da fotocorrente pelo ângulo

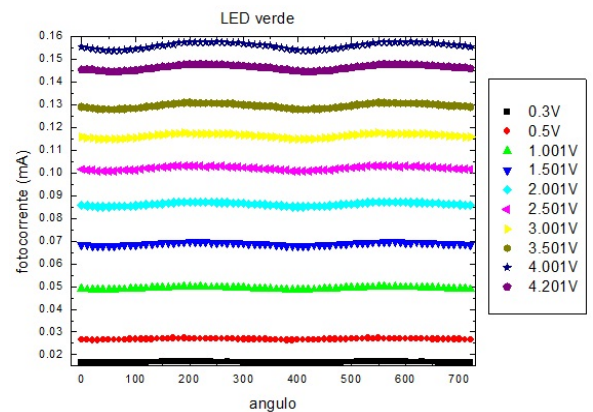


Figura 16: Gráfico da fotocorrente pelo ângulo

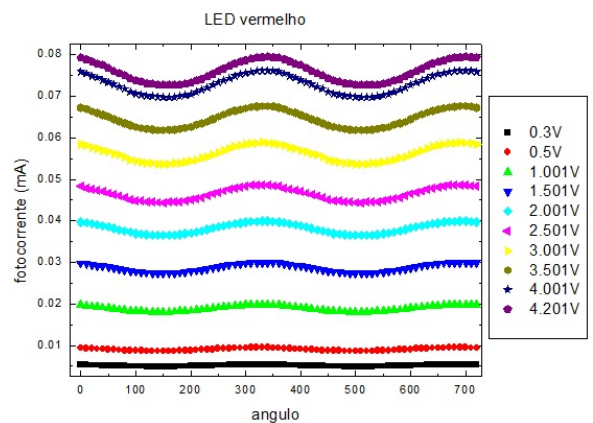


Figura 17: Gráfico da fotocorrente pelo ângulo

É possível visualizar nos gráficos que a curva do LED verde possui apenas nuances de uma curva cossenoidal, isso ocorre devido a sua irradiância no diodo ser muito baixa em relação ao vermelho e ao azul. A irradiância do LED azul no fotodiodo se mostrou mais intensa.

5.2 Histograma

Utilizando 116 LED azuis, mantendo fixo a corrente em 10 mA e com um ângulo de 90 graus, foi possível estimar a dispersão do comprimento de onda de 472,58 nm, referente ao LED azul, de acordo com as figuras 18 e 19.

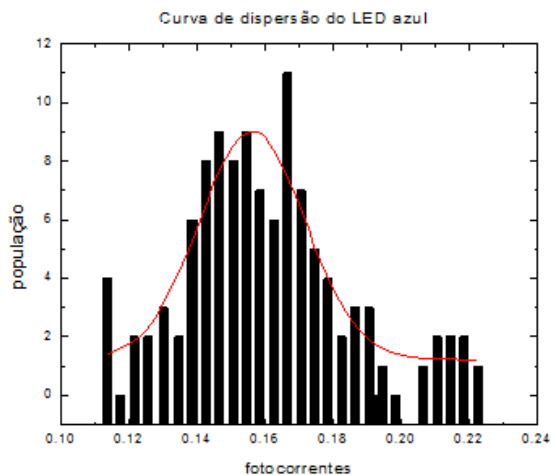


Figura 18: Curva de dispersão do LED azul

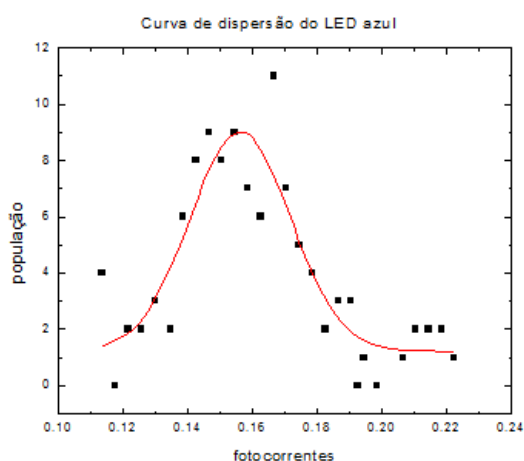


Figura 19: Curva de dispersão do LED azul

6 Citações

BOYLESTAD, R. L.; NASHESKY, L. **Dispositivos Eletrônicos e Teoria de Circuitos**. 6ª. ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1999.

(Commission internationale de l'Éclairage, "Colorimetry", CIE, 1986).

HEIDEL, G. – "Actual problems at the industrial optical measurement of LEDs", Proceedings of the CIE LED Symposium 1997 On Standard Methods for Specifying and Measuring LED Characteristics, 1997.

HANDBOOK of LED Metrology

NAKAMURA; SHUJI. High-brightness blue/green LEDs and first III-V nitride-based laser diodes. **Society of Photo-Optical Instrumentation**

Engineers (SPIE) Conference Series, v. 2693, p. 43-56, Maio 1996.

OHNO, Y. - Fundamentals in Photometry and Radiometry II - Photometers and Integrating Spheres, CIE LED Workshop and Symposium, Vienna, 1997.

SAUTER, G. – Physikalisch-Technische Bundesanstalt PTB, 1999.

7 Contribuição deste artigo

As contribuições deste artigo visa uma calibração a respeito da qualidade dos LEDs estudados bem como a montagem de um sistema Radiométrico de Referência para LED (RRLEDs).

Tendo como perspectiva para a continuação dos trabalhos as análises dos LED violeta e amarelo medidas que serão realizadas na continuação do trabalho.

8 Conclusão

Com base no estudo é possível visualizar a grande variação que existe na construção dos LED, existindo uma grande sensibilidade na variação angular. Para LED azuis, de acordo com a curva de dispersão é possível encontrar uma faixa de corrente onde a irradiância é maior, essa faixa está situada entre 0.15 e 0.17 mA. Ressaltando ainda que os LED utilizados neste trabalho, são LED comerciais e de alto brilho.

No que tange a curva de variação angular, as curvas se aproximam de uma cosenoidal, onde as variações de máximos e mínimos se repetem, dentro das suas respectivas faixas espectrais. Os estudos realizados nessa fase do experimento visam o entendimento da análise comportamental dos LED com referência a sua posição angular. A importância desse estudo está no conhecimento prévio da irradiância do LED, a uma dada posição, para que haja uma coerência da repetição de experimentos que usem LED comerciais de alto brilho.

A forma como esses LED irradiam podem alterar os resultados obtidos em análises químicas, como por exemplo, experimentos que utilizam como luz excitação LED. Sabe-se que o posicionamento interfere na obtenção da máxima irradiância sendo evidente a necessidade de um sistema de posicionamento com precisão de forma que garanta que o experimento tenha repetibilidade.

Agradecimentos

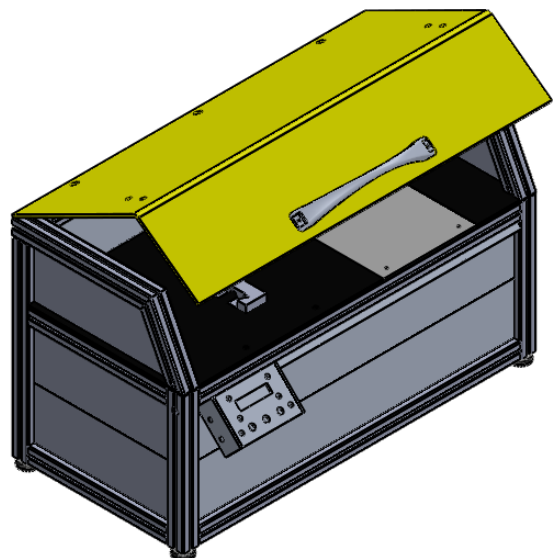
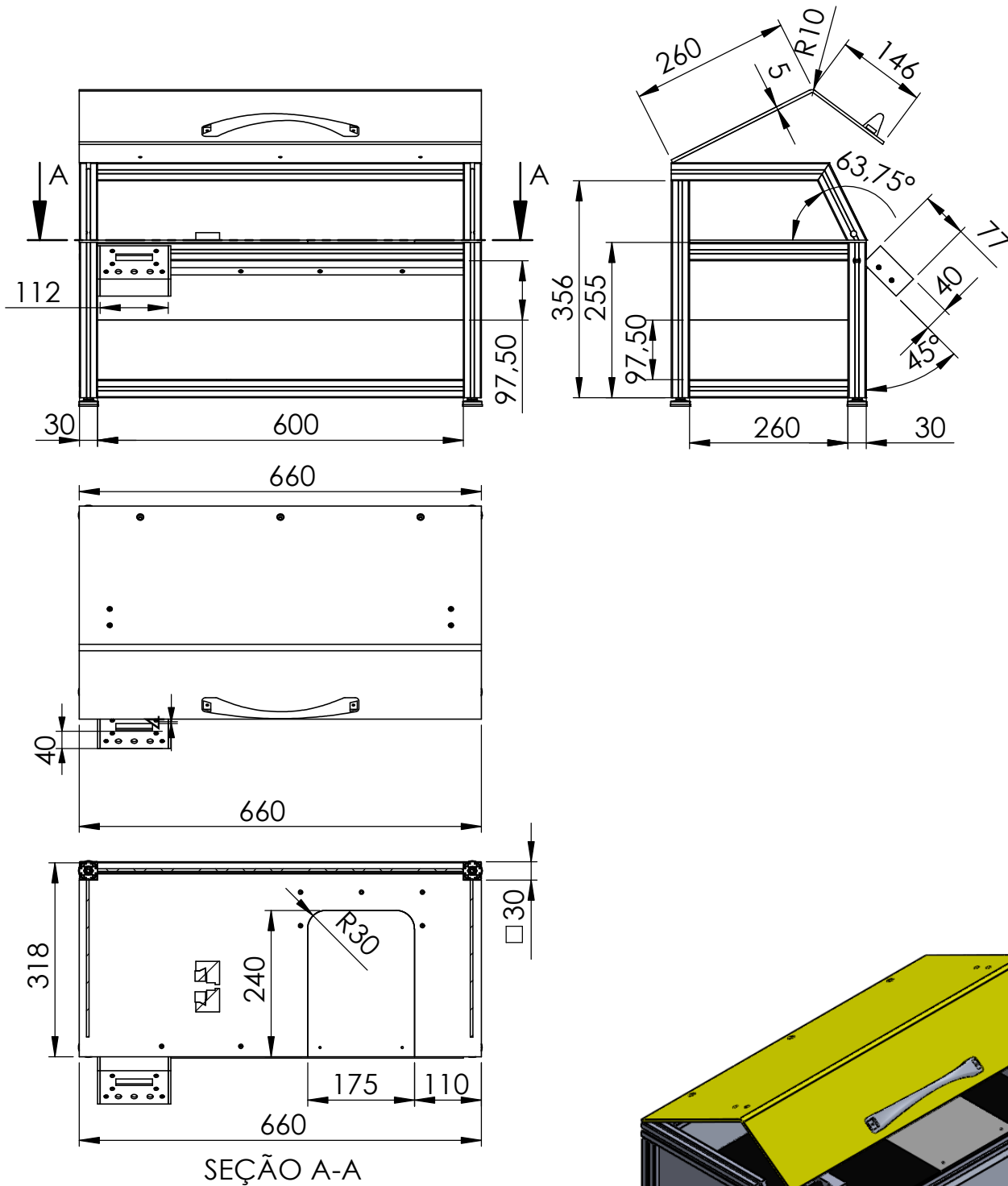
Gostaria de agradecer ao CnPQ e FAPESB pelo financiamento, ao LaPO (Laboratório de Proprieda-

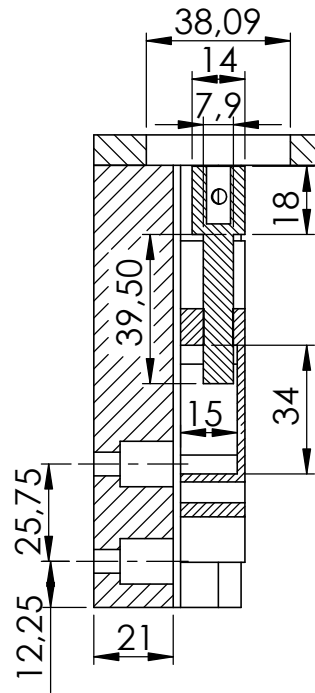
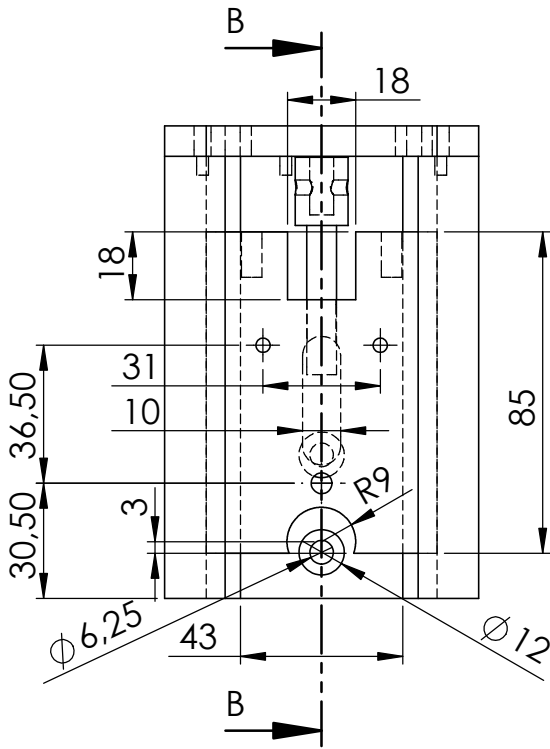
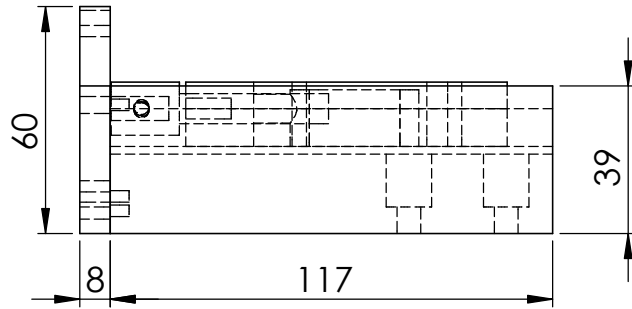
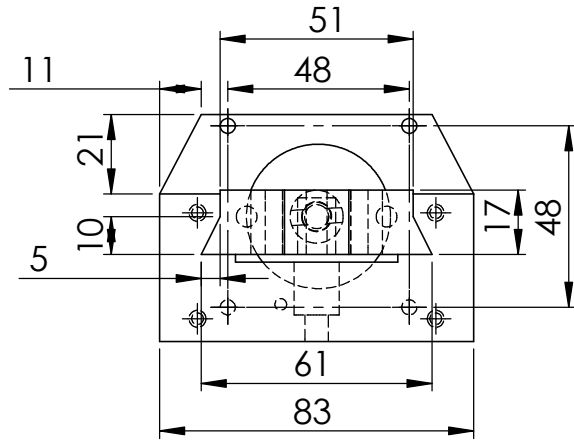
des Óticas) pelo suporte técnico e pessoal na elaboração do trabalho.

Referências Bibliográficas

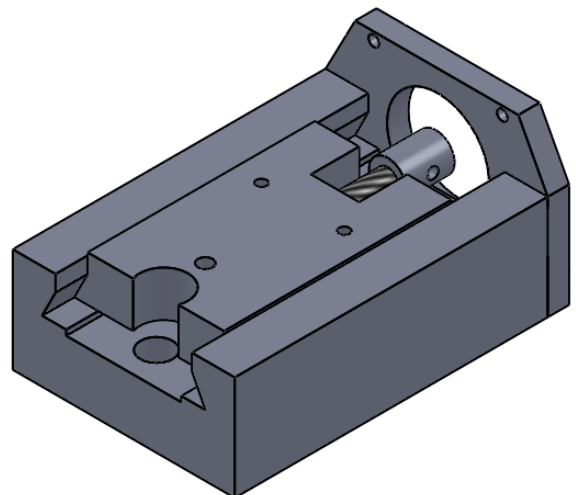
- Camargo, F. (2005). Dissertação de Mestrado. Fatores que Influenciam a Resolução em Energia na Espectrometria de Partícula Alfa com Diodo de Si.
- Instrument Systems GmbH, Handbook of LED Metrology. (200X)
- Kittel, C. (2006). Introdução à Física do Estado Sólido. 8ª Edição. ed. Rio de Janeiro: LTC.
- Nakamura, Shuji (1996). High-brightness blue/green LEDs and first III-V nitride-based laser diodes. Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference Series, v. 2693, p. 43-56.
- Rezende, S. M. (1996). A Física de Materiais e Dispositivos Eletrônicos. Universitária da UFPE. V.1, Recife.
- Robert L. Boylestad e Louis Nashelsky, Dispositivos Eletrônicos e Teoria de Circuitos. 6. Ed. Rio de Janeiro, J.R.: Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1999.
- OHNO, Y. - Fundamentals in Photometry and Radiometry II - Photometers and Integrating Spheres, CIE LED Workshop and Symposium, Vienna, 1997.
- HEIDEL, G. - "Actual problems at the industrial optical measurement of LEDs", Proceedings of the CIE LED Symposium 1997 On Standard Methods for Specifying and Measuring LED Characteristics, 1997.
- SAUTER, G. - Physikalisch-Technische Bundesanstalt PTB, 1999.

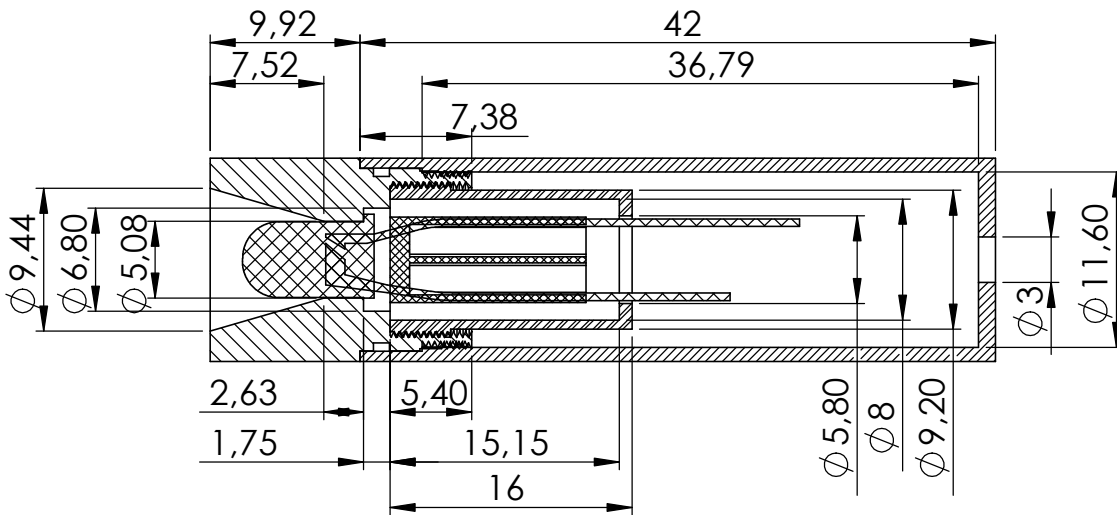
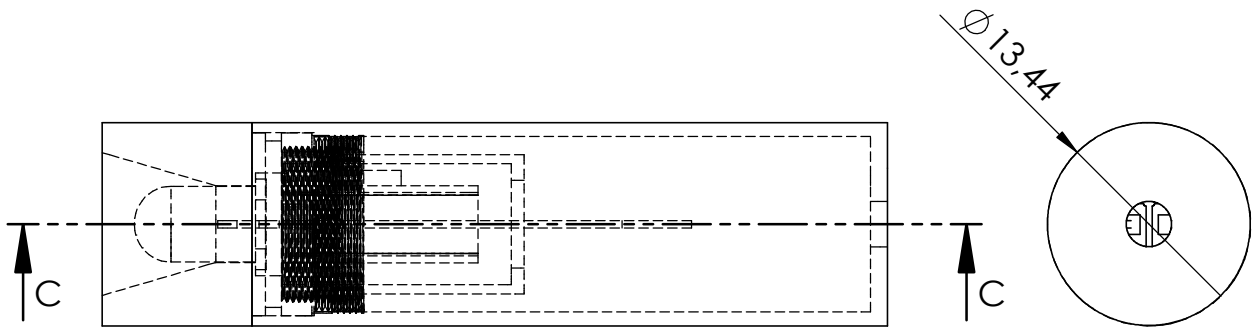
APÊNDICE C – DESENHOS MECÂNICOS



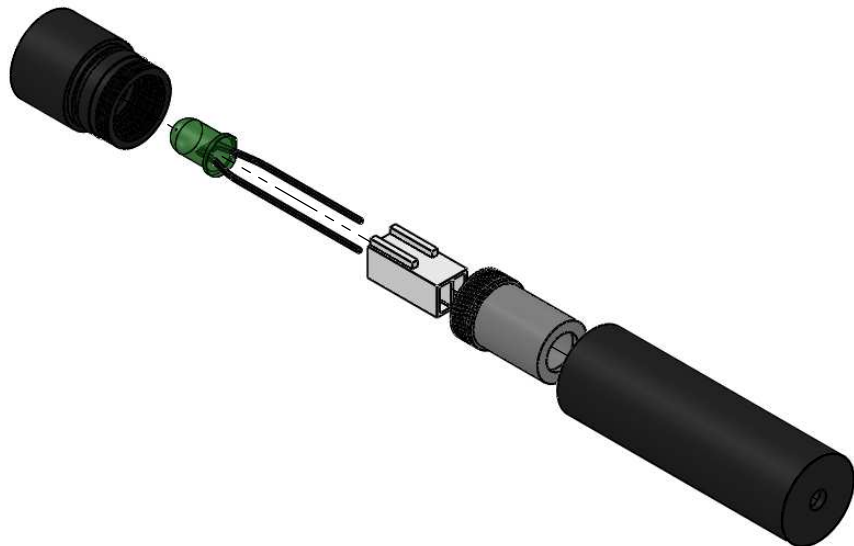


SEÇÃO B-B
ESCALA 1 : 2

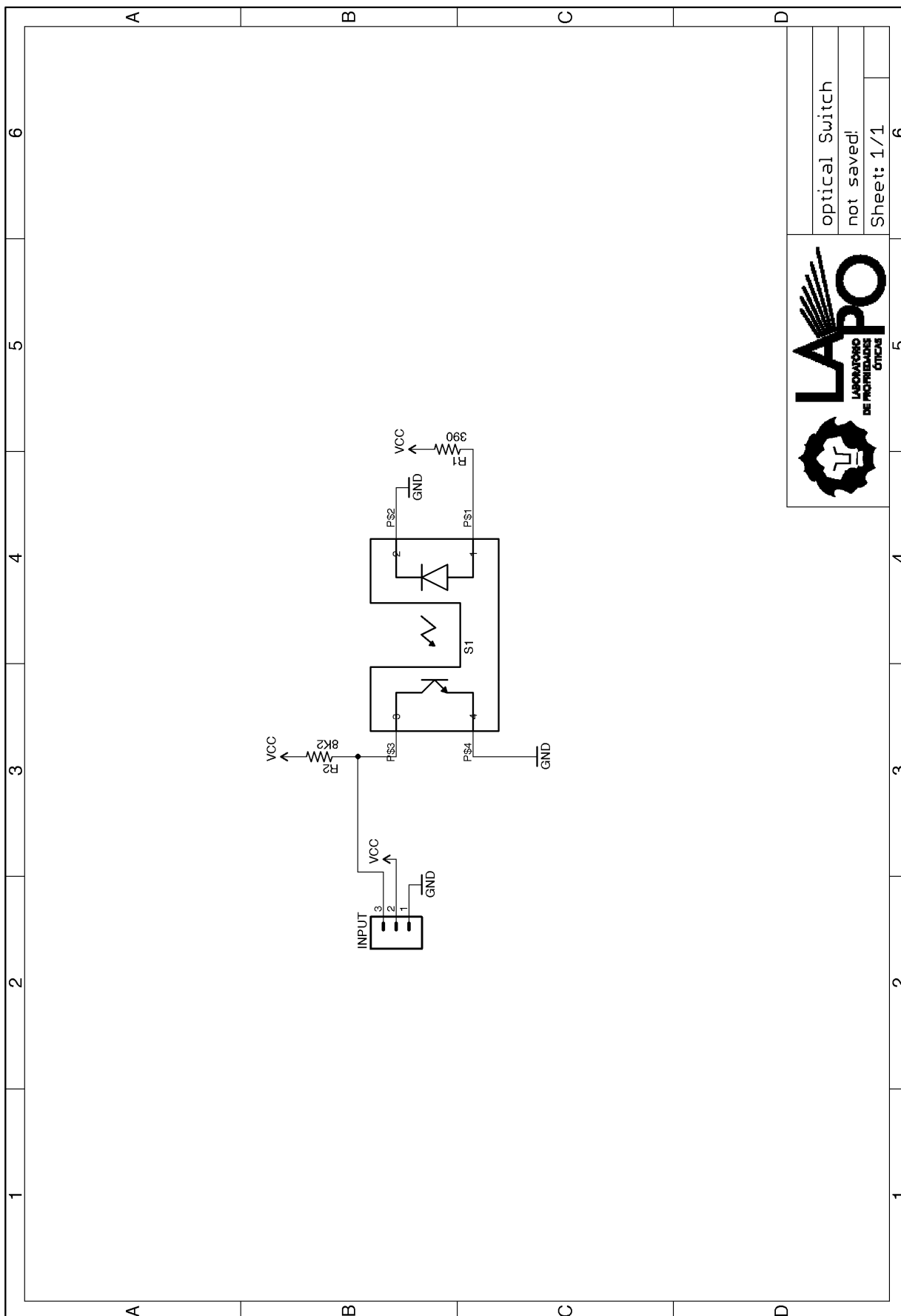




SEÇÃO C-C
ESCALA 2 : 1

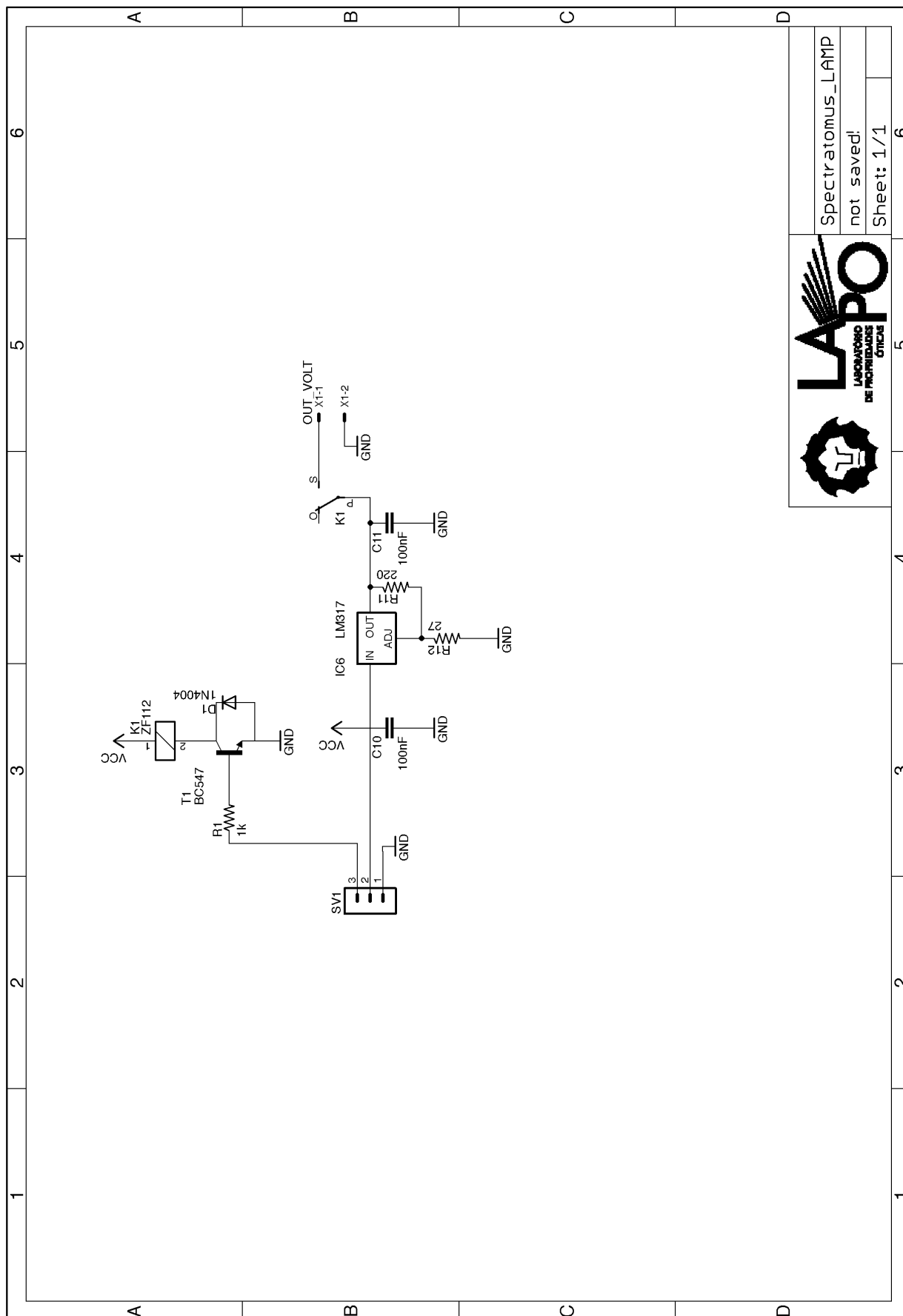


APÊNDICE D – DIAGRAMAS ELETRÔNICOS



optical Switch
not saved!
Sheet: 1/1

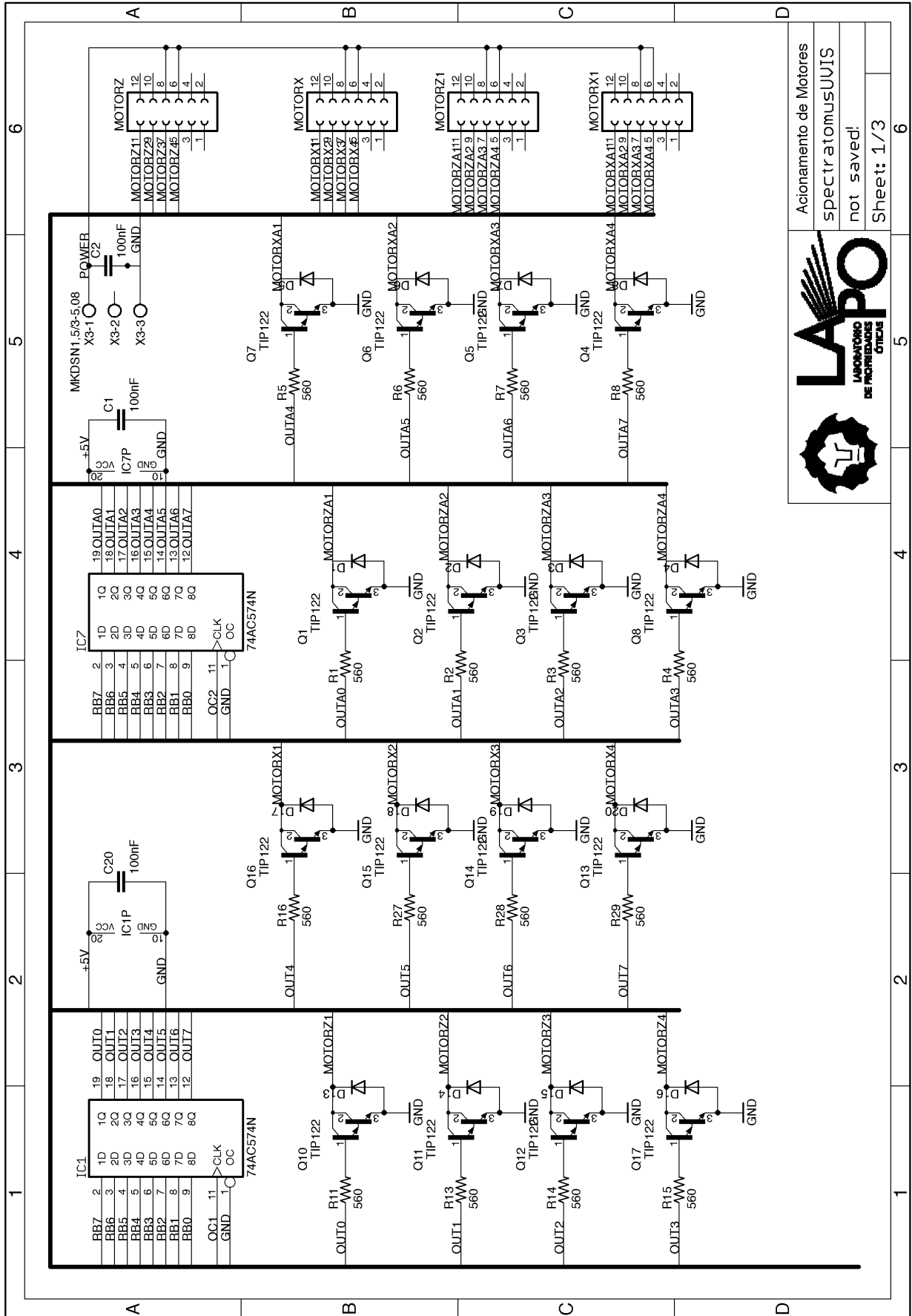
1	2	3	4	5	6
A	B	C	D		



Spectratomus_LAMP

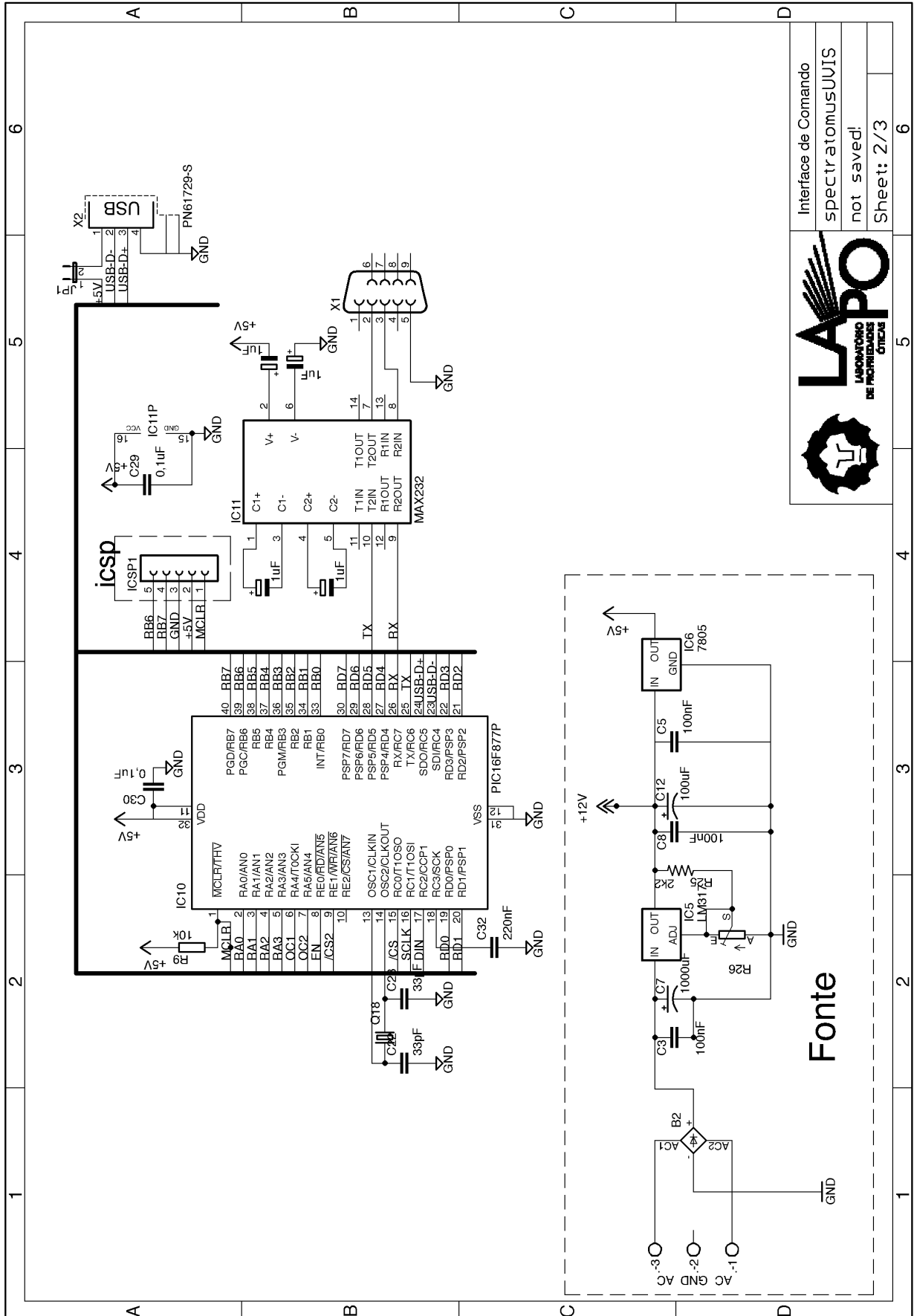
not saved!

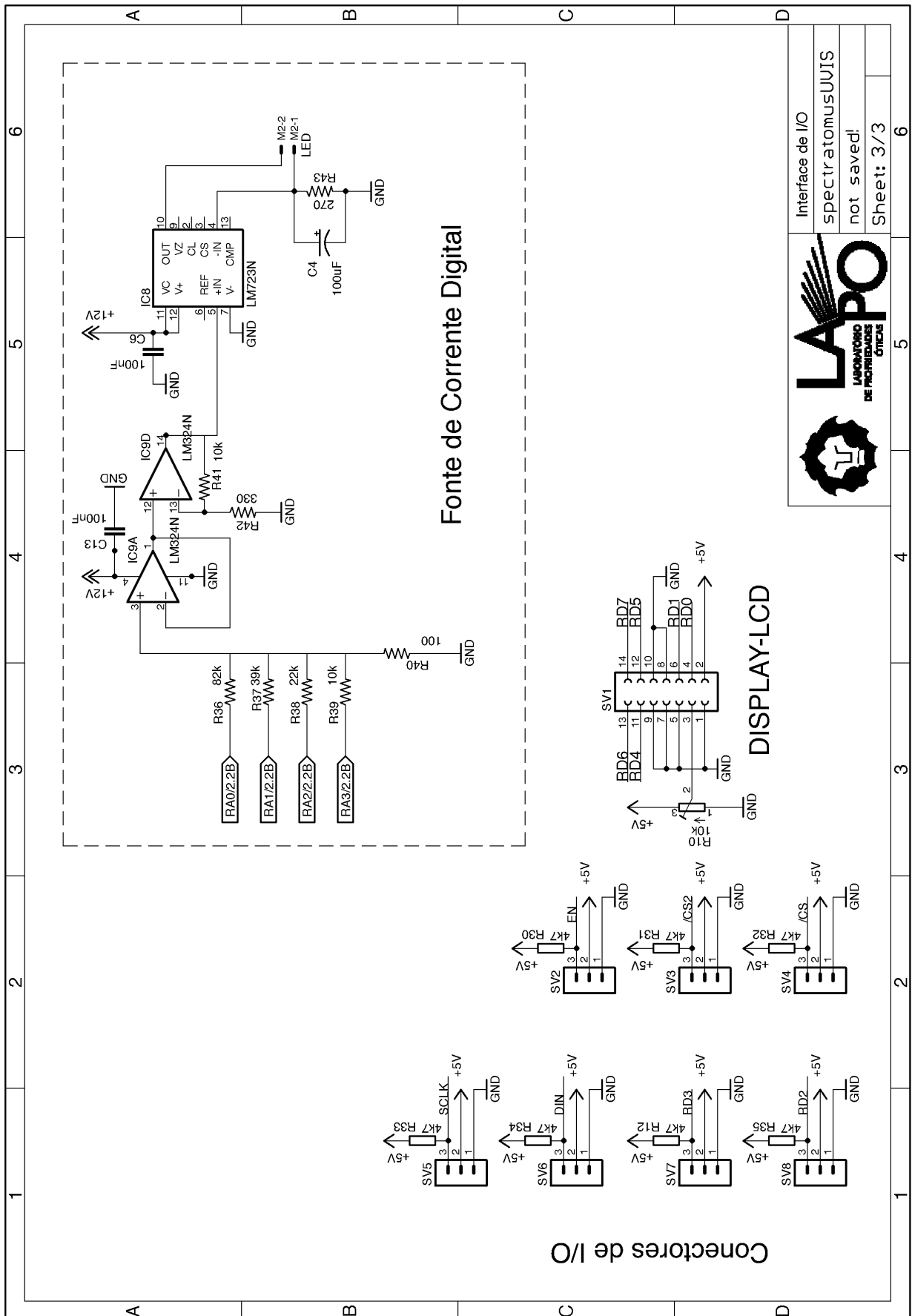
Sheet: 1/1



Acionamento de Motores
spectratomusUUIS
not saved!
Sheet: 1/3







Interface de I/O
spectratomusUUVIS
not saved!
Sheet: 3/3

APÊNDICE E – PROGRAMA EMBARCADO

```

#include "SpectratomusUVIS.h"
#include "Stepper.c"
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
//
// Configuracao de I/O
//
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
#define OC1 PIN_A4
#define OC2 PIN_A5
#define EN PIN_E0
#define CS2 PIN_E1
#define BOT_LAMP PIN_E2
#define SensorS PIN_C0
#define SensorI PIN_C1
#define SensorR PIN_C2
#define Relay PIN_D2

#define PIN_ON output_high
#define PIN_OFF output_low

/* DEFINICOES de USO GERAL */
#define BUFFER_SIZE 10

/* Variaveis Globais */
char buffer[BUFFER_SIZE];
char bufferUSB[BUFFER_SIZE];
BYTE usb_ON=0, relay_status=0;
//long medidas1, medidas2, saida;
int8 led_valor=0, led_atual=0;
int32 passos=0, tempos;
int32 Isaida=0, veloZ=100, veloR=100, aux;
int i;
char Ssaida[6], dir='R';

/* Definicoes da memoria EEPROM INTERNA */

#define End_Z 0x00 //end. do DELAY DO EIXO X
#define End_R 0x02 //END. DO DELAY DO EIXO TETA

/*void Menu_comandos(void){
//via serial
printf("SpectratomusUVIS\r\n");
printf("Menu de Comandos\r\n");
printf("Zxxx - Rotation Z axis xxx turns, s F=forward or R=rew Ex: Z020\r\n");
;
printf("Rxxx - Rotation Teta axis xxx turns, s F=forward or R=rew Ex: R020\r\n");
;
printf("Dxxx - Z Axis Delay\r\n");
printf("Txxx - Teta Axis Delay\r\n");
printf("Lxx - LED Intensity 0 to 15\r\n");
printf("P - Parking to zero\r\n");
printf("S - STOP!\r\n");
}*/
void Menu_comandosUSB(void){

```

```

//via USB-serial
printf(usb_cdc_putc,"SpectratomusUVIS\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"Menu de Comandos\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"Zsxxxx - Rotation Z axis xxxx steps, s F=forward or R=rew
      Ex: ZR020\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"Rsxxxx - Rotation Teta axis xxxx steps, s F=forward or R=
      rew Ex: RR020\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"Dxxxxx - Z Axis Delay \r\n");
printf(usb_cdc_putc,"Txxxxx - Teta Axis Delay \r\n");
printf(usb_cdc_putc,"Lxx - LED Intensity 0 to 15\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"P - Parking to zero\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"S - STOP!\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"I - Informartion\r\n");
printf(usb_cdc_putc,"F - Flashlight\r\n");
}
/*void iLED(void){
unsigned int8 Isaida=0;
int J;
//Retira o primeiro digito, L02->02
for(J=1;J<4;J++) Ssaida[J-1]=Buffer[J];
Ssaida[2]=0x0D;
Isaida=atol(Ssaida);
set_tris_a(0xf0);// LSB como porta de saida
output_a(Isaida);//
led_valor=Isaida;
}

void Motor1(void){
//Retira o primeiro digito, L02->02
for(i=2;i<5;i++) Ssaida[i-2]=Buffer[i];
Ssaida[4]=0x0D;
Isaida=atol(Ssaida);
Full_Step(100,dir,Isaida,0);
}*/

void iLEDUSB(void){
int J;
//Retira o primeiro digito, L02->02
for(J=1;J<4;J++) Ssaida[J-1]=BufferUSB[J];
Ssaida[2]=0x0D;
Isaida=atol(Ssaida);
set_tris_a(0xf0);// LSB como porta de saida
output_a(Isaida);//
led_valor=Isaida;
}

void Parking(void){
printf(usb_cdc_putc,"Parking\r\n");
printf(lcd_escreve, "\fParking....");
lcd_pos_xy(1,2);
printf(lcd_escreve, "Rotation to Zero");
while(input(SensorR)==1){
    HALF_Step(veloR,'R',1,1);
}
// POSICIONA O EIXO TETA
while(input(SensorR)==0){
    HALF_Step(veloR,'R',1,1);
}
Parar_motores();
for (i=0;i<5;i++) HALF_Step(veloR,'R',1,1);

```

```

    printf(usb_cdc_putc, "Teta stop\r\n");
    // POSICIONA O EIXO Z
    lcd_pos_xy(1,2);
    printf(lcd_escreve, "Z axis to Zero ");
    while(input(SensorS)==0){
        Full_Step(veloZ, 'F', 1,0);
    }
    while(input(SensorS)==1){
        Full_Step(veloZ, 'R', 1,0);
    }
    while(input(SensorS)==0){
        Full_Step(veloZ, 'F', 1,0);
    }
    lcd_pos_xy(1,2);
    printf(usb_cdc_putc, "Z stop\r\n");
    printf(lcd_escreve, "    Finished    ");
}

////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
//
// usb_debug_task()
//
// When called periodically, displays debugging information over serial
// to display enumeration and connection states. Also lights LED1 based upon
// enumeration and status.
//
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////

void usb_debug_task(void) {
    static int8 last_connected;
    static int8 last_enumerated;
    int8 new_connected;
    int8 new_enumerated;
    static int8 last_cdc;
    int8 new_cdc;

    new_connected=usb_attached();
    new_enumerated=usb_enumerated();
    new_cdc=usb_cdc_connected();

    if (!new_connected && last_connected){
        printf(lcd_escreve, "\fUSB disconnected");
        usb_ON=0;
    }
    if (new_enumerated && !last_enumerated) {
        printf(lcd_escreve, "\fUSB enumerated");
        usb_ON=0;
    }
    if (!new_enumerated && last_enumerated){
        printf(lcd_escreve, "\fUSB unenumerated");
        usb_ON=0;
    }
    if (new_cdc && !last_cdc) {
        printf(lcd_escreve, "\fSpectratomusUVIS");
        lcd_pos_xy(1,2);
        printf(lcd_escreve, "USB -> Connected");
        delay_ms(500);
        usb_ON=1;
    }
}

```

```

    // printf("Serial program initiated on USB<->UART COM Port\r\n");
    printf(usb_cdc_putc, "SpectratomusUVIS v2.5\r\n");
    printf(usb_cdc_putc, "Digite ? para lista de comandos\r\n");
}

last_connected=new_connected;
last_enumerated=new_enumerated;
last_cdc=new_cdc;
}

#INT_RTCC
void timer_Lamp(){
    set_timer0(0);
    tempos++;
    if((relay_status==1) && (tempos==10)){
        output_low(Relay);
        relay_status=2;
    }
}

//#INT_RDA
//void serial_isr() {
//fgets(buffer);
//    Buzz();
//    if (buffer[0]=='?') Menu_Comandos();
//    if (buffer[0]=='Z') Motor1();
//    if (buffer[0]=='R') Escreve_digital();
//    if (buffer[0]=='D') Escreve_digital2();
//    if (buffer[0]=='T') Ler_ADCdados1();
//    if (buffer[0]=='L') iLED();
//    if (buffer[0]=='P') Ler_ADCdados1();
//    if (buffer[0]=='S') Ler_ADCdados2();
//}

void main(void) {
int8 cont;

    veloZ=read_eeprom(End_Z)<<8;//PARTE ALTA
    veloZ=veloZ+read_eeprom(End_Z+1);//PARTE BAIXA
    veloR=read_eeprom(End_R)<<8;//PARTE ALTA
    veloR=veloR+read_eeprom(End_R+1);//PARTE BAIXA

    //printf("\r\n\nSpectratomusUVIS v2.0\r\n");

    PORT_B_PULLUPS(1);
    SET_TRIS_A(0xf0);// LSB como porta de saida o restante como entrada
    SET_TRIS_E(0xff);
    Parar_motores();
    SETUP_ADC(ADC_OFF);
// Inicializacao do Display
    lcd_ini();
    printf(lcd_escreve, "\f LaPO SYSTEM ");
    delay_ms(1000);
    lcd_pos_xy(1,2);
    printf(lcd_escreve, "SpectratomusUVIS");
    delay_ms(1000);
    printf(lcd_escreve, "\fSpectratomusUVIS");
    delay_ms(1000);

```

```

lcd_pos_xy(1,2);
printf(lcd_escreve, "   Version 2.5   ");

setup_timer_0(TO_INTERNAL|TO_DIV_256);

// Configuracao de Interrupcoes
enable_interrupts(INT_RTCC);
// enable_interrupts(INT_RDA);
enable_interrupts(GLOBAL);
// INICIO DE MSG DO SISTEMA
// printf("Digite ? para menu\r\n");
// PINOUT DO SISTEMA EM ESTADO DEFAULT
led_valor=0;
led_atual=0;
relay_status=0;
tempos=0;

////
while (TRUE) {
    usb_task();
    usb_debug_task();

    if (usb_cdc_kbhit()) {
        get_string_usb(bufferUSB, BUFFER_SIZE);
        //bufferUSB[0]=usb_cdc_getc();
        switch(bufferUSB[0]){
            case '?':
                Menu_ComandosUSB();
                break;
            case 'Z':
                dir=BufferUSB[1];
                //Retira dois digitos, ZR02->02
                for(i=2;i<7;i++) Ssaida[i-2]=BufferUSB[i];
                Ssaida[5]=0x0D;
                Isaida=atoi32(Ssaida);
                printf(usb_cdc_putc, "Z turns %Ld\r\n", Isaida);
                passos=Isaida;
                printf(lcd_escreve, "\fZ axis working..");
                lcd_pos_xy(1,2);
                if (dir=='R') {
                    printf(lcd_escreve, "          REW");
                    while((passos>0) && (input(SensorI)==0) && !usb_cdc_kbhit()){
                        Full_Step(veloZ, dir, 1, 0);
                        passos--;
                    }
                }
                else{
                    printf(lcd_escreve, "          FORWARD");
                    while((passos>0) && (input(SensorS)==0)&& !usb_cdc_kbhit()){
                        Full_Step(veloZ, dir, 1, 0);
                        passos--;
                    }
                }
                printf(usb_cdc_putc, "%Ld steps\r\n", passos);
                Parar_motores();
                printf(lcd_escreve, "\fSpectratomusUVIS");
                break;
            case 'R':

```

```

dir=BufferUSB[1];
//Retira dois digitos, ZR02->02
for(i=2;i<7;i++) Ssaida[i-2]=BufferUSB[i];
Ssaida[5]=0x0D;
Isaida=atoi32(Ssaida);
printf(lcd_escreve, "\fT axis working");
lcd_pos_xy(1,2);
if (dir=='R') printf(lcd_escreve, "      REW");
else printf(lcd_escreve, "      FORWARD");
printf(usb_cdc_putc, "Teta turns %Ld\r\n", Isaida);
passos=Isaida;
while((passos>0) && !usb_cdc_kbhit()){
    HALF_Step(veloR, dir, 1, 1);
    passos--;
}
printf(usb_cdc_putc, "%Ld steps\r\n", passos);
Parar_motores();
printf(lcd_escreve, "\fSpectratomusUVIS");
break;
case 'D':
for(i=1;i<6;i++) Ssaida[i-1]=BufferUSB[i];
Ssaida[5]=0x0D;
Isaida=atoi32(Ssaida);
veloZ=Isaida;
aux=Isaida&0xff00;
aux=aux>>8;
write_eeprom(End_Z, aux); //PARTE ALTA
aux=Isaida&0x00ff;
write_eeprom(End_Z+1, aux); //PARTE BAIXA
printf(usb_cdc_putc, "Z Delay - %Ld ms\r\n", veloZ);
break;
case 'T':
for(i=1;i<6;i++) Ssaida[i-1]=BufferUSB[i];
Ssaida[5]=0x0D;
Isaida=atoi32(Ssaida);
veloR=Isaida;
aux=Isaida&0xff00;
aux=aux>>8;
write_eeprom(End_R, aux); //PARTE ALTA
aux=Isaida&0x00ff;
write_eeprom(End_R+1, aux); //PARTE BAIXA
printf(usb_cdc_putc, "Teta Delay - %Ld ms\r\n", veloR);
break;
case 'S':
printf(usb_cdc_putc, "Parando os motores\r\n");
printf(lcd_escreve, "\fSTOPPING MOTORS");
Parar_motores();
break;
case 'P':
Parking();
Parar_motores();
break;
case 'L':
iLEDUSB();
break;
case 'I':
printf(usb_cdc_putc, "LED %02u \r\n", led_atual);
printf(usb_cdc_putc, "Z Delay %Ld ms\r\n", veloZ);
printf(usb_cdc_putc, "Teta Delay %Ld ms\r\n", veloR);
break;

```



```

        case 'F':
            OUTPUT_TOGGLE(Relay);
            if (relay_status==0){
                printf(lcd_escreve, "\f Lamp -> On ");
                if (usb_ON==1) printf(usb_cdc_putc, "Lamp->On\r\n");
                relay_status=1;
                tempos=0;
                set_timer0(0);
            }else {
                printf(lcd_escreve, "\f Lamp -> Off ");
                if (usb_ON==1) printf(usb_cdc_putc, "Lamp->Off\r\n");
                relay_status=0;
            }
            break;
        default:
            printf(usb_cdc_putc, "\r\n SpectratomusUVIS v2.4\r\n");
            printf(usb_cdc_putc, "Digite ? para menu\r\n");
            break;
    }
}

// Leitura dos botoes
if (led_atual!=led_valor){
    if (led_valor==-1) led_valor=0;
    led_atual=led_valor;
    output_a(led_atual); // Escreve o valor na saida
    if (usb_ON==1) printf(usb_cdc_putc, "LED %d\r\n", led_atual);
    //printf("LED %d\r\n", led_atual);
    printf(lcd_escreve, "\fLED Intensity");
    lcd_pos_xy(15,1);
    printf(lcd_escreve, "%02u", led_atual);
    lcd_pos_xy(1,2);
    if (led_atual>0){
        for(cont=1; cont<led_atual+1; cont++) printf(lcd_escreve, "-");
        printf(lcd_escreve, ">");
    } else
        printf(lcd_escreve, ">");
}
if(input(EN)==0){
    led_valor++;
    delay_ms(300);
    if (led_valor==16) led_valor=15;
}
if(input(CS2)==0){
    led_valor--;
    delay_ms(300);
    if (led_valor==-1) led_valor=0;
}
if (input(BOT_LAMP)==0){
    OUTPUT_TOGGLE(Relay);
    if (relay_status==0){
        printf(lcd_escreve, "\f Lamp -> On ");
        if (usb_ON==1) printf(usb_cdc_putc, "Lamp->On\r\n");
        relay_status=1;
        tempos=0;
        set_timer0(0);
    }else {
        printf(lcd_escreve, "\f Lamp -> Off ");
        if (usb_ON==1) printf(usb_cdc_putc, "Lamp->Off\r\n");
        relay_status=0;
    }
}

```

```

    }
    delay_ms(300);
}
if (relay_status==2){
    printf(lcd_escreve, "\f Lamp -> Off    ");
    if (usb_ON==1) printf(usb_cdc_putc, "Lamp->Off\r\n");
    relay_status=0;
}
}
}
}

```

Código Fonte E.1 – Programa principal

```

#include <18F4550.h>
#include <stdlib.h>

#fuses HSPLL
#FUSES NOWDT           //No Watch Dog Timer
#FUSES NOPROTECT      //Code not protected from reading
#FUSES NODEBUG        //No Debug mode for ICD
#FUSES NOLVP          //No low voltage prgming, B3(PIC16) or B5(PIC18)
    used for I/O
#FUSES PLL5           //Divide By 12(48MHz oscillator input)
#FUSES CPUDIV1        //System Clock by 4
#FUSES USBDIV         //USB clock source comes from PLL divide by 2
#FUSES VREGEN         //USB voltage regulator enabled
#use delay(clock=4800000)
//#use rs232(baud=57600,parity=N,xmit=PIN_C6,rcv=PIN_C7,bits=8)
#include "mod_lcd.c" // Biblioteca LCD 4 bits

#include <usb_cdc.h>

```

Código Fonte E.2 – Interface padrão do programa principal

```

/*****
/* Stepper.c - Biblioteca de manipulacao para motores de Passo */
/* */
/* Autor: VITOR LEAO FILARDI */
/* */
/*****
//#include <input.c>

#define PIN_ON output_high
#define PIN_OFF output_low
#define OC1 PIN_A4
#define OC2 PIN_A5
//Declaracao dos valores para os motores
BYTE const M_FULL_STEP[4] = {0b1100,
                             0b0110,
                             0b0011,
                             0b1001};

BYTE const M_HALF_STEP[8] = {0b1000,
                              0b1100,
                              0b0100,
                              0b0110,
                              0b0010,
                              0b0011,
                              0b0001,
                              0b0001,

```

```

                                0b1001};

void Parar_motores(void){

    OUTPUT_B(0);
    PIN_OFF(OC1);
    delay_us(20);
    PIN_ON(OC1);
    PIN_OFF(OC2);
    delay_us(20);
    PIN_ON(OC2);
    //delay_ms(speeds);
}
//Passo de 8 pulsos valores a serem passados
// (velocidade em ms, direcao R ou F, quant. de passos e motor de 0 a 3)
// Ex: HALF_STEP(100, 'F', 200, 0) -> 100ms, Forward, 200 passos, 0 = Motor 0
VOID HALF_Step(int speed, char dir, int steps, BYTE Motors) {
    static BYTE stepper_state = 0;
    BYTE VALOR;
    BYTE i;

    for(i=0; i<steps; ++i) {
        switch (Motors){
            case 0:
                VALOR=M_HALF_STEP[ stepper_state ]<<4;
                output_B(VALOR);
                PIN_OFF(OC1);
                delay_us(20);
                PIN_ON(OC1);
                break;
            case 1:
                output_B(M_HALF_STEP[ stepper_state ]);
                PIN_OFF(OC1);
                delay_us(20);
                PIN_ON(OC1);
                break;
            case 2:
                VALOR=M_HALF_STEP[ stepper_state ]<<4;
                output_B(VALOR);
                PIN_OFF(OC2);
                delay_us(20);
                PIN_ON(OC2);
                break;
            case 3:
                output_B(M_HALF_STEP[ stepper_state ]);
                PIN_OFF(OC2);
                delay_us(20);
                PIN_ON(OC2);
                break;
        }
        if(dir!='F')
            stepper_state=(stepper_state+1)&(sizeof(M_HALF_STEP)-1);
        else
            stepper_state=(stepper_state-1)&(sizeof(M_HALF_STEP)-1);
    }
    delay_ms(speed);
    // Parar_motores(speed);
}

void FULL_Step(int speed, char dir, int steps, BYTE Motors) {

```

```
static BYTE stepper_stateF = 0;
BYTE VALOR;
BYTE i;

for(i=0; i<steps; ++i) {

    switch (Motors){
        case 0:
            VALOR=M_FULL_STEP[ stepper_stateF ]<<4;
            output_B(VALOR);
            PIN_OFF(OC1);
            delay_us(20);
            PIN_ON(OC1);
            break;
        case 1:
            output_B(M_FULL_STEP[stepper_stateF]);
            PIN_OFF(OC1);
            delay_us(20);
            PIN_ON(OC1);
            break;
        case 2:
            VALOR=M_FULL_STEP[stepper_stateF]<<4;
            output_B(VALOR);
            PIN_OFF(OC2);
            delay_us(20);
            PIN_ON(OC2);
            break;
        case 3:
            output_B(M_FULL_STEP[ stepper_stateF ]);
            PIN_OFF(OC2);
            delay_us(20);
            PIN_ON(OC2);
            break;
    }
    if(dir!='F')
        stepper_stateF=(stepper_stateF+1)&(sizeof(M_FULL_STEP)-1);
    else
        stepper_stateF=(stepper_stateF-1)&(sizeof(M_FULL_STEP)-1);
}
    delay_ms(speed);
//    Parar_motores(speed);
}
```

Código Fonte E.3 – Biblioteca de acionamento dos motores de passo em meio-passo e passo em duplo torque