

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento de um fluorímetro microcontrolado para
determinação de clorofila *a* em águas superficiais

Aluno: Thiago Brito Guerreiro*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA (área:
QUÍMICA ANALÍTICA).

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria

* Bolsa CNPQ

São Carlos
2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

G934df

Guerreiro, Thiago Brito.

Desenvolvimento de um fluorímetro microcontrolado para determinação de clorofila *a* em águas superficiais / Thiago Brito Guerreiro. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
87 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Análise fotométrica. 2. Fluorimetria. 3. Microcontrolador.
4. Tecnologias de baixo custo. I. Título.

CDD: 543.0852 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico do candidato **Thiago Brito Guerreiro**, realizada em 29 de julho de 2010:*



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Prof. Dr. Fabio Rodrigo Piovezani Rocha

Muitos na ganância fútil perderam a felicidade e
iniciaram uma busca incansável nos sonhos de outrem.
Pobres homens que não tem Deus em suas vidas.

As letras saltam
e as palavras vibram...

Na vida o passado é apenas uma biblioteca
onde a cada momento chegam novas publicações
merecendo apenas algumas consultas para o planejamento do futuro.

A prosperidade de uma família consiste
em pais e filhos sonharem juntos...

AGRADECIMENTOS

A Deus que acredito que é um ser, e estou diariamente a conversar com Ele, e agradeço-lhe pelo fortalecimento recebido a cada dia.

Ao programa de Pós-Graduação em química pelo auxílio na realização deste estudo e pela atitude louvável em acreditar no potencial de todos os alunos brasileiros com aplicação das provas em muitos estados do Brasil.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico) pela bolsa concedida no período de agosto/2007 a agosto/2009.

Aos Prof. Dr. Ronaldo C. Faria que me aceitou como orientando e tem me aturado até o momento.

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho que não desiste nunca. Obrigado pelo apoio moral.

Aos amigos do grupo de pesquisa LABBES e LABiE que sem dúvida contribuíram e torceram pela conclusão deste trabalho.

A Profa. Dra. Odete Rocha e ao Dr. José Valdecir de Lucca do Departamento de Ecologia da UFSCAR pela disponibilização da infra-estrutura e orientação na análise da clorofila *a*.

Ao Prof. Dr. Hidetake Imasato e Cláudia Bernal do Instituto de Química da USP em São Carlos pela disponibilização do instrumento para realização das análises fluorimétricas.

Ao Prof. Dr. Edenir, Kelber e Marcelo pelas dicas em quimiometria e pelo uso do software para análise de dados.

Aos meus irmãos há mais tempo e menos tempos: Ana Paula, Levy, Osmundo, Amália, Quésia, Vagner, Thiago, Ana Cláudia, Noêmia, Carolina, Paulo Henrique, Daniel (tigrão), André Petronillo e família e a José e Edinalva.

Aos meus pais Pr. Antônio Guerreiro e Maria Ivanilza que nunca deixam de apoiar aqueles a quem amam. Além do apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Fotodiodo de avalanche (do inglês, avalanche photo diode)
CCD	Dispositivo de carga acoplada (do inglês Charge-Coupled Device)
EEPROM	Memória de armazenamento não-volátil (do inglês <i>Electrically-Erasable Programmable Read-Only Memory</i>)
FL	Fluoresceína.
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos (do inglês <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
LCD	Display de cristal líquido (do inglês <i>liquid crystal display</i>).
LD	Limite de detecção
LED	Diodo emissor de luz (do inglês, light emitting diode)
LQ	Limite de quantificação
PCA	Análise de componentes principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i>)
PIC	Interface controladora de periféricos (do inglês <i>peripheral interface controller</i>)
PLS	Mínimos quadrados parciais (do inglês <i>Partial Least Squares</i>)
PRT	Ponte retificadora de diodos
R	Coeficiente de correlação
R6G	Rodamina 6G
RAM	Memória de acesso aleatório, (do inglês, <i>random access memory</i>)
RS 232	Porta de comunicação (do inglês <i>Recommended Standard 232</i>)
USART	Transmissor/Receptor Universal Síncrono e Assíncrono (do inglês <i>Universal Synchronous Asynchronous Receiver Transmitter</i>)

USB Porta de comunicação USB (do ingles *Universal Serial Bus*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Esquema simplificado de um fluorímetro e seus principais componentes.....	6
Figura 3.1. Microcontrolador PIC18F4550	22
Figura 3.2. Espectro de emissão de LEDs.....	25
Figura 3.3. Fotografia da placa de estudos PICGenios da Microgenios®	27
Figura 3.4. Esquema do circuito da fonte de alimentação.....	28
Figura 3.5. Esquema do circuito eletrônico para funcionamento do microcontrolador PIC 18F4550.....	29
Figura 3.6. Esquema do circuito eletrônico do fluorímetro.....	30
Figura 3.7. Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para conexão do detector TCS 230 as portas dos microcontrolador PIC 18F4550.....	31
Figura 3.8. Esquema do circuito eletrônico do teclado de acesso as funções.....	32
Figura 3.9. Esquema do circuito eletrônico das fontes de excitação do fluorímetro.....	32
Figura 3.10. Esquema do circuito eletrônico para interface usando comunicação serial RS 232.	33
Figura 3.11. Circuito eletrônico do sensor de temperatura LM35 com saída de sinal no terminal R (1) conectado à entrada analógica RA0 do microcontrolador.....	34
Figura 3.12. Circuito eletrônico do sistema de refrigeração.....	35
Figura 3.13. Figura esquemática do fluorímetro proposto com os principais componentes conectados a um microcontrolador PIC 18F4550.....	36
Figura 3.14. Protótipo do fluorímetro proposto com distribuição dos componentes eletrônicos de interface e uma tampa protetora de luminosidade para o compartimento óptico.....	37
Figura 3.15. Fluxograma do programa gravado no PIC18F4550 para controle e aquisição de dados.....	39

Figura 5.1. Estudo do tempo de estabilização do fluorímetro proposto.	57
Figura 5.2. Variação de fluorescência em função de concentração de fluoresceína em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sob influência da variação de temperatura entre 17 – 33 °C.....	58
Figura 5.3. Gráfico da temperatura (°C) em função do sinal de fluorescência no fluorímetro proposto para fluoresceína em a) 0,5, b) 20,0, c) 50,0 e d) $80,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com excitação em 476 nm.....	59
Figura 5.4. Gráfico do espectro fluorescência relativa no fluorímetro F2500 para rodamina e fluoresceína.	60
Figura 5.5. Espectro de absorção de espécies fluorescentes em HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	61
Figura 5.6. Gráfico de fluorescência relativa com o fluorímetro proposto.....	62
Figura 5.7. Curva analítica para determinação de fluoresceína (exc. LED1 – 405 nm).....	63
Figura 5.8. Gráfico de concentrações de fluoresceína no fluorímetro proposto. Fluoresceína (LED2 – 476 nm).....	65
Figura 5.9. Curva de calibração de usando-se o fluorímetro proposto. Fluoresceína (LED2 – 476 nm) em HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	66
Figura 5.10. Variação de fluorescência relativa em função do tipo de filtro do detector para concentrações de Rodamina 6G (exc. LED 01 - 405 nm) no fluorímetro proposto.....	68
Figura 5.11. Curvas de calibração usando-se o fluorímetro proposto para rodamina 6G (exc. LED 01 - 405 nm) em HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	69
Figura 5.12. Concentrações de Rodamina 6G no fluorímetro proposto.....	71
Figura 5.13. Curva de calibração para rodamina 6G (exc. LED2 - 476 nm) em HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando-se o fluorímetro proposto.....	72
Figura 5.22. Curva de calibração para clorofila a obtida utilizando-se o fluorímetro proposto.....	75

LISTA DE TABELA

Tabela 4.1. Equações para análise de variância pelo MMQ.....	46
Tabela 5.1. Comparação dos valores de R, F, LD, LQ e S para determinação de fluoresceína (exc. 405 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.....	64
Tabela 5.2. Valores médios de concentração de fluoresceína (exc. 405 nm, em. 540 nm) dentro do intervalo da faixa linear de concentrações obtidos para amostras sintéticas. Em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (n = 3).....	64
Tabela 5.3. Comparação dos resultados de R, F, LD, LQ e S para determinação de fluoresceína (exc. 476 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.....	67
Tabela 5.4. Valores médios de concentração de fluoresceína (exc. 476 nm, em. 540 nm) dentro do intervalo da faixa linear de concentrações obtidas para amostras sintéticas. Em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, n = 3.....	67
Tabela 5.5. Comparação dos resultados de R, F, LD, LQ e S para determinação de rodamina 6G (exc. 405 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.....	69
Tabela 5.6. Valores médios de concentração de fluoresceína (exc. 405 nm, em. 540 nm) dentro do intervalo da faixa linear de concentrações obtidas para amostras sintéticas. Em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, n = 3.....	70
Tabela 5.7. Comparação dos resultados de R, F, LD, LQ e S para determinação de rodamina 6G (exc. 476 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.....	73
Tabela 5.9. Concentrações de clorofila a e feopigmentos em amostras de águas usando-se o método fotométrico e fluorimétrico (n = 3).....	74

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM FLUORÍMETRO MICROCONTROLADO PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA A EM ÁGUAS SUPERFICIAIS. Neste trabalho foi desenvolvido um fluorímetro portátil para determinação de clorofila *a* em águas superficiais. O instrumento foi construído utilizando os seguintes componentes: um microcontrolador (PIC18F4550), dois LEDs como fonte de radiação, um fotodiodo multicanal (TCS-230) como detector e um mostrador digital. Foram utilizados LEDs com máximo de emissão em 405 e 476 nm. O detector utilizado é dotado de três filtros ópticos internos com máximos de transmissão em 480, 540 e 680 nm permitindo, ainda a sua utilização sem os filtros com elevada sensibilidade em toda a região do espectro visível(máximo em torno de 690 nm). O microcontrolador atua como unidade central de processamento sendo todos os componentes do instrumento controlados por ele a partir de um programa previamente gravado em sua memória, dispensando o uso de um microcomputador. O fluorímetro construído foi calibrado utilizando soluções de fluoresceína e rodamina 6G em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e o desempenho foi comparado com um espectrofluorímetro de bancada, sendo os resultados obtidos concordantes a nível de confiança de 95%. Foi obtida uma faixa de resposta linear para fluoresceína entre $0,5$ e $100,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação de 0,996 e para rodamina 6G uma faixa linear de resposta entre $0,2$ e $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação de 0,989. A instrumentação desenvolvida foi utilizada para a determinação de clorofila *a* em amostras de água superficiais e em amostras de meio de cultura de algas azuis e os resultados foram concordantes ao nível de significância de 95 % quando comparados com um método comparativo espectrofotométrico. Para a clorofila *a* obteve-se uma faixa de concentração entre $2,5$ e $1333,6 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação linear de 0,995. O intervalo obtido atende à resolução CONAMA n° 357 que dispõe sobre a classificação da qualidade de corpos d'água que estabelece as concentrações de $10,0$, $30,0$ e $60,0 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ para os diferentes tipos de classes de águas. O fluorímetro construído é de baixo custo, de fácil utilização, de baixo consumo de corrente permitindo sua utilização com pilhas ou baterias e de reduzidas dimensões (10 cm x 20 cm x 15 cm) com massa total de 0,76 kg. O fluorímetro pode ser utilizado na determinação de espécies com excitação em 405 e/ou 476 nm e emissão em toda a faixa do visível com excelente desempenho.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A MICROCONTROLLER FLUORIMETER FOR DETERMINATION OF CHLOROPHYLL A IN WATER SAMPLES. In this work a portable fluorimeter was developed and used for determination of chlorophyll *a* in water samples. The instrument was constructed using the following components: a microcontroller (PIC18F4550), two LEDs as light source, a multichannel photodiode (TCS-230) as detector and a digital display. LEDs with maximum emission at 405 and 760 nm were used. The detector is equipped with three internal optical filters inside with maximum sensitivity at 480, 540 and 690 nm besides the possible use without the optical filter with high sensitivity in the visible spectral region with maximum sensitivity at 680 nm. The microcontroller works as central processing unit controlling all components of the instrument by a program previously recorded in its memory eliminating the need of a microcomputer. The fluorimeter was calibrated using standard solutions of fluorescein and rhodamine 6G in HCl $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ and performance was compared with a commercial spectrofluorimeter, and the results are in agreement at a confidence level of 95%. A linear response range for fluorescein was obtained between 0.5 and $100.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and a correlation coefficient of 0.996 and for rhodamine 6G a linear response range between 0.2 and $10.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ was obtained and a correlation coefficient of 0.989. The fluorimeter was used for determination of chlorophyll *a* in water samples and blue algae culture medium. The results were compared with a spectrophotometric method and were in agreement at a confidence level of 95%. A linear range of between 2.5 and $1333.6 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ for chlorophyll *a* was obtained with a correlation coefficient of 0.995. The concentration range attend the requirements of CONAMA resolution n° 357 that classifies the water quality covering the concentrations of 10.0 , 30.0 and $60.0 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ for different classes of water. The fluorimeter is inexpensive, easy to use shows, low power consumption allowing the feed with batteries, small size (10 cm x 20 cm x 15 cm) and with weight of 0.76 kg. The fluorimeter can be used to determine species with excitation at 405 and or 476 nm and emission across the visible range with excellent performance.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELA	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Técnicas espectrométricas.....	2
1.2. Instrumentação.....	6
1.2.1. Fonte de radiação.....	7
1.2.2. Seletores de comprimento de onda.....	9
1.2.2.1. Filtros ópticos.....	10
1.2.2.2. Monocromadores.....	10
1.2.3. Detectores ópticos.....	10
1.2.3.1. Célula fotomultiplicadora.....	12
1.2.3.2. ADP.....	12
1.2.3.3. Fotodiodos.....	12
1.2.3.4. Arranjos de Fotodiodos.....	12
1.2.3.5. Fototransistores.....	13
1.2.3.6. CCD.....	13
1.2.3.7. Detectores inteligentes.....	13
1.2.4. Dispositivo de leitura e controle.....	13
1.3. Revisão bibliográfica.....	14
2. OBJETIVO.....	18
3. ESTUDO DOS COMPONENTES E DESENVOLVIMENTO DO CIRCUITO ELETRÔNICO.....	20
3.1. Estudo dos componentes eletrônicos.....	21
3.1.1. Microcontrolador.....	21
3.1.2. Detector TCS 230.....	23
3.1.3. Fonte de radiação.....	24
3.1.4. Fonte da alimentação.....	25
3.1.5. Sensor de temperatura LM35.....	25

3.1.6. Interface USB 2.0	26
3.1.7. Interface RS232.....	26
3.1.8. LCD.....	26
3.1.9. Placa de estudos	27
3.2. Desenvolvimento do circuito eletrônico	28
3.2.1. Fonte.....	28
3.2.2. Microcontrolador.....	29
3.2.3. LCD.....	30
3.2.4. Sistema de detecção TCS 230.....	30
3.2.5. Teclado de controle	31
3.2.6. LED	32
3.2.7. Interface.....	33
3.2.8. Sistema de controle de temperatura	34
3.3. Montagem do protótipo.....	35
3.3.1. Programa desenvolvido em linguagem C	37
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1. Reagentes e soluções	41
4.2. Materiais e instrumentos	42
4.3. Calibração	42
4.3.1. Estabilidade da fonte luminosa de radiação.....	42
4.3.2. Estudo da influência da temperatura no fluorímetro proposto	43
4.3.3. Razão sinal/ruído.....	43
4.3.4. Calibração univariada	43
4.3.4.1. Linearidade	43
4.3.4.2. Limite de detecção	44
4.3.4.3. Limite de quantificação	44
4.3.4.4. Sensibilidade	44
4.3.4.5. Precisão.....	45
4.3.4.6. Análise de variância	45
4.5. Estratégia de validação.....	46
4.6. Determinação de clorofila a.....	47
4.6.1. Material e equipamentos	47
4.6.2. Reagentes, soluções e amostras	47
4.6.3. Procedimento analítico	48
4.6.3.1. Método de referência.....	48
4.6.3.2. Método comparativo	49

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1. Estabilidade da fonte de radiação	52
5.2. Estudo da variação de temperatura no circuito eletrônico	53
5.3. Calibração univariada	54
5.3.1. Estudo da utilização do fluorímetro proposto para determinação de fluoresceína	56
5.3.2. Estudo da utilização do fluorímetro proposto para determinação de Rodamina 6G	63
5.4. Determinação de clorofila a	69
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE	79
ANEXO	87

Capítulo

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Técnicas espectrométricas

Os métodos espectrométricos utilizam da interação da radiação eletromagnética que pode ser na região do ultravioleta e visível (UV/Visível) com a matéria, sendo classificados segundo a forma de interação. Nos métodos espectrométricos podem ocorrer os seguintes tipos de fenômeno^{1, 2}: absorção, emissão ou espalhamento.

Para que ocorra o processo de emissão da radiação, uma espécie deve ser excitada e capaz de liberar energia com emissão de radiação na faixa espectral de radiação eletromagnética ultravioleta, visível ou infravermelho de acordo com as características de cada espécie. Esses métodos são chamados de luminescentes, e classificados segundo o processo de excitação da espécie. Alguns fenômenos luminescentes e as respectivas formas de excitação são mostrados abaixo³.

✓ Fotoluminescência	Absorção da radiação eletromagnética
✓ Radioluminescência	Radiação ionizante
✓ Catodoluminescência	Raios catódicos
✓ Eletroluminescência	Potencial elétrico
✓ Quimiluminescência	Processo químico
✓ Bioluminescência	Processo químico em sistema biológico
✓ Sonoluminescência	Ultrassom

Quando uma radiação interage sobre uma matéria, podem ocorrer dois tipos de efeitos físicos, absorção ou espalhamento da radiação. As espécies que emitem radiação, ao serem expostas à radiação eletromagnética, são chamadas de fotoluminescentes.

As espécies fotoluminescentes quando no estado fundamental possuem elétrons que podem ser promovidos para níveis de energia mais altos

desocupados, assim, quando expostos a radiação de determinados comprimentos de onda, passam para um estado excitado. Os grupos que absorvem a radiação podem ser os fluoróforos ou cromóforos². Os fluoróforos no processo de relaxação liberaram parte da energia na forma de fótons, retornando ao estado fundamental com emissão de radiação.

As espécies fotoluminescentes são classificadas em fluorescentes e fosforescentes. Em espécies fluorescentes o tempo de emissão é muito curto da ordem de 10^{-15} s, bem menor que as fosforescentes, que são tipicamente na ordem de microssegundos a segundos⁴.

Os métodos baseados na determinação de espécies fluorescentes são mais ricos em informações do que os métodos espectrofotométricos, pois dois tipos de espectros podem ser obtidos de uma espécie simultaneamente, o espectro de excitação e o espectro de emissão⁵. Com esta vantagem as técnicas fluorescentes são excelentes para aplicações em diversas áreas como à química, bioquímica, biologia e medicina, por serem de elevada sensibilidade e em muito casos por terem boa seletividade em relação aos métodos espectrofotométricos, além da possibilidade em detecção espacial, temporal e pontual^{3, 4}.

Campos de aplicações^{4, 6}:

- Quantificação de compostos aromáticos⁷, orgânicos, moléculas orgânicas presentes em baixas concentrações, especialmente em amostras biológicas e ambientais⁸;
- Detecção em cromatografia (especialmente cromatografia líquida de alto eficiência) e eletroforese;
- Imunoensaio, procedimentos específicos para a detecção de componentes de sistemas biológicos⁹;
- Pode ser aplicado no sensoriamento remoto atmosférico, hídrico e aquático.
- Os métodos fluorimétricos possuem em geral baixo limite de detecção e uma larga faixa de detecção, no entanto, possuem menor número de aplicações que os métodos espectrofotométricos de absorção devido ao menor número de espécies que correspondem à técnica.

Em técnicas fluorimétricas³, os fluoróforos são distinguidos pelas bandas de radiação eletromagnética de absorção e emissão. Uma banda é compreendida por uma faixa de comprimentos de onda, estes devem-se aos níveis vibracionais permitidos pela molécula. Para se alterar o estado energético de uma molécula, uma quantidade discreta de energia é necessária. A energia envolvida no processo pode ser descrita pela equação $E = \hbar\nu$ (eV/molécula), em que \hbar e ν são constantes de Planck e frequência da radiação, respectivamente. Uma relação com o comprimento de onda, λ , pode ser encontrada, pela equação, $\nu = c/\lambda$, sendo c a velocidade da luz. Bandas de absorção e emissão das moléculas são obtidas por espectrômetros e espectrofluorímetros e devem-se aos muitos níveis de energia possíveis de uma molécula.

Em uma solução, a intensidade da radiação eletromagnética emitida é proporcional ao número de moléculas excitadas e, portanto, da intensidade de luz absorvida pelas espécies excitadas. A intensidade de radiação absorvida por um cromóforo em um comprimento de onda chama-se absorbância, $A_{(\lambda)}$, e pode ser descrita pela lei de Beer².

$$A_{(\lambda)} = \log \frac{I_0}{I_T} = \varepsilon_{(\lambda)} \cdot l \cdot c \quad (1.1)$$

Onde I_0 e I_T são a intensidade da radiação incidente na amostra, e a radiação transmitida, ε ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) o absorvidade molar, c ($mol \cdot L^{-1}$) a concentração do cromóforo e, l (cm) o comprimento do caminho óptico da solução.

Sabe-se que a intensidade emitida da espécie excitada $I_{F(\lambda)}$ é proporcional ao intensidade da radiação absorvida $I_{A(\lambda_{ex})}$. Fazendo-se a diferença entre a intensidade de radiação incidente e a radiação transmitida, encontra-se $I_{A(\lambda_{ex})}$:

$$I_{A(\lambda_{ex})} = I_{0(\lambda_{ex})} - I_{T(\lambda_{ex})} \quad (1.2)$$

A Equação 1.2 da intensidade fluorescente pode ser escrita como o produto da intensidade da radiação incidente sobre a espécie fluorescente e o rendimento quântico fluorescente, ϕ , da espécie. Uma constante de proporcionalidade, k , é inserida na equação devido à intervenção de alguns fatores (ângulos de incidência e de emissão, radiação espúria, espalhamento entre outros).

$$I_{F(\lambda)} = k \phi \left(I_{0(\lambda_{ex})} - I_{T(\lambda_{ex})} \right) \quad (1.3)$$

Substituindo a intensidade da radiação incidente e da radiação transmitida pela equação da lei de Beer, encontra-se uma relação entre a concentração do fluoróforo e o sinal de fluorescência, equação 4.1.

$$I_{F(\lambda)} = k \phi I_{0(\lambda_{ex})} \left(1 - 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l} \right) \quad (1.4)$$

Por esta equação pode-se constatar que a relação entre a fluorescência e a concentração não são lineares, pois, o termo da concentração é um dos expoentes da equação. Uma equação simplificada para fluorescência pode ser obtida a partir da equação acima quando o termo “ $\epsilon \cdot c \cdot l$ ” for menor que 0,1. Em solução diluída esta condição é alcançada e a equação pode ser escrita:

$$I_{F(\lambda)} = \ln(10) \cdot k \cdot \phi \cdot I_{0(\lambda_{ex})} \cdot \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1.5)$$

Se todos os termos da equação acima forem constantes, k'' , como a intensidade da radiação para excitação das espécies, a eficiência de todos os componentes ópticos, exceto a concentração, c , obtêm-se uma equação simplificada para fluorescência.

$$I_{F(\lambda)} = K'' \cdot c \quad (1.6)$$

1.2. Instrumentação

A detecção de um analito fluorescente é realizada utilizando-se um fluorímetro operando com excitação e detecção nos comprimentos de onda característicos da espécie de interesse¹⁰. Para obtenção do comprimento de onda de excitação em que a espécie apresenta maior intensidade de emissão, obtém-se um espectro de absorção usando-se um espectrofotômetro e o comprimento de onda de maior absorbância é utilizado para excitação da espécie.

Os fluorímetros convencionais são equipados com os seguintes componentes: fonte de radiação, monocromador, componentes ópticos, detector, dispositivo de controle eletrônico, dispositivo de saída. Na Figura 1.1 tem-se um diagrama de blocos de um fluorímetro. Um monocromador seleciona o comprimento de onda da fonte de excitação, a qual incidirá sobre a amostra, e a radiação emitida pela espécie fluorescente passa por um segundo monocromador que irá incidir no detector. O detector é posicionado a um ângulo de 90° em relação ao feixe de radiação incidente na amostra. Sinal gerado pelo detector são coletados pelo dispositivo de controle seguido pelo processamento do sinal e podem ser acessados pelo operador no dispositivo de saída (interface).

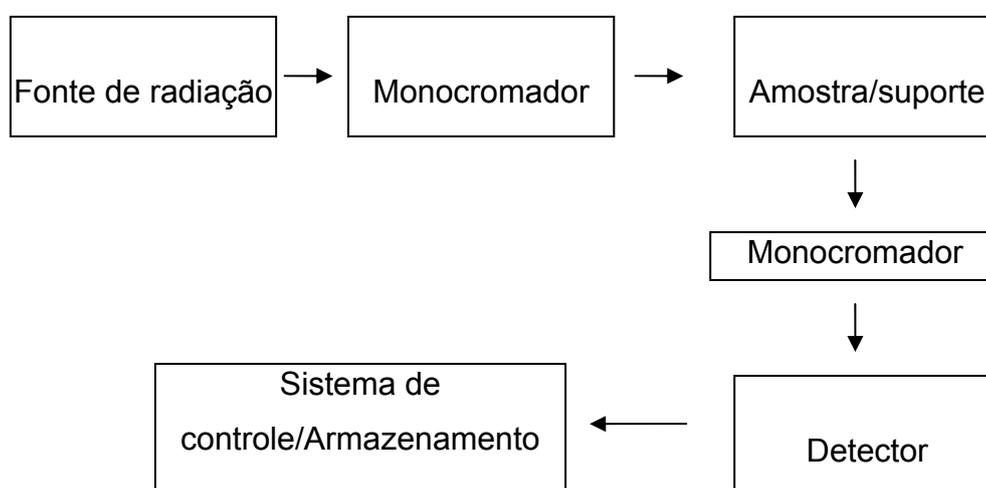


Figura 1.1. Esquema simplificado de um fluorímetro e seus principais componentes.

Monocromadores e filtros ópticos tem como função selecionar o comprimento de onda de excitação e emissão, além de isolar radiações indesejáveis.

1.2.1. Fonte de radiação

Em estudos espectrofotométricos uma fonte de radiação deve gerar potência suficiente para que, após a interação com o analito, seja devidamente quantificada. Para este fim, diversos tipos de fontes de radiação podem ser utilizadas em instrumentos para medidas fluorimétricas e são selecionadas conforme a faixa de emissão desejada, em alguns casos, é necessário que o sinal seja pulsado¹¹.

A variação da intensidade luminosa no tempo, e o tempo de estabilização são fatores importantes na escolha deste dispositivo para instrumentação analítica. Dentre as fontes de radiação mais comuns encontradas em fluorímetros temos:

- Lâmpada de arco de xenônio de alta pressão;
- Diodo emissor de luz (LED);
- Laser¹² (do inglês *light amplification by stimulated emission of radiation*);
- Diodo laser;
- Lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão.

As lâmpadas de arco de xenônio de alta pressão emitem com intensidade praticamente uniforme entre 300 e 800 nm, e as lâmpadas de mercúrio de baixa pressão emitem linhas entre 250 e 600 nm. Essas lâmpadas são as principais fontes de radiação encontradas em fluorímetros e espectrofluorímetros, porém, necessitam de uma fonte de alimentação estável, de alta potência e elevada tensão, além de ser necessário o uso de um monocromador ou filtro óptico para selecionar a faixa do espectro para excitação das espécies fluorescente em solução.

Os LEDs, diodos laser e laser emitem radiação eletromagnética na região do visível ou do ultravioleta com estreita largura de banda e, dispensam o uso de dispositivos ópticos para seleção dos comprimentos de onda, porém, fica-se limitado a uma estreita região do espectro, reduzindo o número de aplicações.

Os lasers, destacam-se por serem fontes de radiação eletromagnética mais intensas, apresentam estreita banda de emissão e feixe pontual, no entanto, para o bom funcionamento, uma fonte de alimentação potente e um sistema para controle de temperatura são necessários.

Os LEDs¹³ nas últimas décadas tiveram grandes avanços¹⁴, tornando viável o uso como fonte de radiação em diversas áreas¹⁵. Os LEDs são fabricados com materiais semicondutores dos tipos p e n . Nesse dispositivo há uma junção entre esses dois tipos de materiais semicondutores. Em semicondutores do tipo p , há elétrons livres no material, enquanto naqueles do tipo n , faltam elétrons e formam-se lacunas.

Fazendo-se um contato físico entre os dois tipos de materiais e aplicando-se uma diferença de potencial entre esses dois materiais, com polo positivo em p e negativo em n , o material torna-se condutor pois, os elétrons e as lacunas se deslocam para a região de interface entre os dois materiais semicondutores, a junção, e a partir de certo potencial entre os dois semicondutores, os elétrons ultrapassam a junção e preenchem as lacunas em n , tornando-se um dispositivo condutor, e radiação eletromagnética é gerada na junção.

Muitas pesquisas foram feitas no sentido de desenvolver LEDs com emissão em diferentes comprimentos de ondas, ao usar diversos materiais semicondutores¹⁴ foi possível alterar a energia na junção. Isto tornou conveniente o uso deste componente em aplicações diversas que necessitam de características como:

- Vida útil: tempo médio de funcionamento do dispositivo em condições viáveis para utilização, pode chegar à aproximadamente 10 anos;
- Boa estabilidade: em poucos minutos a intensidade torna-se constante ao longo do tempo sem variações consideráveis;
- Baixo custo: são dispositivos emissores de radiação eletromagnética na região do UV-Vis de mais baixo custo encontrados atualmente.

- Baixo consumo de corrente: não é necessário o uso de uma fonte de alimentação potente, os mesmos podem ser alimentados com fontes de 3 V, que incluem pilhas.
- Alta eficiência: pouca energia é perdida com liberação de calor.
- Pequena dimensão: o tamanho reduzido contribui com a portabilidade, fácil fixação e direcionamento do feixe óptico.
- Encapsulamento resistente.
- Feixe de luz emitido: a flexibilidade na forma do encapsulamento do componente permite a produção do dispositivo com feixe concentrado ou espalhado.
- Largura da banda de emissão: são encontrados LEDs com larguras de banda emissão entre 15 e 50 nm.

Além dessas vantagens é possível obter um sinal de radiação pulsado aplicando-se corrente modulada ao LED. Nos últimos anos foram desenvolvidos LEDs de luz branca que emitem radiação de 400 a 750 nm, com elevada potência¹⁶. Diversas aplicações destes dispositivos foram feitas em equipamentos de sinalização, iluminação, indicadores em painéis e outras. Com tantas aplicações, hoje são dispositivos comuns encontrados em lojas de componentes eletrônicos.

O diodo laser^{10,17} é um componente constituído de materiais semicondutores com junção do tipo *pn*, baseado no refletor distribuído de Bragg. São fontes de elevada potência radiante, monocromáticos com feixe pontual, possuem eficiência de 30%, necessitam de baixa voltagem para alimentação e apresentam uma variação de $0,1 \text{ nm.}^\circ\text{C}^{-1}$. O maior impedimento ao uso de diodos laser em instrumentação analítica deve-se limitação no número de comprimentos de ondas disponíveis.

1.2.2. Seletores de comprimento de onda

Os seletores ópticos são usados para seleção de comprimentos de ondas a partir de uma fonte de radiação policromática ou para obtenção apenas da fluorescência da espécie excitada.

1.2.2.1. Filtros ópticos

São componentes ópticos mais simples que permitem a transmissão de radiação em um intervalo de comprimento de onda. Eles são classificados basicamente em filtros de absorção ou de interferência. Com uso de filtros ópticos nos métodos espectrométricos, geralmente são alcançadas melhores sensibilidades da curva analítica da espécie de interesse, pois comprimentos de onda que não correspondem à interação da espécie de interesse no sistema são eliminados por este dispositivo.

Em muitos instrumentos os detectores utilizados apresentam uma larga faixa de resposta, fotossensível aos comprimentos de ondas da fonte de excitação. Como as fontes de radiação de instrumentos de fluorescência são geralmente potentes, então, filtros ópticos são componentes úteis para impedir a passagem de regiões indesejadas de comprimentos de onda provenientes da fonte. Podendo alcançar níveis em que o sinal do fluoróforo seja insignificante frente a esta radiação.

1.2.2.2. Monocromadores

Os monocromadores são componentes ópticos que dispersam ou difratam os comprimentos de onda constituintes de radiação policromática em uma ampla faixa de comprimentos de onda. Os principais componentes dos monocromadores são: rede de difração, lentes, espelhos e fendas. Nos espectrofotômetros e espectrofluorímetros esses componentes são essenciais para a varredura em comprimento de onda para obtenção de um espectro característico de uma dada espécie. Nos espectrofluorímetros o sinal característico fluorescente de uma espécie pode ser disperso pelo monocromador e lido por um detector referente a cada comprimento de onda gerando-se um gráfico do comprimento de onda verso a intensidade, o espectro de fluorescência.

1.2.3. Detectores ópticos

Detectores ópticos¹⁵ são dispositivos que possuem superfície sensível a fótons, capazes de converter a radiação eletromagnética incidente em um sinal elétrico, processo conhecido como transdução. Em geral, a resposta gerada pelo

fóton absorvido depende do tipo de interação do fóton com a superfície do detector, em que pode haver a produção de fotocorrente ou variação de condutividade do material. A fotocorrente é resultante da absorção de um fóton seguida pela emissão de um elétron, enquanto a variação de condutividade se dá pela promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução.

A sensibilidade e os comprimentos de onda de resposta do detector são determinados pelo tipo de material utilizado. Em um detector fotoelétrico ideal o sinal elétrico produzido é proporcional à quantidade de fótons, e na ausência de fótons o sinal elétrico deve ser igual a zero. Entretanto, esse nível de eficiência ainda não foi alcançado, pois um certo sinal de corrente pode ser medido no detector, mesmo na ausência total de radiação, chamado de corrente do escuro. Entre os parâmetros mais importantes em um detector está a capacidade de detectar pequenas variações da intensidade da radiação, chamado de resolução. Com o desenvolvimento em materiais e tecnologia construção, detectores com melhor resolução, maior faixa linear e mais robustos estão sendo produzidos.

No mercado uma grande variedade de detectores ópticos podem ser encontrados viabilizando o desenvolvimento de novos instrumentos e aplicações diversas. Dentre os principais parâmetros para escolha de um detector, tem-se o tipo de resposta, tempo de resposta, sensibilidade à temperatura, tensão de alimentação, tempo de estabilização, eficiência, ganho e a faixa de resposta. Entre os fotodetectores de aplicação predominante em instrumentos estão a célula fotomultiplicadora, fotodiodos¹⁸ e ADP (*Avalanche Photodiode*)¹⁹, Dispositivos de acoplamento de carga (CCD do inglês, *Charge-Coupled Device*) e fotodetector com filtros acoplados²⁰. Há também os detectores inteligentes, nos quais em um único componente estão o detector e um microprocessador. Adiante são descritos alguns detectores ópticos mais utilizados em aplicações analíticas.

A escolha de um fotodetector é uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de um instrumento. Yotter e Wilson²¹ orientam sobre alguns parâmetros e ressaltam entre eles a eficiência quântica e a potência equivalente de ruído como os principais.

1.2.3.1. Célula fotomultiplicadora

As células fotomultiplicadoras são usadas como detectores em fluorímetros, sua principal característica é a possibilidade de detecção de poucos fótons, além disso, possui baixo ruído e larga faixa espectral de resposta que compreende de 115 a 1400 nm. No entanto a alta voltagem necessária para alimentação e a fragilidade dificultam a aplicação deste componente em instrumentos portáteis.

1.2.3.2. ADP

Os ADP's são dispositivos sólidos de alta sensibilidade e de pequeno tamanho que respondem a faixa espectral de 400 e 1000 nm com ganho entre 50 a 100 %. Possuem princípio de funcionamento similar as células fotomultiplicadoras. O elevado custo e a necessidade de um sistema para controle de temperatura são as principais desvantagens deste detector.

1.2.3.3. Fotodiodos

Os fotodiodos são dispositivos semicondutores constituídos basicamente de silício, de pequeno tamanho, encapsulamento robusto, baixo custo, ampla faixa de resposta (190 e 1100 nm) e baixa tensão de alimentação. No entanto, são menos sensíveis que as células fotomultiplicadoras e possuem baixo ganho do sinal de saída, necessitando de um circuito eletrônico para compensar parte dessa deficiência.

1.2.3.4. Arranjos de Fotodiodos

Os arranjos de fotodiodos consistem em pequenos fotodiodos distribuídos sobre uma matriz linear ou bidimensional, que está na superfície de um chip que coleta o sinal diretamente de cada detector de forma independente. Para aquisição do sinal, um protocolo deve ser seguido conforme o princípio de funcionamento de cada chip. A possibilidade de detecção espacial é umas das vantagens do arranjo de fotodiodos. No entanto, requer um sistema de controle bem elaborado para obtenção do sinal.

1.2.3.5. Fototransistores

Os fototransistores são componentes de funcionamento similar aos fotodiodos. A principal diferença entre eles está no tempo de resposta e na sensibilidade, pois fototransistores são mais sensíveis, porém, um maior tempo de resposta é requerido. O sinal de saída é cerca de cem vezes maior do que o sinal de saída de um fotodiodo.

1.2.3.6. CCD

Os CCD são dispositivos que necessitam de maior tempo de resposta que os outros detectores descritos neste trabalho, pois o sinal gerado pela incidência da radiação é integrado, gerando uma carga que é acumulada por certo tempo, para ser liberada para o circuito de detecção. Devido maior tempo de para acumulo de carga os CCD`s são sensíveis em baixos níveis de radiação e apresentam uma elevada resolução.

1.2.3.7. Detectores inteligentes

Com a descoberta de novas técnicas de fabricação e novos materiais foi possível desenvolver os detectores inteligentes. São dispositivos nos quais um único encapsulamento pode conter detector, um chip para o pré-processamento do sinal e filtros ópticos aplicados diretamente sobre área do detector. Na etapa de pré-processamento o sinal lido no detector é convertido em uma forma de sinal elétrico mais robusto. Como exemplo, tem-se aqueles utilizados em câmeras fotográficas digitais que possuem três tipos de filtros: verde, azul e vermelho. Além disso, podem ser programados para converter o sinal de fotocorrente ou fotoelétrico em uma forma de sinal mais robusta, como frequência ou sinal digital.

1.2.4. Dispositivo de leitura e controle

Os dispositivos de leitura são dispositivos que transformam o sinal de resposta de um detector em uma forma de sinal que pode ser interpretado pelo usuário. Atualmente os computadores e os microprocessadores estão entre os

principais dispositivos de leitura encontrados nos instrumentos, e desempenham as funções de processamento, formatação e controle dos dados, além de realizarem o controle total do sistema.

Microprocessadores^{22, 23} possuem algumas vantagens para aplicação em instrumentos portáteis como baixo consumo de corrente, pequeno tamanho e o baixo custo. Este componente pode ser usado em instrumentos de rotina que geralmente necessitam de desenvolvimento de um programa embarcado, além de possibilitar conexão com outros dispositivos como computador, transmissor de ondas de rádio e até mesmo com um dispositivo de armazenamento externo. Essas são algumas das vantagens que tem motivado o desenvolvimento de instrumentos utilizando os microprocessadores.

1.3. Revisão bibliográfica

Na literatura encontram-se muitos trabalhos científicos em desenvolvimento de instrumentação analítica de alguns grupos de pesquisas que atuam no desenvolvimento de instrumentos automáticos microcontrolados²² de baixo custo com aplicações analíticas como na determinação de ferro (II)¹⁶, proteínas totais, glicose, hemoglobina, albumina, uréia, cálcio, potássio e nitrato^{11, 16, 24-27}. O desenvolvimento de dispositivos eletrônicos como LEDs, diodos lasers, microcontroladores e mostradores digitais favoreceu a construção desses novos instrumentos para análises químicas com menor custo, consumo de energia e, em alguns casos, a portabilidade.

Muitos fluorímetros têm sido desenvolvidos usando LEDs¹³ como fonte de radiação eletromagnética para excitação das espécies fluorescente. Heart e Jiji⁵ desenvolveram um método espectrométrico por excitação e emissão utilizando uma matriz de LEDs em série para excitação das espécies fluorescente, e uma câmera CCD com resolução de 1024 x 256 pixel como dispositivo de detecção. Neste trabalho, foram utilizados 7 LEDs em diferentes comprimentos de onda que se estenderam de 370 a 636 nm. Além destes componentes foram utilizados também lentes, fendas e rede de difração. Usando o instrumento multi-LED aliado ao método quimiométrico de detecção foram estudadas sete espécies fluorescentes: fluoresceína, rodamina B, di-n-fenilantraceno, vermelho do nilo (Nile Red), 10-

bis(feniletinil)antraceno e safranina. Foram alcançados limites de detecção menores que 5 ppb e elevada sensibilidade.

Palma e colaboradores²⁶ desenvolveram um instrumento portátil de baixo custo e simples operação para medir a concentração de oxigênio atmosférico a partir do efeito fosforescente de uma membrana na presença de oxigênio livre na atmosfera. O instrumento foi construído usando um microcontrolador como unidade central de processamento de sinais e controle dos dispositivos. Foram usados no projeto: um LED de alto brilho para excitação da membrana, um fotodiodo, um mostrador digital, um teclado e uma bateria de 9 V para alimentação do sistema. A membrana fotossensível foi posicionada entre o LED e o fotodiodo. O uso destes componentes viabilizou a construção de um instrumento de simples operação, baixo custo, baixo consumo de corrente e viável para aplicação em campo devido à portabilidade e baixo ruído.

Beutler²⁸ e colaboradores desenvolveram um espectrofluorímetro microcontrolado usando um arranjo de 5 LEDs para excitação das espécies com emissão em 450, 525, 570, 590 e 610 nm e um célula fotomultiplicadora. O espectrofluorímetro desenvolvido foi capaz de discriminar os principais grupos de fitoplanctons em águas superficiais com base nas espécies fluorescentes existentes em cada grupo. Foram analisados quatro grupos além da determinação da concentração de clorofila. Com este instrumento foi possível fazer análises da distribuição da concentração dessas espécies em uma profundidade de até 16 m entre outras aplicações²⁹.

Cantrell e Ingle³⁰ desenvolveram um espectrofotômetro portátil microcontrolado para análises em fluxo. Uma célula de fluxo (1,5 mm de caminho óptico) foi construída em acrílico e à célula foram fixados três LEDs (azul, amarelo e vermelho) e, um detector a um ângulo de 180° em relação ao feixe de radiação dos LEDs. Usou-se um detector programável conversor de luz em frequência com amplitude de 5 V. Uma bateria de 9 V foi conectada a um componente de ajuste de potencial para fornecer uma tensão de 5 V para o circuito. Com este espectrofotômetro foram determinadas concentrações de thionina e o limite de detecção obtido foi de $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Veras e colaboradores¹⁶ desenvolveram um espectrofotômetro microcontrolado de baixo custo usando um LED branco como fonte de radiação,

uma mídia de CD (*compact disc*) como rede de difração e um fototransistor. Com este instrumento foram analisados cinco corantes utilizados em alimentos. Obtiveram-se desvios padrão relativo menores que 1% para todas as amostras analisadas. Em todas as aplicações com este instrumento foram obtidos resultados concordantes com instrumentos comerciais.

Um turbidímetro microcontrolado¹⁸ foi desenvolvido para quantificação de sólidos em suspensão em água de rios. O instrumento desenvolvido foi implementado com um sistema automático para monitoramento contínuo e autocalibração. Foram utilizados no desenvolvimento do projeto um microcontrolador PIC, dois LEDs, dois fotodiodos, um conversor AD entre outros dispositivos. O circuito foi alimentado com uma fonte de 5 V. Um algoritmo foi desenvolvido com base em redes neurais para o tratamento dos sinais. Elevada exatidão e ampla faixa linear foram obtidos para as espécies analisadas em uma faixa de 0-1000 unidades nefelométricas de turbidez.

Gaião e colaboradores²⁵, construíram um fotômetro NIR (*Near infrared spectroscopy*) portátil usando um microcontrolador PIC 18F77 como unidade central de comandos e um LED de emissão no infravermelho próximo (1550 nm). O instrumento desenvolvido foi aplicado para análises de gasolina tipo C de postos de combustíveis no Brasil com objetivo de verificar a presença dos principais adulterantes, como solventes e querosene.

Yeh e Tseng²³ construíram um espectrofotômetro de baixo custo usando um detector multicanal e um conjunto de LEDs com emissão em 389, 407, 462, 527, 572, 587 e 620 nm. Usou-se como unidade principal de controle um microcontrolador. Soluções de púrpura de bromocresol e verde de bromocresol em pH variando de 1 a 13, os espectros foram obtidos com o instrumento proposto. Além desse estudo foram analisadas quatro soluções contendo diferentes corantes. O mesmo procedimento foi realizado usando-se um espectrômetro comercial da Ocean Optics USB2000 e os resultados obtido foram concordantes.

Palma e colaboradores²⁷ desenvolveram um fotômetro portátil para determinação de potássio e nitrato. O circuito eletrônico desenvolvido para o instrumento foi implementado para compensar possíveis alterações do sinal devido a mudanças de temperatura. Um programa simples foi desenvolvido e compilado no microcontrolador viabilizando o uso do instrumento para aplicação em campo por

peçoal não treinado. Obteve-se uma faixa linear de trabalho para o nitrato de 2×10^{-6} a 1 mol L^{-1} com $R = 0,9998$, para o potássio foi obtido uma faixa de linear de trabalho de 5×10^{-6} a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com $R = 0,9998$.

Capítulo

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um fluorímetro microcontrolado para a determinação de espécies fluorescentes e análise de clorofila *a* em águas superficiais. Para tanto, procurou-se as seguintes características para o fluorímetro:

- Baixo custo;
- Portabilidade;
- Utilização de LEDs como fonte de excitação;
- Detector multicanal;
- Fácil operação;

Capítulo

3. ESTUDO DOS COMPONENTES E
DESENVOLVIMENTO DO CIRCUITO
ELETRÔNICO

3. ESTUDO DOS COMPONENTES E DESENVOLVIMENTO DO CIRCUITO ELETRÔNICO

3.1. Estudo dos componentes eletrônicos.

Neste item, são descritos os principais componentes eletrônicos utilizados no desenvolvimento do instrumento proposto.

3.1.1. Microcontrolador

O microcontrolador PIC (*Peripheral interface controller*) modelo PIC18F4550^{31,32} foi utilizado como unidade central de processamento e tratamento dos dados. Com este dispositivo todos os dados e comandos podem ser enviados, recebidos ou armazenados. Para tomar decisão de qual procedimento realizar, um programa dedicado deve ser previamente gravado na memória do microcontrolador^{33,34}. Algumas das principais características físicas do microcontrolador PIC 18F4550 são:

- 2 kbytes de memória *RAM*;
- Tamanho da memória: 32 kbytes;
- Memória *EEPROM*: 256 bytes;
- 35 terminais disponíveis para entrada e/ou saída de dados e comandos;
- Interface *USB 2.0* com velocidade de 12 Mbit/s;
- Interface *RS 232*;
- Número de instruções 16.384;
- Conversor analógico digital de 10 bits.

Na Figura 3.1, tem-se o diagrama esquemático dos terminais de saída de um microcontrolador PIC 18F4550 com a distribuição das respectivas portas nos terminais. Uma porta é formada por um conjunto de funções eletrônicas que os terminais do microcontrolador podem exercer. Essas portas podem ser habilitadas para diferentes funções como conversor analógico-digital (*AD*), interface *USB*, entrada ou saída de sinal.

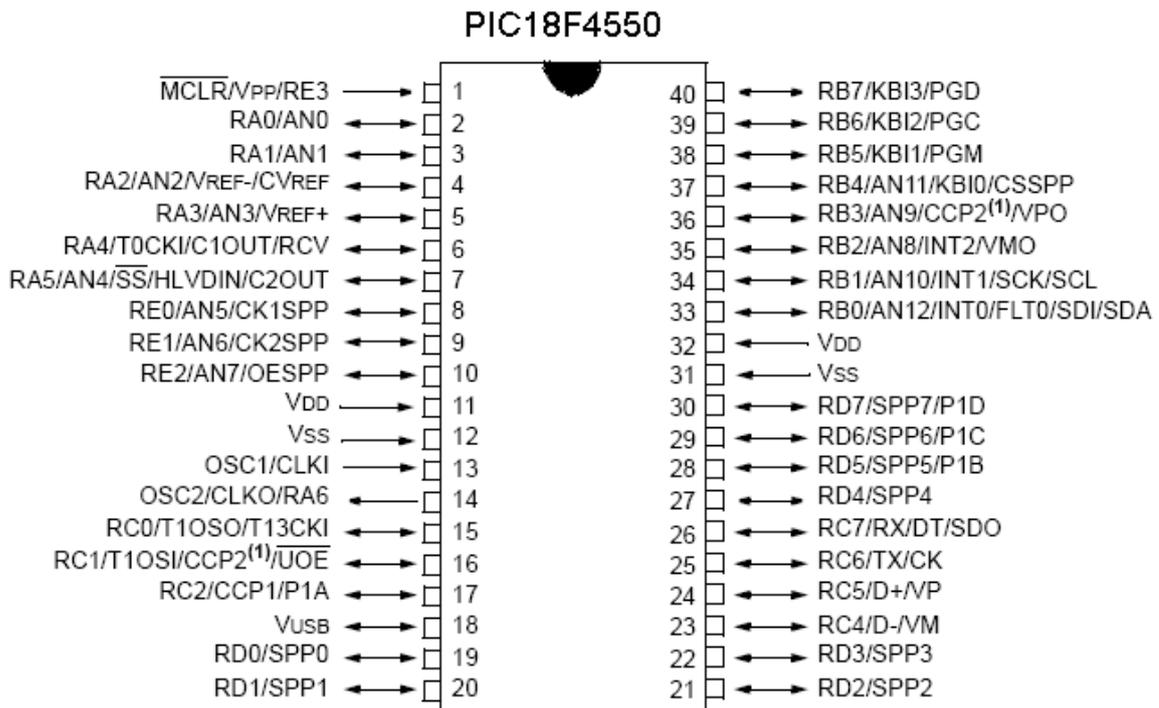


Figura 3.1. Microcontrolador PIC18F4550.

Na Figura 3.1 são descritos os terminais e as suas respectivas portas. Os terminais 2 a 10 são para as portas analógicas ANX, portas B são usadas para entrada e saída de sinal digital correspondendo aos terminais 33-40, a porta C corresponde aos terminais 15 – 17 e 23 – 26, os terminais 19-22 e 27-30 correspondem à porta D, geralmente as portas C e D são configuradas para portas de entrada, saída ou entrada/saída, e em V_{DD} (terminais 11 e 32) o microcontrolador deve ser alimentado com tensão positiva de 5 V e em V_{SS} (terminais 12 e 31) alimentação de 0 V. No terminal 18 (V_{USB}) uma tensão para alimentação da interface USB é disponibilizada. Nos terminais 13 e 14 deve ser conectado o sinal da frequência de clock do PIC.

Um programa gravado no microcontrolador será o guia para as tomadas de decisões a serem executadas. Este programa poder ser escrito em diferentes linguagens como linguagem C, Pascal, Basic e Assembly^{32, 35}, depois de escritos são compilados e, com uso de um circuito gravador e um programa de gravação é inserido na memória do microcontrolador. Com a execução deste procedimento o microcontrolador executará a rotina predeterminada pelo programa.

3.1.2. Detector TCS 230

O detector TCS 230³⁶ da Texas Advanced Optoelectronic Solutions (TAOS) é um conversor de radiação luminosa em um sinal elétrico em frequência. A frequência de saída do detector é proporcional à intensidade de radiação incidente. O dispositivo é formado por um arranjo 8 por 8 fotodiodos divididos em quatro grupos, com 16 fotodiodos em cada grupo. Esses grupos apresentam máximas sensibilidade espectral nos comprimentos de onda 480, 540, 680 e 690 nm conforme estudos realizado por Lamoglia³⁷ (anexo). As faixas fotossensíveis são selecionadas por um sinal em forma de código binário 2^2 . A vantagem do detector multicanal está na possibilidade de usar diferentes regiões do espectro dispensando o uso de filtros ou redes de difração.

A tecnologia utilizada no TCS 230 possibilita uma interface direta com um microcontrolador, pois, o sinal de saída possui amplitude de 5 V, igualmente ao controle para habilitar o sinal de saída, selecionar a faixa espectral de trabalho e a frequência do sinal de resposta. A vantagem de se usar um detector de conexão direta e digital está em eliminar os ruídos que são geralmente amplificados quando se usa um circuito amplificador de sinal. Algumas características relevantes do sistema de detecção em relação ao projeto:

- Tensão de alimentação de 5,0 V;
- Abrange toda região do visível, em 4 regiões distintas;
- Converte a intensidade luminosa em frequência de onda quadrada com amplitude de 5,0 V;
- Controlado por código binário 2^4 ;
- Baixo consumo de corrente;
- Simples configuração;
- Resistente a ruídos eletrostáticos;
- Encapsulamento robusto;
- Pequeno tamanho.

3.1.3. Fonte de radiação

Como fonte de radiação^{23,38,39}, foi proposto o uso de LED, devido as seguintes características:

- Baixo consumo de corrente elétrica;
- Intensidade luminosa de até 12000 mcd;
- Tempo de vida elevado, em média 10 anos;
- Baixo custo;
- Pequeno tamanho;
- Baixa corrente de residual;
- Consumo de corrente em torno de 25 mA;
- Encapsulamento robusto;
- Emissão em toda região do visível.

São encontrados LEDs com estreita bandas de emissão na região do visível que possibilitam o desenvolvimento de novos instrumentos, dispensando o uso de lentes, filtros de radiação e rede de difração.

Os LEDs usados no projeto possuem como característica alta luminosidade, os mesmos foram comprados no comércio local. Na Figura 3.2, estão os espectros de emissão dos LEDs usados no instrumento. Os espectros de emissão foram obtidos usando-se um espectrofotômetro USB 2000 da Ocean Optics com o auxílio de uma fibra óptica. Os comprimentos de onda de maior intensidade dos LEDs e a largura de banda efetiva obtidas em **A)** 405 ± 10 nm e em **B)** 476 ± 11 nm.

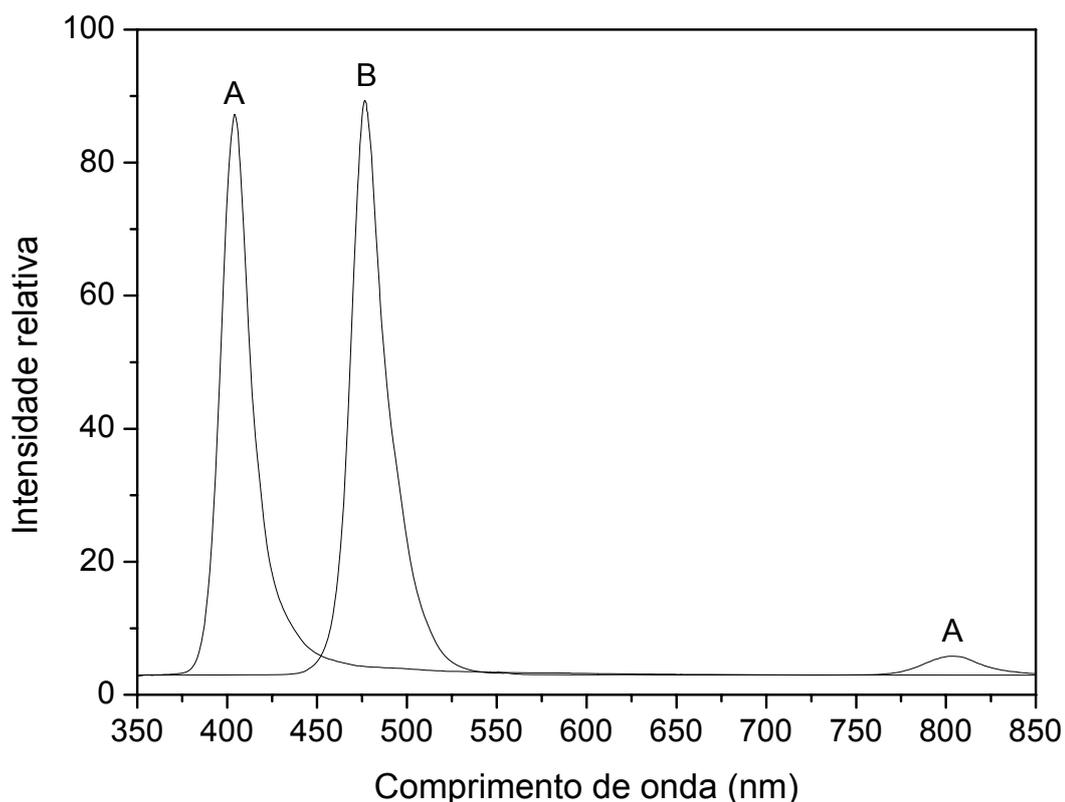


Figura 3.2. Espectro de emissão de LEDs. Comprimentos de ondas de maior intensidade dos LEDs e a largura de banda efetiva, respectivamente. **A)** 405 ± 10 nm e **B)** 476 ± 11 nm.

3.1.4. Fonte da alimentação

A fonte de alimentação é um dispositivo eletrônico formado por componentes eletrônicos configurados para fornecer o valor de tensão adequado para um equipamento elétrico ou eletrônico a partir de uma fonte de sinal diferente. Os componentes eletrônicos selecionados para o desenvolvimento do circuito do projeto foram alimentados com tensão de 5 V de corrente contínua.

3.1.5. Sensor de temperatura LM35

O LM35 é um sensor de temperatura produzido pela National Semiconductor. Este sensor apresenta um sinal elétrico linear para variação de temperatura ($0,01$ V/°C, para uma faixa de -55 a $+150$ °C. Algumas características como baixo custo, ampla faixa de trabalho, baixo consumo de corrente, elevada

exatidão, faixa de alimentação flexível, a tensão entre 4 a 30 V e circuito simples foram fatores importantes na escolha deste sensor.

3.1.6. Interface USB 2.0

A interface USB está atualmente entre as principais formas de comunicação entre dois dispositivos. Para transmissão de dados, o protocolo USB deve ser estabelecido previamente entre os dois equipamentos³¹ e uma conexão via cabo. Uma das vantagens desse tipo de interface está na quantidade de informação que pode ser enviada e recebida, de até 12 Mbit/s.

O microcontrolador PIC18F4550 possui hardware que suporta o protocolo USB para interface com outros instrumentos como computador e *Pen-drive* com envio e/ou recepção de dados e/ou comandos.

3.1.7. Interface RS232

A interface RS232 usa um protocolo de comunicação USART (Universal Synchronous Asynchronous Receiver Transmitter) simples para envio e recepção de dados com sinal digital binário. Esse tipo de interface ainda é usado em muitos equipamentos como principal forma de comunicação. Com um circuito eletrônico simples ela pode ser usada no microcontrolador PIC 18F4550.

3.1.8. LCD

Os mostradores digitais(LCD do inglês, *liquid crystal display*) são dispositivos eletrônicos que usam linguagem simples de comunicação. Além disso, possuem baixo consumo de corrente, elevada resistência mecânica e baixa tensão de alimentação. Atualmente no mercado podem ser encontrados LCD's gráficos e coloridos com tela sensível ao toque (*touch screen*). Este dispositivos geralmente usam comunicação paralela.

3.1.9. Placa de estudos

A placa de estudos⁴⁰ é uma importante ferramenta para desenvolvimento de circuitos microcontrolados. Com esta placa é possível testar alguns dispositivos eletrônicos a serem utilizados no projeto como os LEDs, os detectores e o PIC, bem como o programa desenvolvido. Na Figura 3.3 tem-se uma fotografia da placa de estudos PICgenios da Microgenios[®].



Figura 3.3. Fotografia da placa de estudos PICGenios da Microgenios[®].

Esta placa de estudos possui todas as possíveis simulações para os microcontroladores PIC de diferentes series 16FXXX e 18FXXXX. Na placa estão: um microcontrolador como unidade central de processamento e dispositivos periféricos como: LEDs, botões, mostrador digital LCD, sensor de temperatura, banco de LEDs BCD, chaves de controle, regulador de tensão, interface de comunicação USB, interface de comunicação RS232, interface de comunicação IC, fonte de alimentação 5 V e dispositivo sonoro. Além das funções anteriormente descritas, a gravação do programa estruturado em linguagem de programação C no microcontrolador é feita por um circuito gravador na placa.

ponte retificadora de diodos (PRT) converte o sinal de corrente alternada do TR1 de 10V para corrente contínua. O sinal de corrente contínua passa pela entrada Vo do regulador TIP7805, liberando uma tensão de 5 V em VI. Os capacitores C1 e C2 minimizam os ruídos na fonte de alimentação. O LED3 está ligado em série com R1 para indicar quando a fonte esta ligada ou desligada.

3.2.2. Microcontrolador

O microcontrolador PIC18F4550³² foi utilizado com unidade de processamento e aquisição dos dados para atuar no gerenciamento de todos os periféricos do instrumento tais como: detector, botões, *LED*, *LCD*, MAX232 (comunicação RS232), *USB*, LM35 (sensor de temperatura). O microcontrolador PIC 18F4550 foi alimentado pela fonte de alimentação descrita no tópico 3.2.1. Na Figura 3.5 tem-se o esquema do circuito eletrônico com os componentes básicos para funcionamento do microcontrolador PIC 18F4550. Os componentes C3, C4 e XT-4,00 MHz fazem parte do circuito oscilador, este circuito é imprescindível para o funcionamento do microcontrolador pois os sinais são processados com base na frequência.

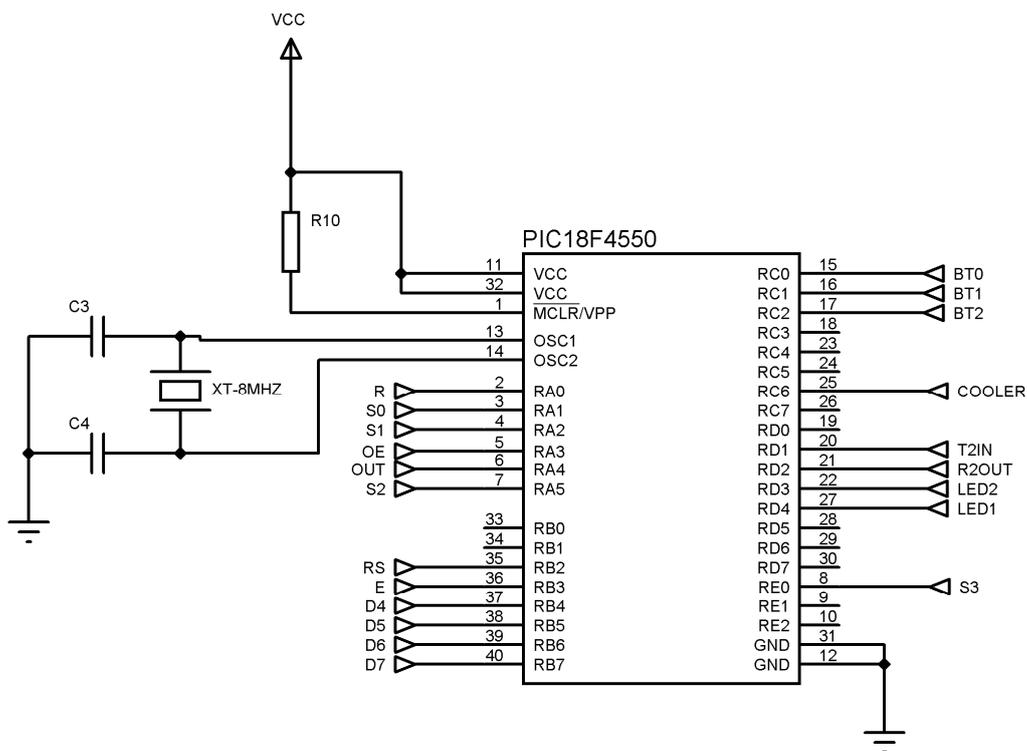


Figura 3.5. Esquema do circuito eletrônico para funcionamento do microcontrolador PIC 18F4550. $C3 = C4 = 21 \times 10^{-9} \text{ F}$; $R10 = 10 \times 10^3 \text{ } \Omega$; $XT\text{-}4\text{MHZ} = 4 \times 10^6 \text{ Hz}$.

3.2.3. LCD

O LCD foi alimentado com 5 V no terminal VDD e 0 V em VSS, conforme Figura 3.6. O PTO(potenciômetro) de $5 \times 10^3 \Omega$ permite o ajuste da intensidade do mostrador digital, LCD. Usou-se uma conexão simplificada entre os terminais do LCD e o microcontrolador PIC 18F4550. Os terminais 4 e 6 são para controle do LCD e foram conectados às portas R2 e RB3 do microcontrolador. Os terminais D7 a D4 são terminais de dados que foram conectados às portas RB7 a RB4 do microcontrolador. Os demais terminais não utilizados foram ligados a 0 V da fonte.

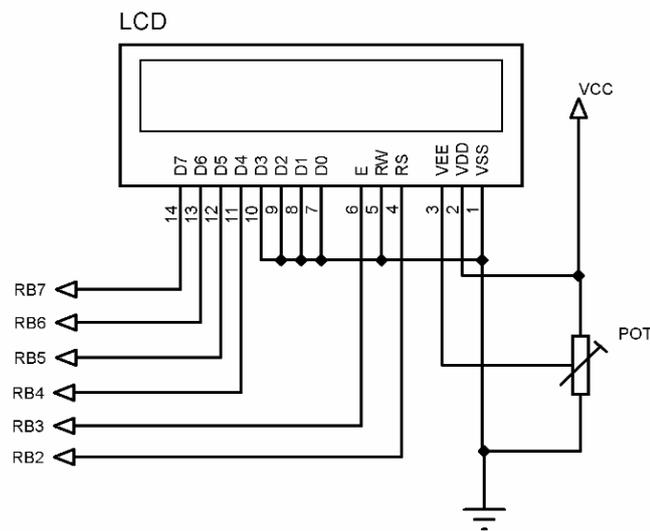


Figura 3.6. Esquema do circuito eletrônico do fluorímetro. POT = Potenciômetro de $5 \times 10^3 \Omega$.

3.2.4. Sistema de detecção TCS 230

O TCS 230 possui 4 regiões fotossensíveis em diferentes regiões do espectro-eletromagnético da radiação visível, com comprimentos de onda de resposta máxima em 480, 540, 680 e 690 nm³⁷, esta última é sensível a todo o espectro do visível. A seleção é feita aplicando-se um sinal binário nos terminais S2 e S3, esses terminais foram conectados ao PIC18F4550 nas portas RA5 e RE0. O sinal de resposta do TCS 230 é enviado para a porta RA4 do PIC18F4550. S0 e S1 são portas de controle do sinal de frequência, com elas seleciona-se a magnitude do sinal de frequência que pode ser em Hz, 10^3 Hz e 10^6 Hz. O terminal OE tem a

função de habilitar ou desabilitar o envio do sinal de resposta para o microcontrolador, este terminal foi conectado à porta RA3 do microcontrolador. O detector TCS 230 foi alimentado com 5 V no terminal 5 (VCC) e 0 V (GND) no terminal 4. Por meio de um programa previamente gravado na memória do microcontrolador PIC 18F4550 o envio e recepção de dados ou comando foram realizados, conforme tópico 3.3.1.

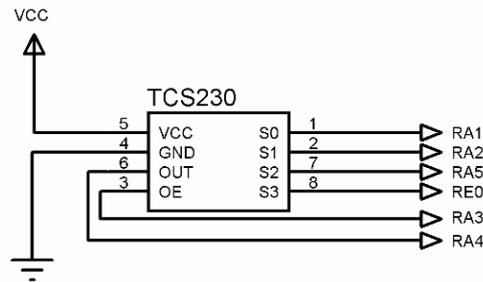


Figura 3.7. Esquema do circuito eletrônico desenvolvido para conexão do detector TCS 230 as portas dos microcontrolador PIC 18F4550.

3.2.5. Teclado de controle

Um teclado para acesso dos comandos do programa gravado no microcontrolador foi desenvolvido. No projeto, o teclado consta de apenas três botões. Na Figura 3.8, tem-se a configuração do circuito eletrônico desenvolvido para conexão das teclas.

O funcionamento das três teclas é similar. Os sinais das teclas são enviados para o microcontrolador nas portas RC0, RC1 e RC2 referentes aos botões BT0, BT1 e BT2, respectivamente. Essas portas são conectadas em série com um resistor de $1 \times 10^4 \Omega$ ligado a tensão de 0 V da fonte. Por outro lado, a essas portas está conectado um resistor de $1 \times 10^3 \Omega$ ligado em série com as teclas conectadas a 5 V. Quando a tecla é pressionada um sinal de 5 V é enviado à porta do microcontrolador e ao ser liberada, o sinal de tensão retorna a 0V.

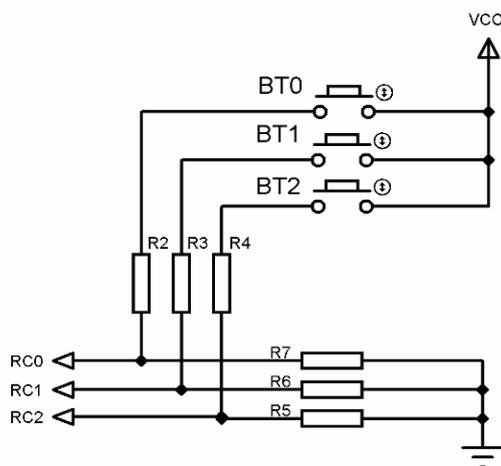


Figura 3.8. Esquema do circuito eletrônico do teclado de acesso as funções. BT0 = BT1 = BT2 = Teclas de acesso; $R2 = R3 = R4 = 1 \times 10^3 \Omega$; $R5 = R6 = R7 = 1 \times 10^4 \Omega$.

3.2.6. LED

Os LEDs usados no instrumento como fonte de radiação para excitações das espécies fluorescentes foram conectados em série com um resistor de 330Ω conectada a 0 V , sendo os outros terminais livres dos LEDs conectados às portas RD4 e RD3 do microcontrolador PIC 18F4550.

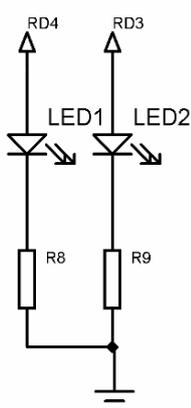


Figura 3.9. Esquema do circuito eletrônico das fontes de excitação do fluorímetro. LED1 = 405 nm , LED2 = 476 nm ; $R8 = R9 = 330 \Omega$. RD4 e RD3 portas de saídas digitais do PIC 18 F4550.

Os LEDs utilizados no projeto apresentam emissão máxima em 405 e 476 nm, como pode ser visto na Figura 3.2. Este espectro foi obtido utilizando-se um espectrofotômetro USB-2000 com fibra óptica modelo Ps-50.

3.2.7. Interface

O microcontrolador utilizado possibilita o uso das interfaces USB e RS 232. O circuito para interface USB não será descrito neste trabalho pois, apesar de desenvolvido, não foi implementado no projeto. O esquema do circuito desenvolvido para interface RS 232 pode ser visto na Figura 3.10. Como mostrado no esquema abaixo, duas portas do microcontrolador PIC 18F4550 foram usadas, RD1 e RD2. Em RD1 os sinais de dados são enviados do microcontrolador para o dispositivo externo conectado ao DB09 e em RD2 ocorre o processo inverso de comunicação. Para se estabelecer esse tipo de comunicação, as portas do microcontrolador devem ser configuradas com os mesmos parâmetros do dispositivo a ser conectado.

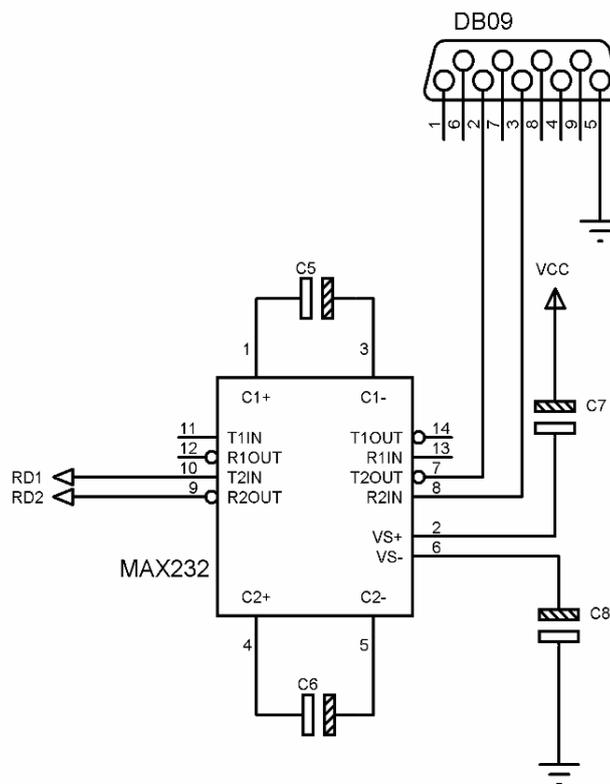


Figura 3.10. Esquema do circuito eletrônico para interface usando comunicação serial RS 232. $C5 = C6 = C7 = C8 = 0,1 \times 10^{-6} \text{ F}$; DB09 – Conector.

3.2.8. Sistema de controle de temperatura

O sistema de controle de temperatura desenvolvido contou com um sensor de temperatura e um *cooler* de baixa potência. Na Figura 3.11, tem-se o esquema de conexão utilizado para o sensor de temperatura LM35. O sinal de variação de temperatura do sensor, emitido através do terminal 1 (R) foi ligado à porta analógica do microcontrolador RA0.

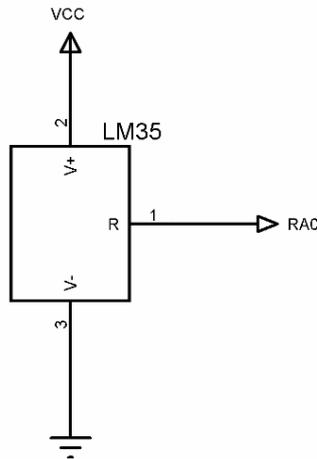


Figura 3.11. Circuito eletrônico do sensor de temperatura LM35 com saída de sinal no terminal R (1) conectado à entrada analógica RA0 do microcontrolador.

Ligou-se o *cooler* ao emissor de um transistor BC548. O terminal do coletor do transistor foi conectado ao VCC da fonte e a base no RC6 do microcontrolador. No programa desenvolvido quando a temperatura é superior à temperatura de trabalho selecionada, o microcontrolador envia um sinal na porta RC6, e liga-se o *cooler*. Ao atingir a temperatura selecionada o *cooler* é desligado.

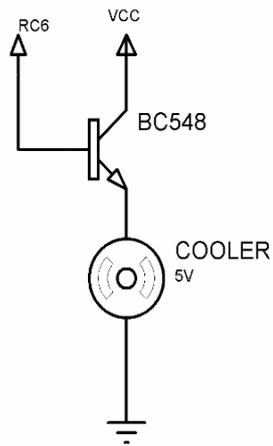


Figura 3.12. Circuito eletrônico do sistema de refrigeração.

3.3. Montagem do protótipo

Na Figura 3.13, tem-se esquematicamente a comunicação existente entre os principais componentes do protótipo desenvolvido, onde o microcontrolador PIC 18F4550 foi a unidade central de controle. No compartimento óptico de acrílico foram fixados o TCS 230 e os LEDs, posicionados a 90 ° em relação ao TCS 230.

Na Figura 3.14, tem-se um desenho do protótipo acomodado em uma caixa de plástico preto, nas dimensões de 100 x 150 x 200 mm. Na face superior do fluorímetro proposto foi colocado um suporte para cobrir a entrada da cubeta, a fim de evitar interferência de radiação externa. Próximo ao centro tem-se o LCD e na parte inferior o teclado de controle com as teclas B0, B1 e B2. Próximo à extremidade esquerda inferior do protótipo, a chave Ligar/Desliga.

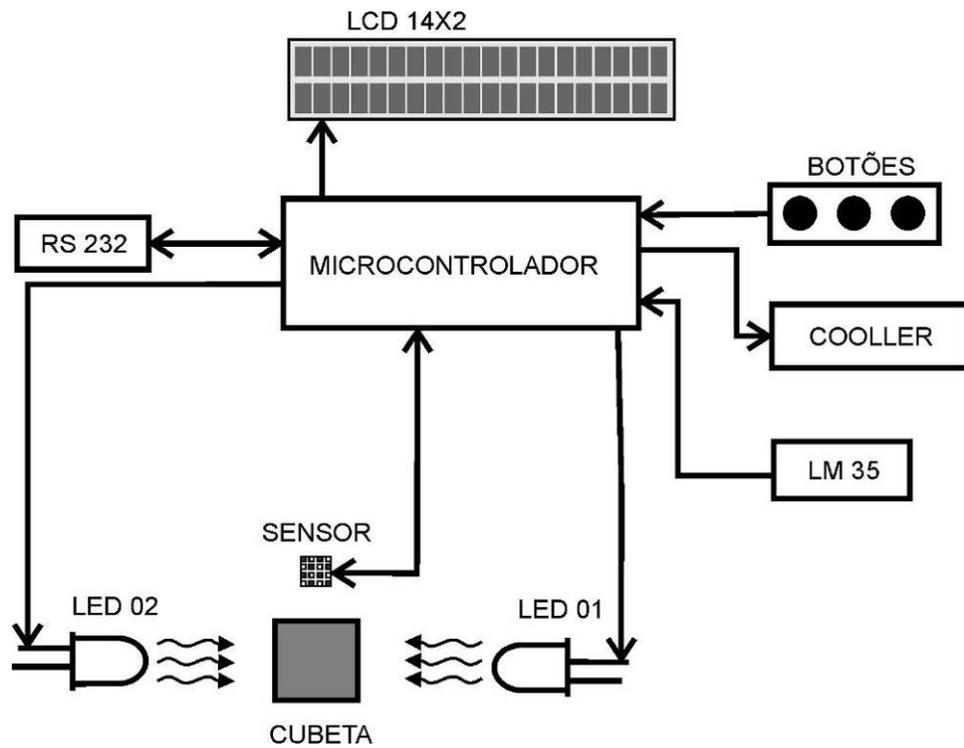


Figura 3.13. Figura esquemática do fluorímetro proposto com os principais componentes conectados a um microcontrolador PIC 18F4550.

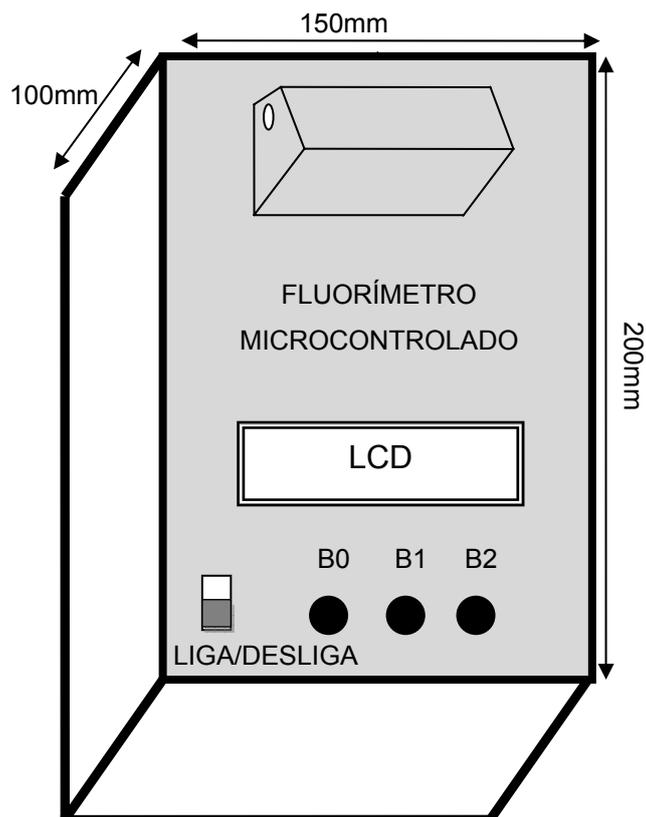


Figura 3.14. Protótipo do fluorímetro proposto com distribuição dos componentes eletrônicos de interface e uma tampa protetora de luminosidade para o compartimento óptico.

3.3.1. Programa desenvolvido em linguagem C

Foi desenvolvido um programa em linguagem C com auxílio do programa MikcroC 7.003 da Mikroelektronika[®]. O MicroC é um programa dedicado para o desenvolvimento de programa em linguagem C para microcontroladores. Na Figura 3.15 tem-se o fluxograma das funções implementadas no programa desenvolvido. Esse programa foi gravado na memória do microcontrolador PIC 18F4550 para o controle dos dispositivos, aquisição e tratamento dos dados.

O programa gravado na memória do microcontrolador realiza as seguintes funções: Envio de dados para o LCD, liga e desliga os LEDs e controla a temperatura de trabalho. Conforme o fluxograma, ao ligar o instrumento, o programa vai para o algoritmo SELECIONAR/OPÇÃO. Nesse algoritmo uma entre as 4 opções (opção = X) podem ser selecionadas através dos botões B0 (X+1) ou B2 (X-1) e confirma-se a opção selecionada com o botão B1, quatro opções podem ser selecionadas:

1. DARK: Desliga os LEDs e exibe a leitura do detector TCS 230 no LCD;
2. LED 01: Liga apenas LED 01 e exibe a leitura do detector TCS 230 no LCD;
3. LED 02: Liga apenas LED 02 e exibe a leitura do detector TCS 230 no LCD;
4. AJUSTE/TEMPERATURA: Seleciona a temperatura de trabalho usando-se as teclas B0 e B2.

Todas essas funções após serem selecionadas são executadas e ao término realizam-na outra vez, porém, se o botão B1 for pressionado, o programa retorna para a posição SELECIONAR/OPÇÃO.

O código fonte do programa desenvolvido em linguagem C encontra-se no apêndice. Este código foi compilado no software MikroC.

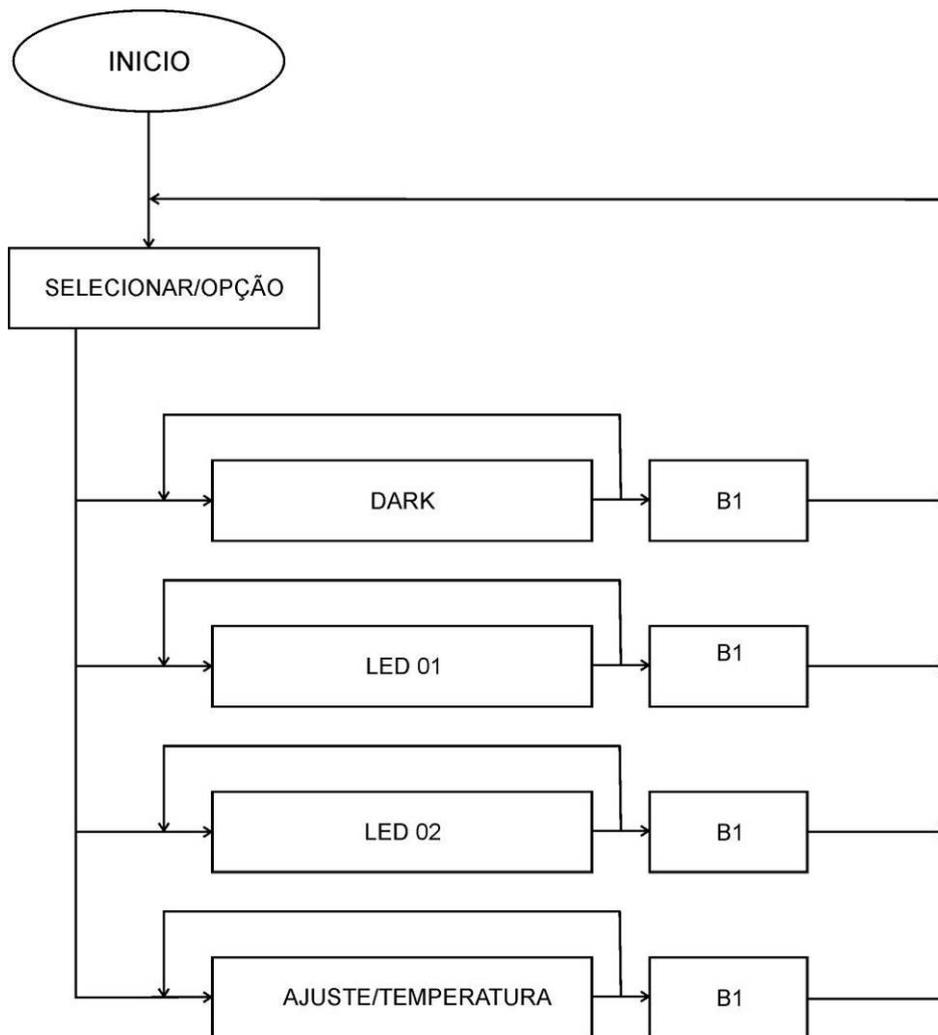


Figura 3.15. Fluxograma do programa gravado no PIC18F4550 para controle e aquisição de dados.

Capítulo

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para calibração do instrumento proposto foram usadas soluções de fluoresceína (FL) e rodamina 6G⁴¹ (R6G). Esses corantes são indicados para estudos fluorescentes, por apresentarem alto rendimento quântico fluorescente e considerável fotoestabilidade.

A fluoresceína quando excitada em 480 nm apresenta máxima intensidade de emissão em 515 nm⁴²⁻⁴⁴. Essa máxima intensidade de emissão varia com a mudança de pH, deslocando o comprimento onda de máxima absorção desta espécie. Com o aumento da acidez do meio, a absorção é deslocada para comprimentos de ondas menores. A rodamina 6G^{41,45} possui uma elevada resistência à fotodegradação e a máxima absorção ocorre em 520 nm, com pico de emissão em 560 nm. Para os estudos, soluções estoque desses corantes foram preparadas em meio ácido.

4.1. Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução estoque de HCl (Merck) $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ usando-se água destilada e purificada por um sistema milli-q.

A partir da solução estoque de fluoresceína $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas por diluição em HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ soluções contendo entre $1,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de fluoresceína.

Uma solução estoque de rodamina 6G (Sigma-Aldrich) em concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, foi preparada utilizando uma solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na dissolução. Soluções de trabalho de rodamina 6G em concentrações entre $1,0 \times 10^{-7}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas por diluições usando-se uma solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.2. Materiais e instrumentos

O desempenho do fluorímetro desenvolvido foi comparado ao de um Fluorímetro Hitachi modelo F-2500. Para tal procedimento, nos ensaios analíticos foram selecionados quatro comprimentos de onda do espectro de fluorescência (480, 540, 680 e 690 nm) com excitação das espécies em 405 e 476 nm. Os seguintes parâmetros foram utilizados no fluorímetro F-2500 para obtenção do sinal: resolução de 2,5 nm e célula fotomultiplicadora (400V).

Para medidas de absorvância de fluoresceína e rodamina 6G usou-se um espectrômetro da Ocean Optics, modelo USB-2000, com fibra óptica de 50 μm , conectado a um computador.

Para obtenção da fluorescência relativa das espécies usou-se cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico com todas as faces polidas.

Para obtenção do espectro de absorção foram utilizadas cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico com apenas duas faces polida.

4.3. Calibração

A calibração é um conjunto de parâmetros que avalia sob condições específicas o desempenho de um instrumento ou método. O processo de calibração é indispensável a qualquer instrumento para assegurar a confiabilidade dos dados frente a um conjunto de exigências^{46,47}. Os principais parâmetros exigidos no processo de calibração do instrumento são descritos a seguir^{48,49}.

4.3.1. Estabilidade da fonte luminosa de radiação

Medidas da estabilidade da fonte luminosa foram realizadas registrando-se o sinal do instrumento com o LED 02 ligado e monitorando o valor obtido em 680 nm. Monitorou-se este sinal por um período de três horas e vinte minutos, com intervalo de cinco minutos para medição na primeira hora e com intervalos de vinte minutos para o tempo restante. O procedimento descrito acima foi realizado apenas com o LED 02.

4.3.2. Estudo da influência da temperatura no fluorímetro proposto

A influência da temperatura na resposta do fluorímetro proposto foi avaliada registrando-se o sinal de fluorescência de fluoresceína apresentado no mostrador digital com excitação em 476 nm, e emissão em 540. A partir desses dados construiu-se um gráfico da intensidade fluorescência em função da temperatura. Para esse estudo, soluções de fluoresceína foram preparadas nas seguintes concentrações 0,5; 20,0; 50,0 e 80,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ diluídas a partir da solução estoque com uma solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. A faixa de temperatura estudada variou entre 17 e 33 °C. Nesse estudo apenas o instrumento foi submetido a variação de temperatura.

4.3.3. Razão sinal/ruído

O ruído é definido como as rápidas flutuações do sinal que ocorrem em pequeno espaço de tempo na presença ou ausência do analito. A influência do ruído no sinal é dado pela razão sinal/ruído (S/R). Neste caso S/R é definida como a razão entre o valor médio do sinal de saída e o seu desvio padrão, e pode ser tomado como o desvio padrão do branco.

4.3.4. Calibração univariada

Para obtenção das figuras de mérito⁵⁰⁻⁵² como parte dos parâmetros necessários que descrevem o desempenho de um instrumento. As figuras de mérito foram obtidas realizando-se os procedimentos analíticos em um fluorímetro comercial e no fluorímetro desenvolvido^{51,52}. Abaixo são descritas as figuras de mérito estudadas.

4.3.4.1. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade de um método fornecer um resultado diretamente proporcional à concentração de uma espécie. No procedimento adotado para o teste de linearidade utilizou-se soluções de fluoresceína e rodamina 6G em uma faixa de concentração entre 0,1 e 100,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. A partir do sinal de resposta de fluorescência relativa foram construídos gráficos para seleção de faixas dinâmicas que mais se aproximassem da

linearidade. A relação entre o sinal de resposta e a concentração em uma faixa linear pode ser expressa pela equação matemática da reta, conhecida como curva analítica. A curva analítica é descrita pela equação matemática, $y = bx + a$. Onde, b é o coeficiente de inclinação da curva analítica, a o ponto de interseção, x a concentração e y o sinal de resposta.

4.3.4.2. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que produz um sinal com certo nível de confiança estatística. Para este parâmetro, assumiu-se o LD como sendo a razão de 3 vezes o desvio padrão da medição do branco pela sensibilidade. Calculou-se o LD a partir da Equação 4.1.

$$LD = \frac{3s}{M} \quad (4.1)$$

onde: **s** - desvio-padrão do branco, dez replicatas;
M - sensibilidade.

4.3.4.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração em que uma espécie pode ser determinada com nível de incerteza aceitável. Assumiu-se o LQ como sendo a razão de 10 vezes o desvio padrão da medição do branco pela inclinação da curva analítica. Calculou-se a partir da Equação 4.2.

$$LD = \frac{10s}{M} \quad (4.2)$$

onde: **s** - desvio padrão do branco, dez replicatas;
M - sensibilidade.

4.3.4.4. Sensibilidade

A sensibilidade é descrita como a capacidade de um método discriminar pequenas variações de concentração do analito. A sensibilidade corresponde ao coeficiente angular da curva analítica. A sensibilidade analítica é a

razão entre a inclinação da curva analítica e o desvio padrão do sinal analítico em uma dada concentração do analito. Calculou-se a partir da Equação 4.3.

$$M = \frac{B}{s} \quad (4.3)$$

Onde: **M** - a sensibilidade.

B - o coeficiente de inclinação.

s - o desvio padrão do sinal analítico.

4.3.4.5. Precisão

A precisão reflete a reprodutibilidade de um procedimento analítico com grau de proximidade do sinal de resposta da amostra nas mesmas condições. A precisão também pode ser adotada com o desvio padrão da análise de uma espécie nas mesmas condições.

4.3.4.6. Análise de variância

A análise de variância é usada para avaliar a qualidade do ajuste do modelo desenvolvido. Na Tabela 4.1, tem-se as equações utilizadas para os cálculos de variância do método, usando-se o método dos mínimos quadrados. Os resultados da análise de variância foram obtidos utilizando-se da opção Regressão da ferramenta Análise de Dados do programa Microsoft Excel. Com esta ferramenta obteve-se o coeficiente de correlação (R), o desvio padrão da regressão, o coeficiente angular da curva analítica e o valor de F com 95% de confiança^{51, 53}. O uso do teste F indica se o modelo da curva analítica está bem ajustado, quando o F calculado apresentar um valor dez vezes ao valor de F tabelado. O F calculado é a razão entre a média quadrática do modelo pela média quadrática residual.

Tabela 4.1. Equações para análise de variância pelo MMQ.

Fonte	Soma Quadrática	Nº GL	Média quadrática
Modelo	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R / (p - 1)$
Residual	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r / (n - p)$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

SQ_R – Soma quadrática do modelo; SQ_r – Soma quadrática residual; SQ_T – Soma quadrática total; MQ_R – Média quadrática do modelo; MQ_r – Média quadrática residual; **Nº GL** – Número de graus de liberdade; n_i – número de repetições no nível i ; m – número de níveis distintos da variável x ; n – número total de observações; p – número de parâmetros do modelo.

4.5. Estratégia de validação

Para validação das figuras de mérito da calibração foi utilizado o fluorímetro proposto e um comercial. Foram adotados os seguintes passos para determinação das figuras de mérito.

- a) Medida dos sinais do branco;
- b) Medida dos sinais das soluções padrão;
- c) Cálculo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados;
- d) Análise estatística dos dados;
- e) Construção do gráfico da curva analítica pelo método dos mínimos quadrados;
- f) Estimativa da sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação.

4.6. Determinação de clorofila *a*

Sabe-se que os microorganismos vivos produtores primários⁶¹ como as algas, fitoplâncton e cianobactérias estão presentes em águas superficiais^{28,62-64}. Estes microorganismos são potenciais agentes produtores de substâncias tóxicas (*hepatoxi* e *neutroxic*)⁶⁵ prejudiciais aos peixes, animais e ao homem. A quantidade desses microorganismos está diretamente relacionada com a concentração de clorofila *a*. Para tanto, um dos indicadores de qualidade de águas superficiais toma como base a concentração desta espécie^{31,66, 67}.

O procedimento realizado para determinação de clorofila *a* consome mais de doze horas⁶⁸⁻⁷⁰. Com objetivo de tornar esse procedimento mais rápido, novos métodos para determinação de clorofila *a* diretamente em lagos²⁸, rios e mares^{69, 71-73} aplicando a técnica fluorimétrica vem sendo desenvolvidos. Outra espécie geralmente determinada em paralelo são os feopigmentos, produtos de degradação natural de clorofila *a*. O objetivo desse estudo foi aplicar o fluorímetro desenvolvido na determinação de clorofila *a* e feopigmentos^{74, 75}.

4.6.1. Material e equipamentos

Foram usados um compressor/aspirador Fanem modelo Dia-Pump Cal, um espectrofotômetro Micronal modelo B-380, uma centrífuga Quimis modelo Q-222T, um suporte GF/F com capacidade de 1 L, filtros de fibra de vidro GF de 47 mm e uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm.

4.6.2. Reagentes, soluções e amostras

Uma solução estoque de etanol 90 % (v/v) foi preparada diluindo-se $5,0 \times 10^{-2}$ L de etanol anidro em $4,5 \times 10^{-1}$ L de água obtida de um sistema MilliQ de purificação.

Uma solução estoque padrão de clorofila *a* (Sigma-Aldrich) 400×10^{-6} g L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se uma amostra padrão de $5,0 \times 10^{-1}$ g em $1,0 \times 10^{-3}$ L de etanol 90 % (v/v). Soluções para construção da curva de calibração foram preparadas por diluições apropriadas da solução estoque de clorofila *a* em etanol 90 % (v/v)^{65, 75}.

4.6.3. Procedimento analítico

4.6.3.1. Método de referência

Coletou-se amostras de 0,5 L de água da barragem da UFSCar e de uma cultura de alga (*Selenastrum capricornutum*, cultivadas no laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar) em frascos plásticos opacos. Estas amostras foram transportadas em uma caixa térmica com gelo até o laboratório. A de filtração foi realizada em local com baixa luminosidade. Utilizou-se uma bomba de vácuo ajustada para 500 mmHg e filtros de 47 mm, sendo os procedimentos realizados em triplicata. Posteriormente, os filtros foram retirados com o auxílio de uma pinça de ponta chata e armazenados em frascos plásticos opacos.

No procedimento de extração, foram gotejadas cinco gotas de etanol 90% a temperatura ambiente, seguido de $3,0 \times 10^{-3}$ L de etanol 90 % (v/v) com temperatura entre 80 e 90 °C. Realizou-se a maceração das amostras e transferiu-se os macerados para tubos plásticos completando-se o volume com etanol 90 % (v/v) para $10,0 \times 10^{-3}$ L. Os extratos foram armazenados sob refrigeração a 4 °C por doze horas. Após este período foram centrifugados por quinze minutos a 700 g. O sobrenadante foi retirado para análise.

Para determinação de clorofila *a*, realizou-se a leitura de absorção do sobrenadante em 665 e 750 nm. As amostras foram acidificadas com uma gota de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e repetiu-se o procedimento de leitura. Com a acidificação da amostra, moléculas de clorofila *a* são degradadas e somadas aos feopigmentos. A concentração de clorofila *a*⁶⁸ e feopigmentos foi obtida usando-se as Equações 4.4 e 4.5, respectivamente.

$$C_{\text{Chl } a} = \frac{27,91 (E_b - E_a) \cdot v}{V \cdot 1} \quad (4.4)$$

$$C_{\text{Feo}} = \frac{27,91 [(1,7 \times E_a) - E_b] \cdot v}{V \cdot 1} \quad (4.5)$$

Onde:

- C_{Chl a}** - concentração de clorofila *a* em $\times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$;
C_{Feo} - concentração de feopigmentos em $\times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$;
E_b - absorvância do extrato em 665 nm antes da acidificação menos a absorvância em 750 nm;
E_a - absorvância do extrato em 665 nm depois da acidificação menos a absorvância em 750 nm;
v - volume do solvente usado no extrato em mL;
V - volume da amostra filtrada em Litro;
l - percurso óptico da cubeta (cm);
27,91 - constante utilizada para etanol 90%(v/v).

4.6.3.2. Método comparativo

Na determinação de clorofila *a* com o método fluorimétrico⁷⁵, realizou-se leituras de fluorescência relativa desta espécie com excitação em 405 nm, leitura de emissão em 690 nm em concentrações de 0,2, 2,0, 5,0, 20,0 100,0 e 200,0 $\times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ para a obtenção da constante, *K*, conforme Equação 4.6. A partir do valor de *K*, para cada concentração calculou-se a média para a constante *K*.

$$K = \frac{C_a}{R_s} \quad (4.6)$$

Onde:

- K** - Fator de sensibilidade de resposta;
R_s - Fluorescência relativa dos padrões clorofila *a*;
C_a - concentrações de padrões de clorofila *a*.

O fator de correção *r*, foi obtido calculando-se a razão de fluorescência relativa da concentração de clorofila *a* padrão de concentração $20,0 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$. Foi realizada a leitura de fluorescência relativa antes e após a acidificação com HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, conforme a Equação 4.7.

$$r = \frac{F_a}{F_b} \quad (4.7)$$

Onde:

r - fator de correção;

F_a - fluorescência relativa do padrão antes da acidificação;

F_b - fluorescência relativa do padrão após acidificação.

Calculou-se a concentração de clorofila *a* no extrato, realizando-se a leitura da fluorescência relativa do mesmo antes da acidificação com HCl 1,0 mol L⁻¹ com intervalo de 5 minutos. Foram usadas as Equações 4.8 e 4.9 para determinação da concentração de clorofila *a* e de feopigmentos, respectivamente.

$$C_{Chl a} = \frac{K \frac{r}{r-1} (R_a - R_b r) v}{V} \quad (4.8)$$

$$C_{Feo} = \frac{K \frac{r}{r-1} (R_a - R_b r) v}{V} \quad (4.9)$$

Onde:

$C_{Chl a}$ - concentração de *clorofila a* em 10⁻⁶ g L⁻¹;

C_{Feo} - concentração de feopigmentos em 10⁻⁶ g L⁻¹;

K - fator de sensibilidade de resposta;

r - fator de correção;

R_a - fluorescência relativa do extrato;

R_b - fluorescência relativa do extrato após acidificação;

v - volume do extrato em L;

V - volume da amostra em L.

Capitulo

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Estabilidade da fonte de radiação

Para o estudo do tempo de estabilidade do instrumento desenvolvido, inicialmente ligou-se o instrumento e selecionou-se a opção LED 02 e o sinal no comprimento de onda em 680 nm foi tomado com referência para este estudo. Na Figura 5.1 tem-se um gráfico do sinal registrado em função do tempo em minutos. Verifica-se que a partir de 20 min o sinal permanece praticamente constante até os 200 min. Um período maior de tempo não foi registrado por não haver mudanças consideráveis no sinal. Para todos os estudos posteriores, o instrumento foi utilizado após passar 30 min ligado.

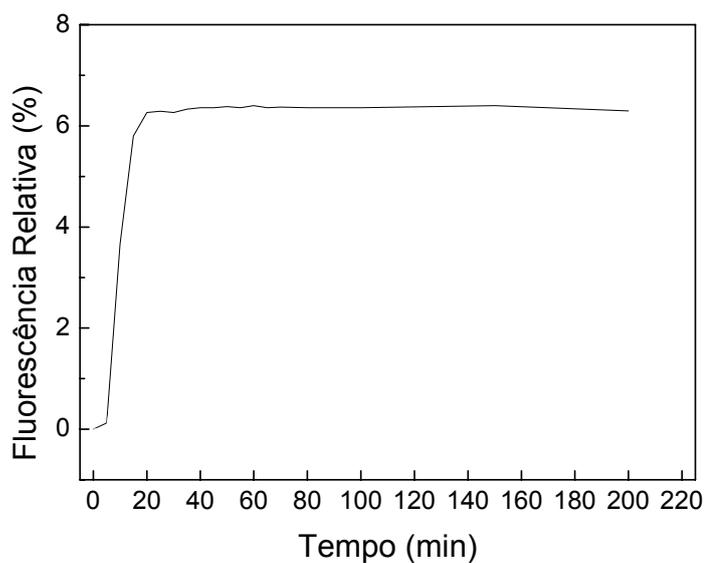


Figura 5.1. Estudo do tempo de estabilização do fluorímetro proposto.

5.2. Estudo da variação de temperatura no circuito eletrônico

Para verificar a influência da temperatura sobre o sinal de fluorescência do instrumento, estudou-se a variação de temperatura usando-se uma solução de fluoresceína. Nesse estudo apenas o instrumento foi submetido à variação de temperatura. Na Figura 5.2, podem ser vistos os diferentes níveis de concentrações deslocados nas mesmas proporções. No entanto, em temperaturas mais altas como em 29, 31 e 33 °C, o deslocamento é menor.

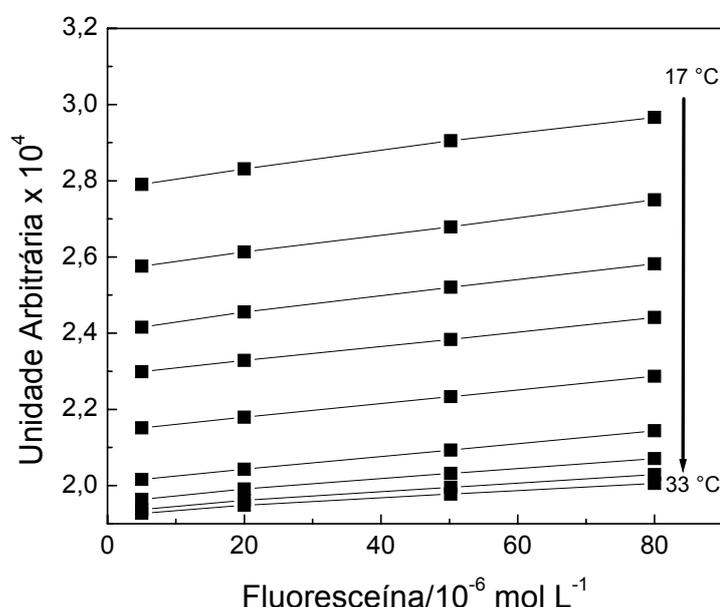


Figura 5.2. Variação de fluorescência em função de concentração de fluoresceína em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ sob influência da variação de temperatura entre 17 – 33 °C. Em a) 0,5; b) 20,0; c) 50,0; d) 80,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹. Excitação 476 nm.

Na Figura 5.3, tem-se um gráfico da variação do sinal de fluorescência em função de temperatura em quatro níveis de concentração de fluoresceína com excitação em 476 nm. Neste gráfico, constata-se a ocorrência de um decréscimo da resposta de fluorescência em todas as concentrações com variações similares na faixa de temperatura estudada. Observa-se também, uma relação linear em função do aumento de temperatura no intervalo de 17 - 29°C e, a partir de 30°C, uma leve tendência a diminuição da influência da temperatura sobre a do sinal fluorescente do instrumento²⁶.

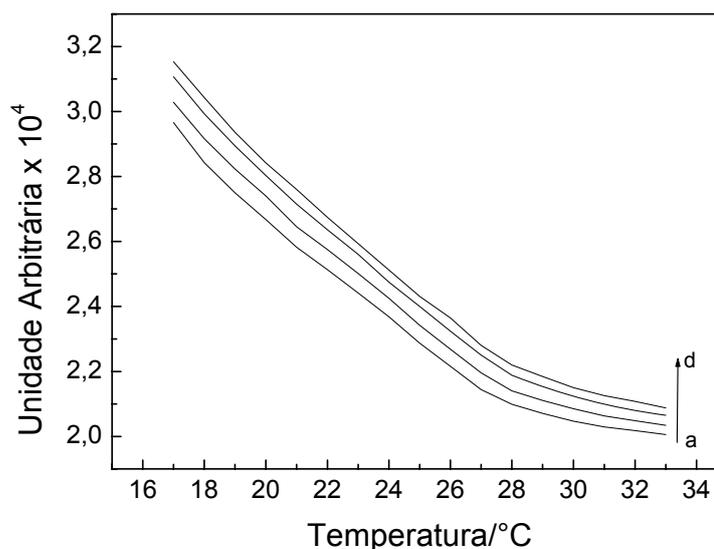


Figura 5.3. Gráfico da temperatura (°C) em função do sinal de fluorescência no fluorímetro proposto para fluoresceína em a) 0,5, b) 20,0, c) 50,0 e d) 80,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ com excitação em 476 nm.

5.3. Calibração univariada

O desempenho do fluorímetro proposto, foi comparado com um fluorímetro comercial frente aos resultados obtidos para fluoresceína e rodamina 6G em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, nas mesmas condições de temperatura. No fluorímetro proposto os sinais de fluorescência foram registrados em comprimentos de ondas discretos em 480, 540, 680 e 690 nm com excitação em 405 e 476 nm.

Inicialmente foram obtidos espectros das espécies fluorescentes usando-se um fluorímetro comercial F2500(Figura 5.4). Esses corantes fluorescentes foram estudados, diluindo-os em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. Estas espécies fluorescentes foram excitadas em dois comprimentos de onda: 405 e 476 nm. A resposta de fluorescência relativa de maior intensidade, **A**, refere-se à rodamina 6G excitada em 476 nm. Porém, ao ser excitado pela fonte em 405 nm, a intensidade de fluorescência relativa obtida reduziu de 100,0% para 48,3% em **B**, com emissão máxima em 560 nm. Em **C** tem-se a maior resposta de fluorescência relativa para fluoresceína que apresentou comprimento de onda máximo em 516 nm ao ser excitado em 405 nm, porém, ao ser excitada em 476 nm, o sinal de fluorescência diminuiu de 100,0% para apenas 31,2%, em **D**. Constata-se que a

excitação em diferentes comprimentos de onda, afeta fortemente a intensidade fluorescência destas espécies.

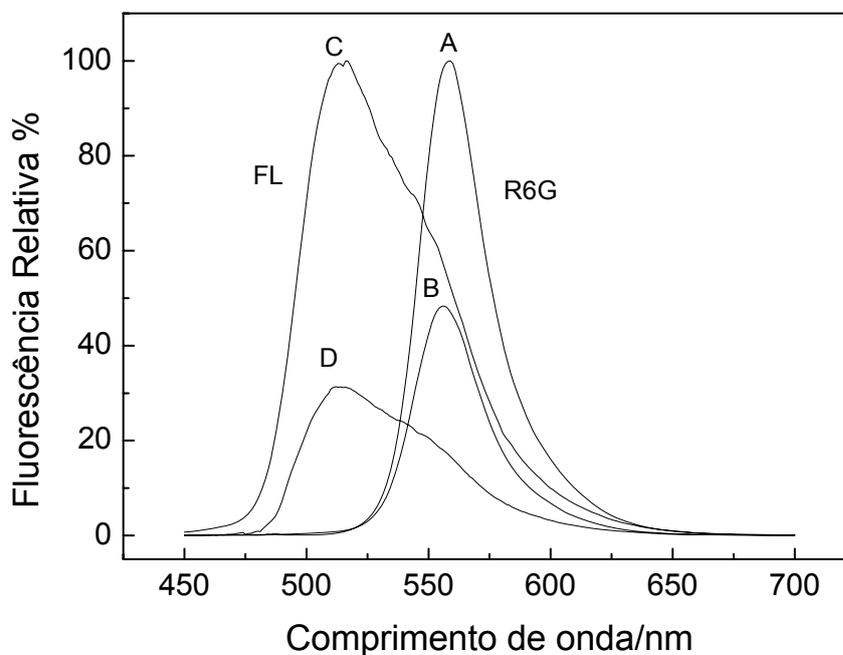


Figura 5.4. Gráfico do espectro fluorescência relativa no fluorímetro F2500: A) R6G $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (exc. 476 nm); B) R6G – $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (exc 405 nm); C) FL – $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (exc. 405 nm); D) FL – $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (exc. 476 nm). Em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 5.5 tem-se o espectro de absorção das espécies fluorescentes em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, em **A** tem-se o espectro de excitação de fluoresceína $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e em **B** rodamina 6G $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Verifica-se que a fluoresceína apresenta uma maior intensidade de fluorescência quando excitada em 405 nm, Figura 5.4. Esse efeito ocorreu porque esta espécie possui maior absorção em comprimentos de onda mais próximos a 405 nm do que em 476 nm, Figura 5.5. Para a rodamina 6G, um pico de maior absorbância pode ser observado em 526 nm, comparando-se os sinais do espectro de fluorescência desta espécie quando excitada em 405 e 476 nm, constata-se que o sinal de maior intensidade ocorre com excitação em 476 nm. Este efeito de maior intensidade confirma-se na Figura 5.5, onde esta espécie apresenta maior absorção em 476 nm do que em 405 nm.

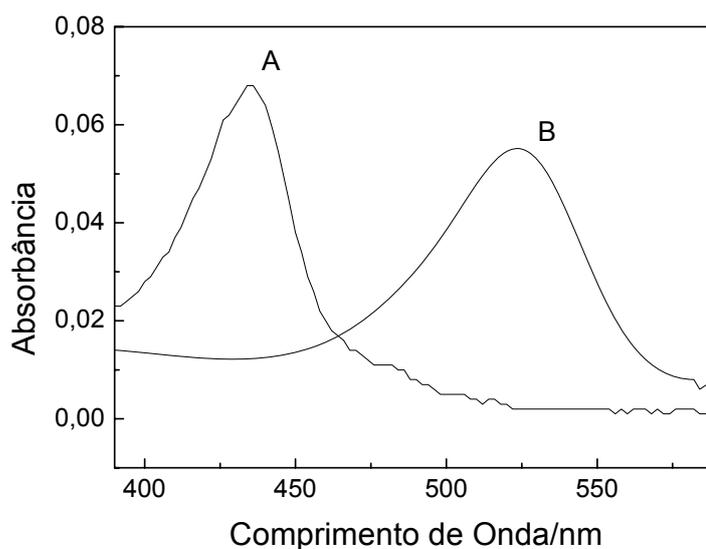


Figura 5.5. Espectro de absorção de espécies fluorescentes em HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A) Fluoresceína $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; B) Rodamina 6G $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

5.3.1. Estudo da utilização do fluorímetro proposto para determinação de fluoresceína

A resposta de fluorescência da fluoresceína como mostrado na Figura 5,4, possui um pico de máxima intensidade fluorescente em 516 nm. Na Figura 5.6 tem-se um gráfico de fluorescência relativa desta mesma espécie obtido com o fluorímetro proposto em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em concentrações entre $0,5$ e $100,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com excitação em 405 nm (LED 01). Verifica-se neste gráfico um perfil diferente do espectro gerado pelo instrumento comercial, onde o sinal de fluorescência em 680 nm registrado no instrumento desenvolvido possui maior sinal de fluorescência do que em 480, 540 e 690 nm. A elevada intensidade do sinal de fluorescência relativa registrado neste comprimento de onda ocorre porque o arranjo de fotodiodos de máxima sensibilidade em 680 nm é também fotossensível a todo o espectro visível, portanto de maior sensibilidade que os de mais, como pode ser visto na figura em anexo.

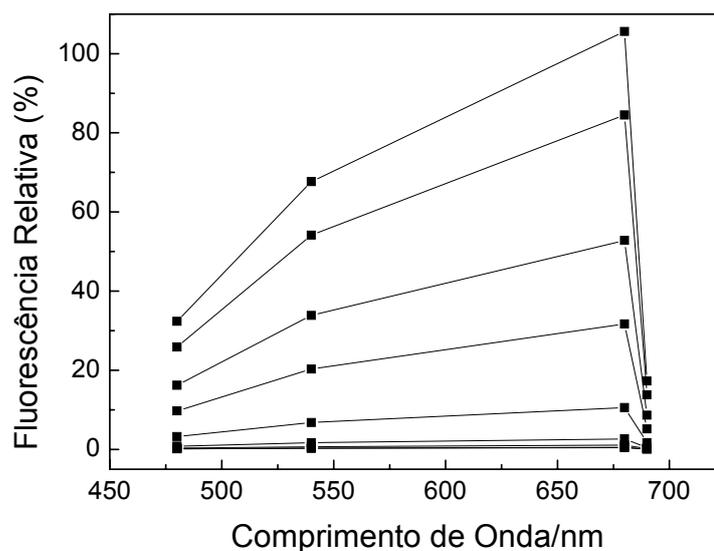


Figura 5.6. Gráfico de fluorescência relativa com o fluorímetro proposto. Concentrações de fluoresceína (LED1 – 405 nm) entre 0,5 e 100,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.

Na Figura 5.7, tem-se uma curva analítica obtida pelo instrumento desenvolvido para concentrações de fluoresceína em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ com excitação em 405 nm. Nessa figura, b) e c) são comprimentos de onda que apresentam maior intensidade do sinal de fluorescência relativa. Os comprimentos de onda em 480 e 690 nm não deveriam apresentar nenhuma relação com o aumento da concentração da espécie fluorescente, pois, a máxima sensibilidade nestes filtros está distante do comprimento de onda de máxima intensidade fluorescente desta espécie, como pode ser visto na Figura 5.4. Este efeito deve-se a baixa eficiência dos filtros do detector TCS 230.

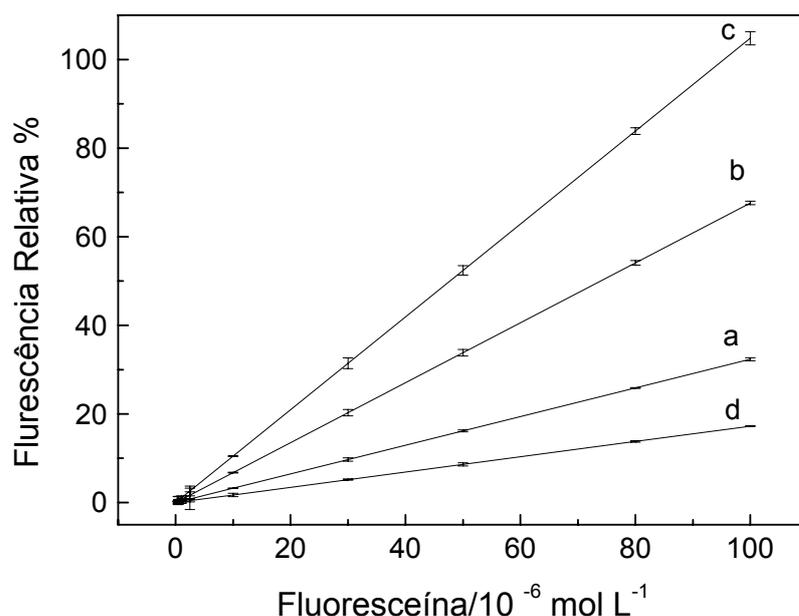


Figura 5.7. Curva analítica para determinação de fluoresceína (exc. LED1 – 405 nm). Concentrações entre 0,5 e 100,0 $\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em HCl 1,0 $\times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$. Comprimento de onda: a) 480 nm; b) 540 nm; c) 680 nm; d) 690 nm.

Na Tabela 5.1, tem-se alguns parâmetros obtidos a partir dos cálculos de regressão pelo método dos mínimos quadrados para concentrações de fluoresceína entre 0,5 e 100,0 $\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em solução de HCl 1,0 $\times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ com excitação em 405 nm, usando-se o fluorímetro comercial e o proposto. Os parâmetros calculados para este intervalo de concentração foram: coeficiente de correlação da reta, F calculado, limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade. A partir dos dados apresentados na tabela, verifica-se que foram obtidos bons resultados para o coeficiente de regressão para ambos os instrumentos e o teste F apresentou valores superior ao $F_{1,33} = 4,17$ (tabelado, a um nível de confiança de 95%) indicando que o modelo não apresentou falta de ajuste. Com base nos dados da tabela pode-se afirmar que o fluorímetro comercial destacou-se com melhores resultados de F calculado e coeficiente de regressão. O instrumento desenvolvido apresentou também bons resultados nos dois comprimentos de onda comparando-se ao desempenho do fluorímetro comercial.

Tabela 5.1. Comparação dos valores de R, F, LD, LQ e S para determinação de fluoresceína (exc. 405 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.

Instrumento	R	F	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	S (L mol ⁻¹)
Comercial*	0,999	3,9 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁻⁸	1,5 x 10 ⁻⁷	6,6 x 10 ⁷
Proposto*	0,996	2,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁻⁷	3,8 x 10 ⁻⁷	1,9 x 10 ⁷
Proposto**	0,995	2,0 x 10 ⁴	7,8 x 10 ⁻⁸	2,6 x 10 ⁻⁷	3,8 x 10 ⁷

R - Coeficiente de correlação (R); F - Teste F calculada (graus de liberdade = 33, F tab. = 4,17); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Fluorescência em 540 nm; ** - Fluorescência em 680 nm.

Na Tabela 5.2, tem-se os dados obtidos para amostras sintéticas usando-se o fluorímetro comercial e desenvolvido neste trabalho. Os dados apresentados são para amostras sintéticas de fluoresceína nas concentrações: 1,0, 10,0, 50,0 e 100,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com excitação em 405 nm e emissão em 540 nm. Comparando-se os resultados obtidos pelo fluorímetro desenvolvido e o fluorímetro comercial usando-se o teste t pareado a um nível de 95%, os instrumentos não apresentaram diferenças significativas. Verifica-se que o fluorímetro proposto apresentou boa precisão e exatidão.

Tabela 5.2. Valores médios de concentração de fluoresceína (exc. 405 nm, em. 540 nm) dentro do intervalo da faixa linear de concentrações obtidos para amostras sintéticas. Em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, (n = 3).

Amostras	Valor Esperado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	Valor Determinado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)		E (%)	
		Comercial	Proposto	A	B
Amostra 01	100,0	99,5 ± 1,0	98,7 ± 0,7	-0,5	-1,3
Amostra 02	50,0	50,9 ± 1,6	52,1 ± 1,0	+1,8	4,2
Amostra 03	10,0	9,7 ± 0,5	10,1 ± 0,6	-3,0	1,0
Amostra 04	1,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,1	0,0	10,0

A - Fluorímetro comercial; B - Fluorímetro proposto; E = 100 x (valor esperado – valor determinado)/valor esperado.

Na Figura 5.8, tem-se um gráfico de fluorescência relativa para fluoresceína excitada em 476 nm em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5}$, em concentrações entre $0,5$ e $100,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, obtido com o fluorímetro desenvolvido. Verifica-se uma pequena alteração no perfil de resposta de fluorescência, comparando-se ao gráfico anterior, Figura 5.6. Essa mudança no perfil pode ser devido à interferência da radiação da fonte sobre os filtros do detector em 480 e 540 nm, e devido a menor intensidade da radiação fluorescente desta espécie quando excitada em 476 nm.

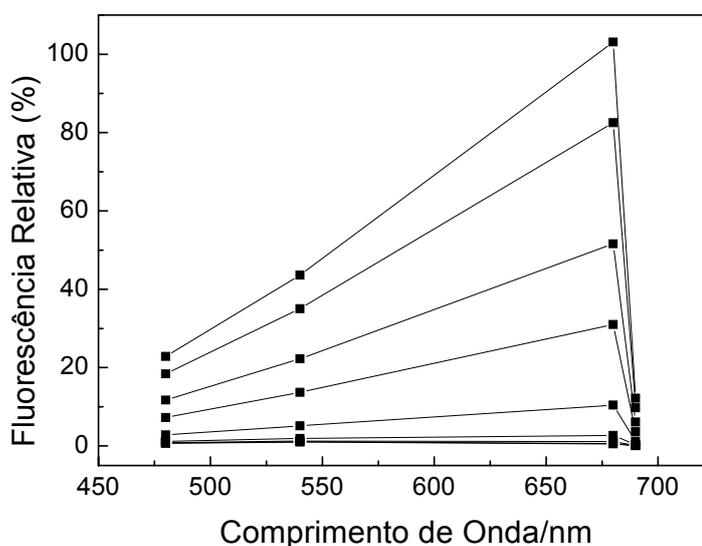


Figura 5.8. Gráfico de concentrações de fluoresceína no fluorímetro proposto. Fluoresceína (LED2 – 476 nm). Concentrações de $0,5$ a $100,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 5.9, tem-se uma curva analítica para fluorescência relativa de fluoresceína em concentrações entre $0,5$ a $100,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com excitação em 476 nm, obtida com o fluorímetro desenvolvido. Nessa figura, pode ser visto que o sinal de fluorescência relativa em 680 nm, apresentou maior inclinação da curva analítica, do que em 540 nm e, os filtros 480 e 690 nm apresentaram inclinação da reta próximos.

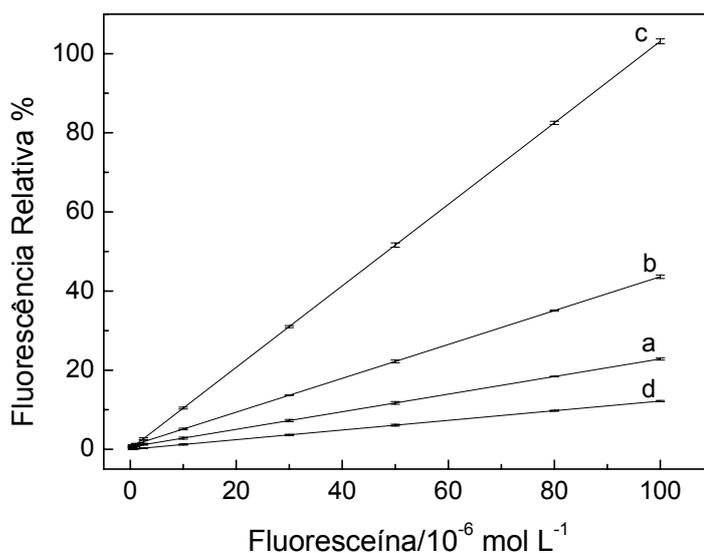


Figura 5.9. Curva de calibração de usando-se o fluorímetro proposto. Fluoresceína (LED2 – 476 nm) em HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$. Filtros do detector TCS 230: a) 480, b) 540, c) 680 e d) 690 nm.

Na Tabela 5.3, tem-se alguns parâmetros obtidos do sinal de fluorescência relativa de fluoresceína excitada em 476 nm, para concentrações entre 0,5 e 100,0 $\times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L $^{-1}$ usando-se o fluorímetro proposto e o fluorímetro comercial. Os parâmetros calculados pelo método dos mínimos quadrados apresentados na tabela são: coeficiente de correlação da reta, F calculado, limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade. Verifica-se na tabela que, a faixa dinâmica da reta estudada apresentou um bom ajuste tanto para instrumento comercial como para o instrumento desenvolvido comparando-se os valores de **R** e **F** em 540 nm. Porém, o instrumento comercial teve melhor desempenho frente ao fluorímetro desenvolvido.

Tabela 5.3. Comparação dos resultados de R, F, LD, LQ e S para determinação de fluoresceína (exc. 476 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.

Instrumento	R	F	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	S (L mol ⁻¹)
Comercial*	0,999	1,5 x 10 ⁴	4,5 x 10 ⁻⁸	1,5 x 10 ⁻⁷	6,7 x 10 ⁷
Proposto*	0,997	3,8 x 10 ³	1,5 x 10 ⁻⁷	4,9 x 10 ⁻⁷	2,0 x 10 ⁷
Proposto**	0,946	7,2 x 10 ¹	6,0 x 10 ⁻⁸	2,0 x 10 ⁻⁷	5,0 x 10 ⁷

R - Coeficiente de correlação (R); F - Teste F (graus de liberdade = 33, F tab. = 4,17); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Fluorescência em 540 nm; ** - Fluorescência em 680 nm.

Na Tabela 5.4, são apresentados dados de concentração de amostras sintéticas de fluoresceína nas concentrações de 1,0, 10,0, 50,0, e 100,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ obtidos com o fluorímetro comercial e o fluorímetro desenvolvido, ambos nas mesmas condições. Nessa tabela, estão os valores esperados para as amostras e os valores obtidos por cada instrumento. Calculou o teste t pareado, com nível de 95% de confiança, constatou-se que não há diferença significativa entre os instrumentos.

Tabela 5.4. Valores médios de concentração de fluoresceína (exc. 476 nm, em. 540 nm) dentro do intervalo da faixa linear de concentrações obtidas para amostras sintéticas. Em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. (n = 3)

Amostras	Valor Esperado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	Valor Determinado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)		E (%)	
		Comercial	Proposto	A	B
Amostra 01	100,0	98,6 ± 0,5	97,5 ± 0,6	-1,4	-2,5
Amostra 02	50,0	52,3 ± 1,3	51,1 ± 0,7	4,6	2,2
Amostra 03	10,0	9,5 ± 0,0	9,4 ± 0,2	-5,0	4,0
Amostra 04	1,0	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,1	+10,0	-10,0

A - Fluorímetro comercial; B - Fluorímetro proposto; E = 100 x (valor esperado – valor determinado)/valor esperado.

5.3.2. Estudo da utilização do fluorímetro proposto para determinação de Rodamina 6G

Na Figura 5.10, tem-se a resposta de fluorescência relativa para rodamina 6G em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com excitação em 405 nm obtida com o fluorímetro desenvolvido. Constata-se que em todos os comprimentos de onda ocorreu uma elevação do sinal de fluorescência diretamente proporcional ao aumento da concentração de rodamina 6G, exceto em 690 nm, que ocorreu uma diminuição do sinal de fluorescência. Esta diminuição no sinal de fluorescência pode ter ocorrido porque esta espécie absorve radiação em comprimentos de ondas maiores e, o sinal refletido do LED 01 (em 830 nm) é absorvido por esta espécie.

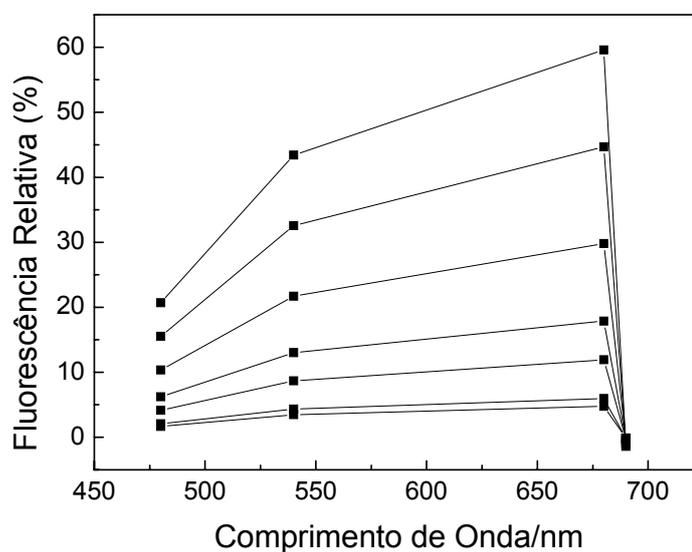


Figura 5.10. Variação de fluorescência relativa em função do tipo de filtro do detector para concentrações de Rodamina 6G (exc. LED 01 - 405 nm) no fluorímetro proposto. Concentrações entre $0,2$ e $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Na Figura 5.11, tem-se a curva analítica obtida com o fluorímetro proposto para a fluorescência de rodamina 6G em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com excitação em 405 nm. Estudou-se uma faixa de concentração entre $0,2$ e $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Nesta figura, verifica-se uma maior inclinação da curva analítica para os sinais de fluorescência relativa observados em 680 nm, seguido por 540 nm. Em 690 nm, obteve-se uma relação linear negativa da curva analítica com o aumento da concentração de rodamina 6G.

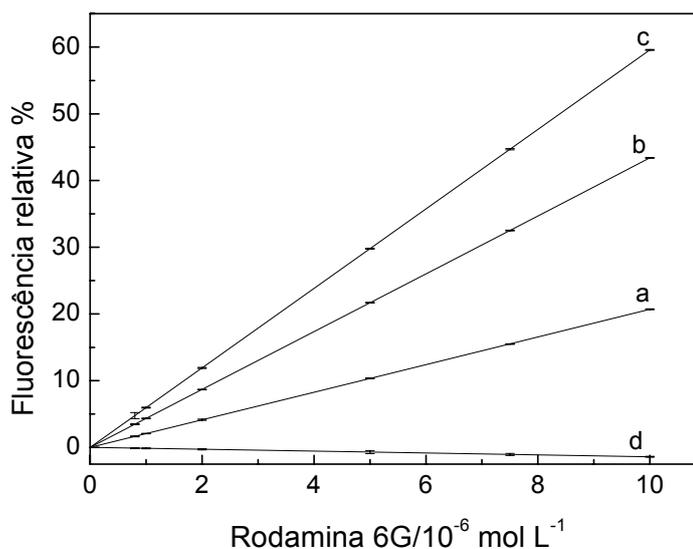


Figura 5.11. Curvas de calibração usando-se o fluorímetro proposto para rodamina 6G (exc. LED 01 - 405 nm) em HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Filtros do detector TCS 230: a) 480, b) 540, c) 680 e d) 690 nm.

Na Tabela 5.5, tem-se alguns dados calculados a partir da curva analítica obtida para rodamina 6G em concentrações entre $0,2$ a $10,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com excitação em 405 nm. Os dados apresentados nesta tabela são referentes aos sinais de fluorescência obtidos com o fluorímetro comercial e o fluorímetro proposto. O fluorímetro proposto apresenta dados de um modelo bem ajustado, no entanto, o desempenho do fluorímetro comercial foi melhor se comparados os valores obtidos em 540 nm. Verifica-se também que, em 680 nm o F calculado do fluorímetro proposto foi menor que em 540 nm, apesar de apresentar maior coeficiente de inclinação da reta maior e sensibilidade.

Tabela 5.5. Comparação dos resultados de R, F, LD, LQ e S para determinação de rodamina 6G (exc. 405 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.

Instrumento	R	F	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	S (L mol ⁻¹)
Comercial*	0,990	$2,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^{-8}$	$7,1 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^8$
Proposto*	0,985	$2,5 \times 10^3$	$3,7 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$8,1 \times 10^7$
Proposto**	0,957	$6,9 \times 10^2$	$3,4 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$8,8 \times 10^7$

R - Coeficiente de correlação (R); F - Teste F (graus de liberdade = 33, F tab. = 4,17); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Fluorescência em 540 nm; ** - Fluorescência em 680 nm.

Na Tabela 5.6 são apresentados dados de amostras sintéticas em diferentes concentrações de rodamina 6G, obtidos usando o fluorímetro comercial e o fluorímetro desenvolvido. As amostras foram estudadas nas seguintes concentrações 0,2, 0,8, 5,0 e 10,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ com excitação em 405 nm. Nesta tabela, estão as concentrações do fluoróforo esperadas e determinadas pelos instrumentos. A partir dos dados obtidos pelos instrumentos realizou-se o teste t pareado, com um nível de 95% de confiança, constata-se que não há diferença significativa eles. Verificou-se também que o fluorímetro proposto apresentou boa precisão e exatidão.

Tabela 5.6. Valores médios de concentração de fluoresceína (exc. 405 nm, em. 540 nm) dentro do intervalo da faixa linear de concentrações obtidas para amostras sintéticas. Em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. (n = 3)

Amostras	Valor Esperado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	Valor Determinado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)		E (%)	
		Comercial	Proposto	A	B
Amostra 01	10,0	9,73 ± 0,15	9,49 ± 0,11	-2,7	5,1
Amostra 02	5,0	5,50 ± 0,07	5,38 ± 0,40	10,0	7,6
Amostra 03	0,8	0,81 ± 0,05	0,81 ± 0,07	1,25	1,25
Amostra 04	0,2	0,22 ± 0,06	0,19 ± 0,09	10,0	-5,0

A - Fluorímetro comercial; **B** - Fluorímetro proposto; **E** = 100 x (valor esperado – valor determinado)/valor esperado.

Na Figura 5.12 é apresentado a variação de fluorescência para concentrações de rodamina 6G em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, para uma faixa de concentrações ente 0,2 e 10,0 x 10⁻⁶ mo L⁻¹ com excitação em 476 nm. Nesta figura um alto valor de fluorescência ocorre em 680 nm. Este alto valor fluorescência deve-se àlarga faixa fotossensível neste comprimento de onda. Verifica-se que a fluorescência em 480 e 540 nm apresentaram respostas aproximadas.

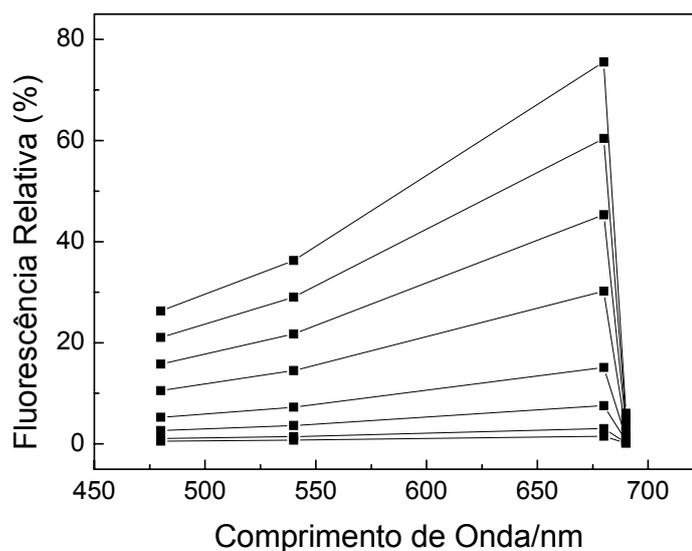


Figura 5.12. Concentrações de Rodamina 6G no fluorímetro proposto. Rodamina 6G (exc. LED2 – 476 nm). Concentrações entre 0,2 e 10,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹.

Na Figura 5.13, tem-se um gráfico da curva analítica calculada para concentrações de rodamina 6G entre 0,2 e 10,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com excitação em 476 nm. Constata-se que o sinal de fluorescência relativa em 680 nm apresentou quase o dobro de intensidade em relação a 540 nm e em 690 nm o sinal de fluorescência relativa para as concentrações apresentou uma relação linear positiva, diferente da resposta obtida quando esta espécie foi excitada em 405 nm.

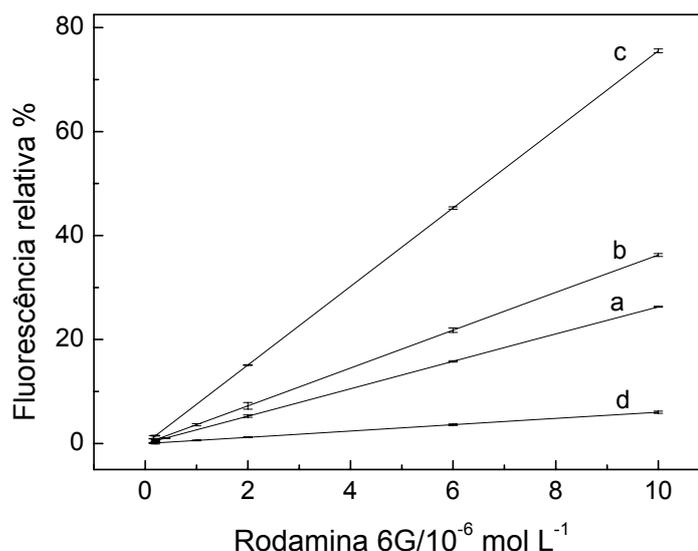


Figura 5.13. Curva de calibração para rodamina 6G (exc. LED2 - 476 nm) em HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ usando-se o fluorímetro proposto. Filtros do detector TCS 230: a) 480, b) 540, c) 680 e d) 690 nm.

Na Tabela 5.7 tem-se os parâmetros analíticos obtidos usando-se um fluorímetro comercial e o fluorímetro proposto nas mesmas condições para rodamina 6G para concentrações entre $0,2$ e $10,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em solução de HCl $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, com excitação em 476 nm. Nessa tabela, tem-se o coeficiente de correlação da reta, F calculado, limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade. Verifica-se a partir dos dados apresentados na tabela, que em todos os parâmetros, exceto para o coeficiente de correlação, o instrumento comercial teve melhor desempenho frente ao fluorímetro desenvolvido. Constata-se a partir do teste F calculado, que o modelo foi bem ajustado para ambos, porém, um melhor ajuste foi obtido para o fluorímetro comercial que apresentou quase o dobro do valor de F calculado.

Tabela 5.7. Comparação dos resultados de R, F, LD, LQ e S para determinação de rodamina 6G (exc. 476 nm) entre o fluorímetro comercial e o proposto.

Instrumento	R	F	LD (mol L ⁻¹)	LQ (mol L ⁻¹)	S (L mol ⁻¹)
Comercial*	0,992	5,6 x 10 ³	2,2 x 10 ⁻⁸	7,5 x 10 ⁻⁸	1,4 x 10 ⁸
Proposto*	0,989	2,8 x 10 ³	3,6 x 10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁻⁷	8,3 x 10 ⁷
Proposto**	0,997	2,7 x 10 ³	5,2 x 10 ⁻⁸	1,7 x 10 ⁻⁷	5,8 x 10 ⁷

R - Coeficiente de correlação (R); F - Teste F (graus de liberdade = 33, F tab. = 4,17); LD - Limite de detecção; LQ - Limite de quantificação; S - Sensibilidade; * - Fluorescência em 540 nm; ** - Fluorescência em 680 nm.

Na Tabela 5.8 são apresentados valores obtidos a partir de amostras sintéticas de rodamina 6G nas concentrações de 0,2, 0,8, 5,0 e 10,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, com excitação em 476 nm. Esse estudo foi realizado usando o fluorímetro proposto e um fluorímetro comercial. Nesta tabela são apresentados valores reais das concentrações das amostras sintéticas e valores preditos a partir dos dados registrados nos instrumentos. Aplicou-se um teste t pareado entre os dados obtidos por cada instrumento com um nível de confiança de 95% e constatou-se que não há diferença significativa entre os instrumentos, obteve-se também, bons resultados de precisão e exatidão do fluorímetro proposto.

Tabela 5.8. Valores médios de concentração de rodamina dentro do intervalo da faixa linear de concentrações (exc. 476 nm, em. 540 nm) obtidas para amostras sintéticas. Em solução de HCl 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. (n = 3)

Amostras	Valor Esperado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)	Valor Determinado (10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)		E (%)	
		Comercial	Proposto	A	B
Amostra 01	10,0	9,92 ± 0,26	9,81 ± 0,39	0,8	1,9
Amostra 02	5,0	5,13 ± 0,19	5,15 ± 0,15	-2,6	-3,0
Amostra 03	0,8	0,80 ± 0,14	0,78 ± 0,34	0,0	2,5
Amostra 04	0,2	0,21 ± 0,16	0,19 ± 0,14	-5,0	5,0

A - Fluorímetro comercial; B - Fluorímetro proposto; E = 100 x (valor esperado – valor determinado)/valor esperado.

5.4. Determinação de clorofila a

As determinações de clorofila a e feopigmentos foram realizadas a partir de amostras da barragem da UFSCar e de uma cultura de alga azul *Selenastrum capricornutum* cultivada em laboratório usando-se os métodos fluorimétrico e o método comparativo fotométrico. No método fotométrico utilizou-se um fotômetro comercial, e no método fluorimétrico o fluorímetro desenvolvido. Na Tabela 5.9, são expostos os resultados das concentrações de clorofila a e feopigmentos em cada uma das amostras.

Constatou-se que os métodos apresentaram resultados concordantes para clorofila a e feopigmentos, tanto para as amostras coletadas na barragem da UFSCar quanto para as cultivadas em laboratório comparando-se o erro relativo existente entre os dados obtidos pelos diferentes métodos. No entanto, obteve-se concentração diferente para os feopigmentos nas amostras provenientes da barragem. Além disso, o método fluorimétrico apresentou maiores desvios, porém, esse efeito é esperado devido forte influência da temperatura e fotodegradação que afetam diretamente a resposta analítica.

Tabela 5.9. Concentrações de clorofila a e feopigmentos em amostras de águas usando-se o método fotométrico e fluorimétrico (n = 3).

Amostras	Concentração x 10 ⁻⁶ g L ⁻¹		
	Fotométrico	Fluorimétrico	E (%)
Clorofila a (barragem)	6,6 ± 0,5	6,7 ± 2,1	-1,5
Feopigmento (barragem)	1,8 ± 0,4	4,8 ± 2,6	-160,6
Clorofila a (meio de cultura)	1331,1 ± 0,7	1333,6 ± 2,6	-0,2
Feopigmento (meio de cultura)	402,2 ± 1,1	398,2 ± 4,8	+0,9

E (erro relativo)= 100 x (método fotométrico – método fluorimétrico)/ método fotométrico.

Na Figura 5.22 é apresentada a curva analítica para clorofila a em amostras de meio de cultura de alga azul (*Selenastrum capricornutum*)⁷⁴ obtidas usando-se o fluorímetro proposto com excitação em 405 nm e emissão em 690 nm. As soluções foram obtidas realizando-se diluições da amostra inicial de alga azul considerando a concentração máxima dessa espécie de 1333,6 x 10⁻⁶ g L⁻¹. Nesse

estudo foi obtida uma relação linear entre $2,5$ e $1333,6 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação de $0,995$.

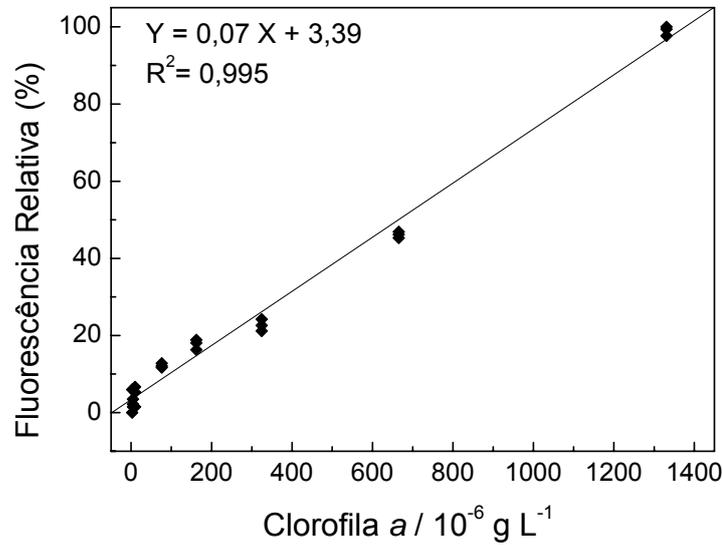


Figura 5.14. Curva de calibração para clorofila *a* obtida utilizando-se o fluorímetro proposto. Excitação em 405 nm e leitura em 690 nm.

A faixa de concentração obtida para clorofila *a* atende aos limites estipulados pelo CONAMA, resolução n° 357/2005. Essa resolução classifica a água em três classes sendo que a concentração de clorofila *a* é um dos parâmetros usados para a classificação. Os níveis de concentrações de $10,0$, $30,0$, e $60,0 \times 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$ de clorofila *a*^{66, 67} correspondem às classes 1, 2 e 3 respectivamente.

Capítulo

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um fluorímetro para medidas na região visível do espectro que utiliza dois comprimentos de onda de excitação e detecção em quatro regiões do espectro com diferentes sensibilidades. Para tanto, fez-se uso de LEDs com máximo de emissão em 405 e 476 nm como fonte de excitação das espécies, logo, foi dispensado o uso de filtro óptico ou monocromador, o mesmo ocorreu ao se usar um detector com possibilidade de seleção de diferentes regiões do espectro, tendo como máximo de resposta os valores de 480, 540, 680 e 690 nm. A utilização do microcontrolador como unidade central de comando, processamento dos dados e controle dos periféricos (LED, detector, mostrador digital, botões e interface) proporcionou economia de componentes na montagem do sistema e facilidade para sua utilização. Com essas características é possível a sua utilização no estudo de diversas espécies fluorescentes. Além disso, os LEDs utilizados podem ser substituídos facilmente por outros. O fluorímetro desenvolvido tem massa total de 0,76 kg e dimensões de 11 cm x 20 cm x 10 cm o que o torna portátil.

O desempenho do instrumento foi verificado frente a um fluorímetro comercial com soluções de fluoresceína e rodamina 6G e não verificou-se diferença significativa entre eles a um nível de confiança de 95%. Além disso, os intervalos de concentração de trabalho foram similares, bem como, os demais parâmetros analíticos de desempenho.

O fluorímetro desenvolvido foi aplicado à determinação de clorofila *a* em amostras da barragem da UFSCar e de uma cultura de alga azul *Selenastrum capricornotum* e os resultados foram comparados os obtidos utilizando um método fotométrico comparativo. Obteve-se para as amostras da barragem concentrações de clorofila *a* de 6,6 e 6,7 x 10⁻⁶ g L⁻¹ com os métodos fotométrico e fluorimétrico, respectivamente. Para as amostras de alga azul foram obtidas concentrações de 1331,1 e 1333,6 x 10⁻⁶ g L⁻¹ com os métodos, fotométrico e fluorimétrico, respectivamente. Portanto, o fluorímetro desenvolvido apresentou resultados satisfatórios para determinação das espécies estudadas.

Com base no desempenho analítico, e no custo para o desenvolvimento (aproximadamente R\$ 300,00) o instrumento proposto pode ser uma alternativa economicamente viável para laboratórios de análise e para laboratórios de prática de ensino.

Capítulo

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROHATIGI-MUKHERJEE, K.K., *Fundamentals of photochemistry*. 1 ed. 1992, Calcutta: Wiley Eastern limited. 388.
2. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. & GRASSI, M.T., *Fundamentos de química analítica*. 8 ed. 2006, São Paulo Pioneira Thomson Learning. 1000.
3. LAKOWICZ, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3 ed. 2006, Maryland: Springer. 954.
4. VALEUR, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2001, New York: Wiley-VCH. 250.
5. HART, S.J. & JIJ, R.D. "Light emitting diode excitation emission matrix fluorescence spectroscopy". *Analyst*. **127**: 1693-1699, 2002.
6. LOWRY, M.; FAKAYODE, S.O.; GENG, M.L.; BAKER, G.A.; WANG, L.; MCCARROLL, M.E.; PATONAY, G. & WARNER, I.M. "Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry". *Anal. Chem.* **80**(12): 4551-4574, 2008.
7. WOLF, C.; LIU, S.L. & REINHARDT, B.C. "An enantioselective fluorescence sensing assay for quantitative analysis of chiral carboxylic acids and amino acid derivatives". *Chemical Communications*. **40**: 4242-4244, 2006.
8. LORENZEN, C.J. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations". *Limnology and Oceanography*. **12**: 343-346, 1967.
9. KHAN, F.; GNUDI, L. & PICKUP, J.C. "Fluorescence-based sensing of glucose using engineered glucose/galactose-binding protein: A comparison of fluorescence resonance energy transfer and environmentally sensitive dye labelling strategies". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **365**: 102-106, 2008.
10. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. & NIEMAN, T.A., *Princípios de análises instrumental*. 5 ed. 2006, São Paulo: Bookman. 836.
11. BACON, C.P.; MATTLEY, Y. & DEFRECE, R. "Miniature spectroscopic instrumentation: Applications to biology and chemistry". *Review of Scientific Instruments*. **75**(1), 2004.
12. AHMAD, S.R. & REYNOLDS, D.M. "Monitoring of water quality using fluorescence technique: prospect of on-line process control". *Water Research*. **33** (9): 2069-2074, 1999.
13. DASGRUPTA, P.K.; EOM, I.; MORRIS, K.J. & JIANZHONG, L. "Light emitting diode-based detectors absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-through cell". *Analytica Chimica Acta*. **500**: 337-364, 2003.
14. YAM, F.K. & HASSAN, Z. "Innovative advances in LED technology". *Microelectronics Journal*. **36**: 129-137, 2005.

15. O'TOOLE, M. & DIAMOND, D. "Absorbance based light emitting diode optical sensors and sensing devices". *Sensors*. **8**: 2453-2479, 2008.
16. VERAS, G.; SILVA, E.C.; LYRA, W.S.; SOARES, S.F.C.; GUERREIRO, T.B. & SANTOS, S.R.B. "A portable, inexpensive and microcontrolled spectrophotometer based on white LED as light source and CD media as diffraction grid". *Talanta*. **77**: 1155–1159, 2009.
17. BROEKAERT, J.A.C., *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*. 2002, Wiley-VCH: Weinheim. p. 432.
18. POSTOLACHE, O.A.; GIRAO, P.; PEREIRA, J.M.D. & RAMOS, H.M.G. "Multibeam optical system and neural processing for turbidity measurement". *Ieee Sensors Journal*. **7**(5-6): 677-684, 2007.
19. WELLS, M. "Advances in optical detection strategies for reporter signal measurements". *Current Opinion in Biotechnology*. **17**: 28-33, 2006.
20. SCHMIDT, O.; KIESEL, P. & BASSLER, M. "Performance of chip-size wavelength detectors". *Optics Express*. **15**(15): 9701-9706, 2007.
21. YOTTER, R.A. & WILSON, D.M. "A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems". *Ieee Sensors Journal*. **3**(3): 288-303, 2003.
22. RAJENDRAN, A. & NEELAMEGAM, P. "Measurement of conductivity of liquids using AT89C55WD microcontroller". *Measurement*. **35**(1): 59-63, 2004.
23. YEH, T.S. & TSENG, S.S. "A low cost LED based spectrometer". *Journal of the Chinese Chemical Society*. **53**(5): 1067-1072, 2006.
24. GAIÃO, E.N.; MEDEIROS, E.P.; LYRA, W.S.; MOREIRA, P.N.T.; VASCONCELOS, P.C.; SILVA, E.C. & ARAÚJO, M.C.U. "Um fotômetro multi-led microcontrolado, portátil e de baixo custo ". *Quimica Nova*. **28**(6): 1102-1105, 2005.
25. GAIÃO, E.N.; SANTOS, S.R.B.; SANTOS, V.B.; NASCIMENTO, E.C.L.; LIMA, R.S. & ARAUJO, M.C.U. "An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline". *Talanta*. **75**: 792-796, 2008.
26. PALMA, A.J.; LOPEZ-GONZALEZ, J.; ASENSIO, L.J.; FERNANDEZ-RAMOS, M.D. & CAPITAN-VALLVEY, L.F. "Microcontroller-based portable instrument for stabilised optical oxygen sensor". *Sensors and Actuators B-Chemical*. **121**(2): 629-638, 2007.
27. PALMA, A.J.; ORTIGOSA, J.M.; LAPRESTA-FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ-RAMOS, M.D.; CARVAJAL, M.A. & CAPITÁN-VALLVEY, L.F. "Portable light-emitting diode-based photometer with one-shot optochemical sensors for measurement in the field". *Review of Scientific Instruments*. **79**(10): 103-105, 2008.
28. BEUTLER, M.; WILTSHIRE, K.H.; MEYER, B.; MOLDAEKE, C.; LURING, C.; MEYERHOFER, M.; HANSEN, U.-P. & DAU, H. "A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ". *Photosynthesis Research*. **72**(1): 39–53, 2002.

29. SCHIMANSKI, J.; BEUTLER, M.; MOLDAENKE, C. & ULF-PETER-HANSEN "A model for correcting the fluorescence signal from a free-falling depth profiler". *Water Search*. **40**(8): 1616-1626, 2006.
30. CANTRELL, K.M. & INGLE, J.D. "The SLIM spectrometer". *Analytical Chemistry*. **75**(1): 27-35, 2003.
31. <http://www.microchip.inc.com.>, acesso em 19 de novembro de 2007.
32. SANCHEZ, J. & CANTON, M.P., *Microcontroller programming: the Microchip PIC*. 2007, New York: CRC Press-Taylor & Francis Group. 607.
33. MANZANO, J.N.G., *Estudo dirigido-linguagem c*. 6 ed. 1997, São Paulo: Erica. 208.
34. PEREIRA, F., *Microcontroladores PIC- programação em c*. 1 ed. 2003, São Paulo: Erica. 360.
35. <http://www.mikroe.com/eng/home/index/>, acesso em 19 de junho de 2010.
36. <http://pdf1.alldatasheet.com/datasheet-pdf/view/96470/ETC/TCS230.html>, acesso em 03 de junho de 20120.
37. LAMOGLIA, V., *Espectrômetro acadêmico*, in *Engenharia da Computação*. 2005, Centro Universitário Positivo: Curitiba.
38. YAM, F.K. & HASSAN, Z. "Innovative advances in LED technology". *Microelectronics Journal*. **36**(1): 129-137, 2004.
39. DASGRUPTA, P.K.; EOM, I.; MORRIS, K.J. & JIANZHONG, L. "Light emitting diode-based detectors absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in a planar flow-throug cell". *Analytica Chimica Acta*. **500**(1-2): 337-364, 2003.
40. <http://www.microgenios.com.br>, acesso em 09 de junho de 2010.
41. LI, Y.Q.; QIAN, F. & HUANG, X.Z. "Simultaneous determination of fluorescein, rhodamine 6G and rhodamine B in turbid solution by polarization variable-angle synchronous fluorescence spectrometry". *Chinese Chemical Letters*. **11**(7): 613-614, 2000.
42. SIEJAK, P. & FRACKOWIAK, D. "Spectral properties of fluorescein molecules in water with the addition of a colloidal suspension of silver". *Journal of Physical Chemistry B*. **109**(30): 14382-14386, 2005.
43. GE, F. & CHEN, L. "PH Fluorescent Probes: Chlorinated Fluoresceins". *Journal of Fluorescence*. **18**(3-4): 741-747, 2008.
44. PATNAIK, P., *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. 2 ed. 2004: McGraw-Hill. 1143.
45. GHASEMI, J.; NIAZI, A. & KUBISTA, M. "Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by photometric titration and chemometrics method". *Spectrochimica Acta Part A*. **62**(1-3): 649-656, 2005.
46. CHAN, C.C.; LAM, H.; LEE, Y.C. & ZHANG, X., *Analytical method validation and instrument performance verification*. 4 ed. 2004, New Jersey: John Wiley & Sons. 318.

47. DEROSE, P.C.; EARLY, E.A. & KRAMER, G.W. "Qualification of a fluorescence spectrometer for measuring true fluorescence spectra". *Review of Scientific Instruments*. **78**(3): 107, 2007.
48. CHAN, C.C.; LAM, H.; LEE, Y.C. & ZHANG, X., eds. *Analytical method validation and instrument performance verification*. 2004, John Wiley & Sons: New Jersey.
49. DEROSE, P.C.; SMITH, M.V.; MIELENZ, K.D.; BLACKBURN, D.H. & KRAMER, G.W. "Characterization of Standard Reference Material 2940, Mn-ion-doped glass, spectral correction standard for fluorescence". *Journal of Luminescence*. **129**: 349-355, 2009.
50. THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R. & WOOD, R. "Harmonizes guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis". *Pure Appl. Chem.* **74**(5): 835–855, 2002.
51. *ORIENTAÇÕES SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ENSAIOS QUÍMICOS – DOQ-CGCRE-008*, in *Instituto Nacional de Metrologia - Normalização e Qualidade Industrial*. 2003.
52. M, B.N.; P, A.O.; L, P. & L, R.M. "VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO". *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. **13**, 2003.
53. NETO, B.D.B., ed. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 3 ed. 2007, UNICAMP: Campinas.
54. DIAZ, T.G.; MERAS, I.D.; CORREA, C.A.; ROLDAN, B. & CACERES, M.I.R. "Simultaneous fluorimetric determination of chlorophylls *a* and *b* and pheophytins *a* and *b* in olive oil by partial least-squares calibration". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 6934-6940, 2003.
55. LLORENT-MARTINEZ, E.J.; GARCIA-REYES, J.F.; ORTEGA-BARRALES, P. & MOLINA-DIAZ, A. "A multicommuted fluorescence-based sensing system for simultaneous determination of Vitamins B-2 and B-6". *Analytica Chimica Acta*. **555**(1): 128-133, 2006.
56. FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S. & VOLPE, P.L.O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial". *Quimica Nova*. **22**(5), 1999.
57. SAHIN, S.; DEMIR, C. & GÜÇER, S. "Simultaneous UV-vis spectrophotometric determination of disperse dyes in textile waster by partial least squares and principal component regression". *Dyes and Pigments*. **73**: 368-376, 2007.
58. BRERETON, R.G. "Multilevel multifactor designs for multivariate calibration". *Analyst*. **122**: 1521-1529, 1997.
59. FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S. & VOLPE, P.L.O. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial". *Quimica Nova*. **22**(5): 742-731, 1999.
60. OLIVIERI, A.C.; FABER, N.M.; FERRÉ, J.; BOQUÉ, R.; KALIVAS, J.H. & MARK, H. "Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration". *Pure Appl. Chem.* **78**(3): 633–661, 2006.

61. STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W.D. & HECKTEUER, L.H.H. "As clorofilas". *Ciência Rural*. **35**(3): 748-755, 2005.
62. BECKER, A.; MEISTER, A. & WILHELM, C. "Flow cytometric discrimination of various phycobilin-containing phytoplankton groups in a hypertrophic reservoir". *Cytometry*. **48**: 45–57, 2002.
63. BRASIL, *Portaria MS nº 518/2004*. 2005, MINISTÉRIO DA SAÚDE: Brasília. p. 28.
64. GREENBERG, A., ed. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. 1999. 1220.
65. CHORUS, I. & BARTRAM, J., *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. 1999, London e New York: WHO.
66. BRASIL, *Resolução 357/2005*, CONAMA, Editor. 2005: Brasília.
67. BRASIL, *Portaria no 1.469 - Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade*, FUNASA, C.D.G.D.V.A.-. Editor. 2001: Brasília. p. 32.
68. LORENZEN, C.J. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations". *Limnol. Oceanogr.* **12**: 343-346, 1967.
69. PÁPISTA, E.; ACS, E. & BÖDDI, B. "Chlorophyll-a determination with ethanol – a critical test". *Hidrobiologia*. **485**: 191-198, 2002.
70. AMINOT, A. & REY, F. *Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods*. in *International Council for the Exploration of the Sea Conseil International pour l'Exploration de la Mer*. 2000.
71. SMITH, D.S.; KOSTOV, Y.; RAO, G.; GRZYCZYNSKI, I.; MALICKA, J.; GRZYCZYNSKI, Z. & LAKOWICZ, J.R. "First Observation of Surface Plasmon-Coupled Emission Due to LED Excitation". *Journal of Fluorescence*. **15**(6): 895-900, 2005.
72. LÉBOULANGER, C.; DORIGO, U.; JACQUET, J.; BERRE, B.; PAOLINI, G. & HUMBERT, J. "Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study". *Aquat Microb Ecol.* **30**: 83-89, 2002.
73. FALKOWSKI, P.G. & KOLBER, Z. "Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans". *Australian Journal of Plant Physiology*. **22**(2): 341-355, 1995.
74. PINTO, A.M.F.; VON SPERLING, E. & MOREIRA, R.M. "Chlorophyll a determination continuous measurement of plankton fluorescence: methodology development". *Wat. Res.* **35**(16): 3977-3981, 2001.
75. ARAR, J.E. & COLLINS, G.B., *In vitro determination of chlorophyll a in marine and freshwater algae by fluorescence*, E.P.A, U.S., Editor. 1997: Cincinnati.

APÊNDICE

A - Fotografia do fluorímetro desenvolvido.

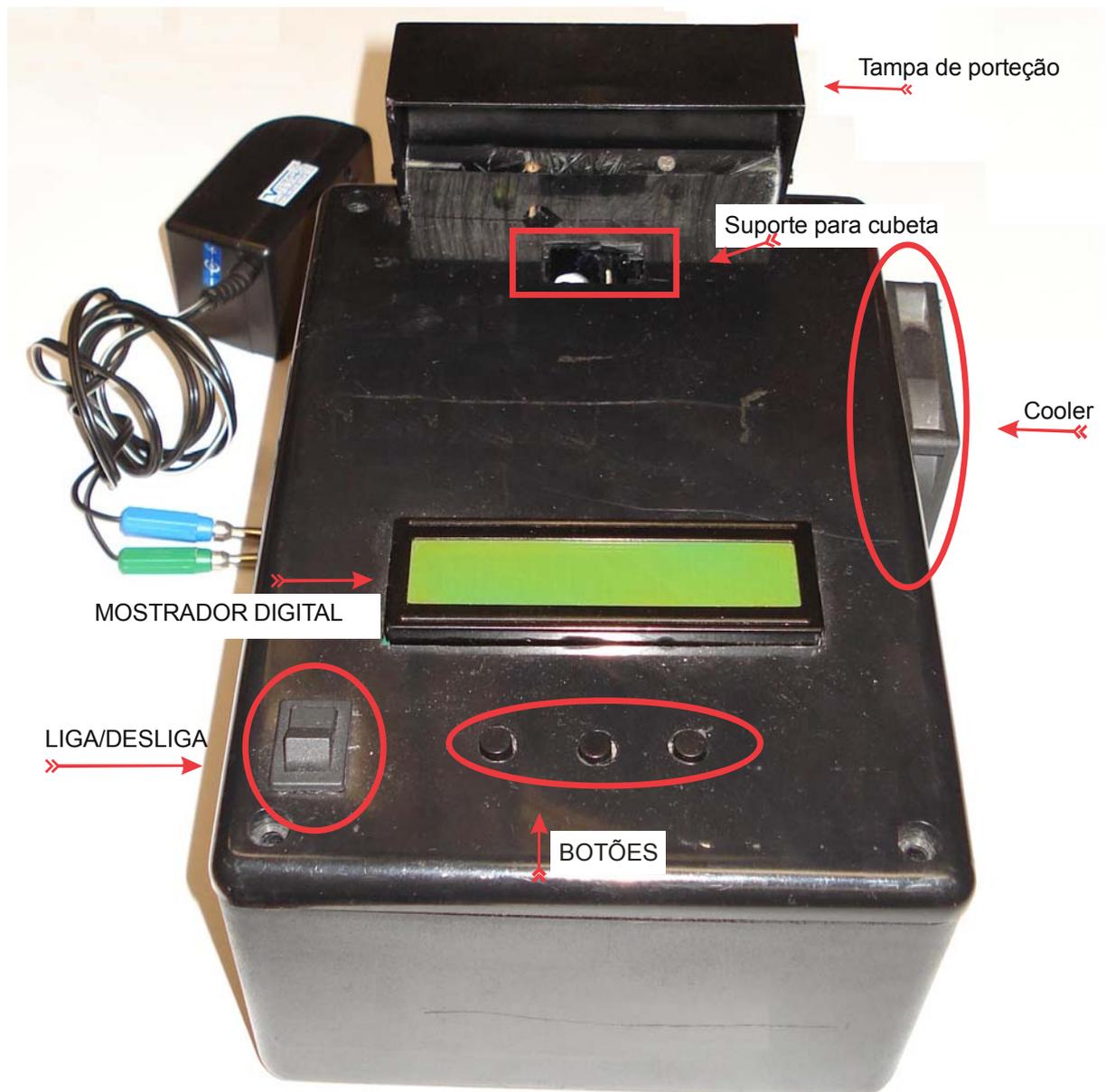


Figura Fotografia do fluorímetro protótipo desenvolvido usando LEDs como fonte de excitação, um fotodiodo multicanal como detector, um microcontrolador PIC18F4550 e um mostrador digital.

B Programa em C

```
// programa em linguagem C para Fluorimetro
//
// F0 = BT0 / F1 = BT1 / F2 = BT2
// opcao_red = 690 nm / opcao_blue = 480 nm
// opcao_clear = 680 nm / opcao_grean = 540 nm
// opcao – sub-rotina de incremento (BT0) ou decremento (BT2) de um bit
// em uma varivavel X.
```

```
unsigned int x=0;
long i, h, t=30;
long int temperatura;
```

```
void opcao_red()
{
    porte.f0=0x00;
    porta = 0x08;
}
```

```
void opcao_blue()
{
    porte.f0=0x01;
    porta = 0x08;
}
```

```
void opcao_clear()
{
    porte.f0=0x00;
    porta = 0x28;
}
```

```
void opcao_green()
{
    porte.f0 = 0x01;
```

```
    porta = 0x28;
}

void opcao_sensor()
{
    i=0, h=0;

    while (i<200)
    {
        bdd:
        if(porta.F4)
        {
            i++;
            while(1)
            {
                h++;
                if(!porta.F4) goto bdd;
            }
        }
    }
}

void opcao_sensor1()
{
    i=0, h=0;
    while (i<600000)
    {
        if(porta.F4){
            h++;
            while(1){
                if(!porta.F4)goto bdd;}
            i++;
        }
        bdd:
        i++;
    }
}
```

```

    }
}

```

```

void opcao()
{
    if (portc.F2) x++, delay_ms(20);
    if (portc.F0) x--, delay_ms(20);
    if (x>64) x=64;
    if (x<1) x=1 ;
}

```

```

void grau ()
{
    temperatura = Adc_Read(0);
    if (temperatura>t) portc.F6=1; else portc.F6=0;
}

```

```

void main()
{

```

```

    int z=1, a=0, b=0, c=0;

```

```

    char *texto1[14];
    TRISB = 0;
    LCD_INIT(&PORTB);
    Lcd_Cmd(Lcd_CLEAR);
    Lcd_Cmd(Lcd_Cursor_Off);

```

```

    TRISC = 0x07;
    TRISD = 0X00;
    TRISA = 0X11;
    TRISE = 0X00;
    porte.f0=0x01;
    porta = 0x08;

```

```
lcd_out(1,1,"FL-MMLED");
Delay_ms(500);
Lcd_Cmd(Lcd_CLEAR);

while (1)
{
pulo02:
opcao();
z=x;
portd=0X0c;
WordToStr(z, texto1);
Lcd_Cmd(Lcd_CLEAR);
lcd_out(2,14,texto1);
grau();
WordToStr(temperatura, texto1);
lcd_out(1,15,texto1);
delay_ms(30);

if (portc.F1)
{
while(1) {
Lcd_Cmd(Lcd_CLEAR);
portd=0X00;
grau();
WordToStr(temperatura, texto1);
lcd_out(1,15,texto1);

switch (z)
{
case 1:
lcd_out(2,16,"DARK");
portd=0x00;
opcao_red();
opcao_sensor();
```

```
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(1,1,texto1);  
opcao_blue();  
opcao_sensor();  
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(1,8,texto1);  
opcao_green();  
opcao_sensor();  
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(2,1,texto1);  
opcao_clear();  
opcao_sensor();  
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(2,8,texto1);  
delay_ms(300);  
break;
```

case 2:

```
lcd_out(2,16,"LED1");  
portd=0x04;  
grau();  
opcao_red();  
opcao_sensor();  
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(1,1,texto1);  
grau();  
opcao_blue();  
opcao_sensor();  
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(1,8,texto1);  
grau();  
opcao_green();  
opcao_sensor();  
WordToStr(h, texto1);  
lcd_out(2,1,texto1);
```

```
    grau();
    opcao_clear();
    opcao_sensor();
    WordToStr(h, texto1);
    lcd_out(2,8,texto1);
    delay_ms(300);
    break;
case 3:
    lcd_out(2,16,"LED2");
    portd=0x08;
    grau();
    opcao_red();
    opcao_sensor1();
    WordToStr(h, texto1);
    lcd_out(1,1,texto1);
    grau();
    opcao_blue();
    opcao_sensor1();
    WordToStr(h, texto1);
    lcd_out(1,8,texto1);
    grau();
    opcao_green();
    opcao_sensor1();
    WordToStr(h, texto1);
    lcd_out(2,1,texto1);
    grau();
    opcao_clear();
    opcao_sensor1();
    WordToStr(h, texto1);
    lcd_out(2,8,texto1);
    delay_ms(300);
    break;
case 4:
    x=55;
```

```
while(1)
{
WordToStr(t, texto1);
lcd_out(2,1,texto1);
opcao();
t=x ;
delay_ms(100);
if (portc.F1)
{
x=1;
goto pulo02;
}
}
break;
case 5:
opcao_clear();
opcao_sensor1();
WordToStr(h, texto1);
lcd_out(2,8,texto1);
break;
}
grau();
if (portc.F0) goto pulo02; // vai para o inicio
if (portc.F2) goto pulo02;
}
}
}
```

ANEXO

A figura abaixo foi obtida por LAMOGLIA³⁷, nela tem-se um espectro de sensibilidade em cada filtro do detector TCS 230 usando-se um motor de passos, um monocromador e uma lâmpada de tungstênio.

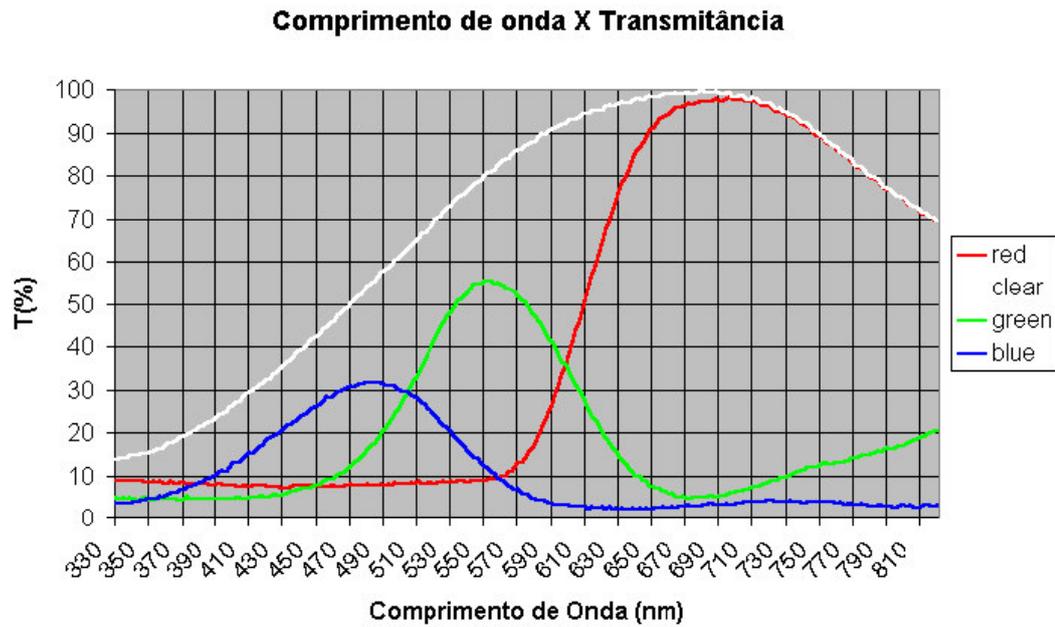


Figura Espectro de transmitância do detector TCS 230 para cada filtro do detector.