

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Dylan Frédéric Denizon

**SENSOR ÓTICO PORTÁTIL PARA DETEÇÃO
DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS**

Dissertação no âmbito do mestrado em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores com especialização em Robótica, Controlo e Inteligência Artificial orientada pelo Professor Doutor Lino José Forte Marques e apresentada no Departamento de Engenharia Eletrotécnica e de Computadores.

Setembro de 2023



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sensor Ótico Portátil para Detecção de Substâncias Químicas

Autor:

Dylan Frédéric DENIZON

Orientador:

Prof Dr. Lino José Forte MARQUES

*Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores*

no

Departamento de Engenharia Eletrotécnica e de Computadores

14 de setembro de 2023



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sensor Ótico Portátil para Detecção de Substâncias Químicas

Júri:

Prof Dr. Henrique Leonel GOMES

Prof Dr. Pedro Manuel Gens de Azevedo de Matos FAIA

Prof Dr. Lino José Forte MARQUES

*Tese apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores*

no

Departamento de Engenharia Eletrotécnica e de Computadores

14 de setembro de 2023

Resumo

A detecção e medição com precisão de substâncias químicas tem tornado-se cada vez mais importante em muitas aplicações, nomeadamente, na monitorização da qualidade da água, na detecção de explosivos, na medição de níveis de glucose em fluidos intersticiais ou até na segurança alimentar. No meio das múltiplas tecnologias existentes, as técnicas de detecção baseadas em fluorescência são tecnologias que apresentam resultados promissores, pois possuem elevada sensibilidade, especificidade e precisão.

O principal objetivo desta dissertação foi consequentemente o desenvolvimento de um sensor químico de fluorescência, que fosse portátil, com elevada resolução e com diferentes formas de comunicações, como a integração com robôs baseados em *Robotic Operating System* e de uma *interface web* por WiFi. Para atingir elevadas resoluções, este trabalho focou-se em comparar duas formas de *interfaces* optoeletrónicas, uma baseada na tecnologia dos conversores sigma-delta, e outra, baseada em amplificadores de transimpedância.

Para comparar as duas abordagens foram definidas duas métricas de comparação, o limiar de detecção e a sensibilidade relativa. Ambas as abordagens foram submetidas aos mesmos testes com concentrações diferentes de uma dada substância química, para obter a curva que caracteriza cada uma das abordagens e estimas assim a sensibilidade relativa e foram testados também na ausência de qualquer substância química para estimar o limiar de detecção.

Com base nos resultados obtidos dos vários teste, concluiu-se que a abordagem sigma-delta permitiu melhorar o limiar de detecção em aproximadamente 15 vezes relativamente à abordagem com amplificadores de transimpedância e permitiu estimar a sensibilidade relativa do sensor, o que não foi possível com a outra abordagem.

Em suma, este trabalho demonstrou que é possível desenvolver um sensor que fosse portátil, versátil, que usasse a fluorescência e correlacionar a sua resposta com a concentração de uma substância química alvo. Além de oferecer vantagens relativamente aos métodos tradicionais, nomeadamente uma maior resolução.

Palavras chaves: Sensor Ótico, Fluorescência, Sigma-Delta, ROS

Agradecimentos

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta dissertação se concretizasse.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer o meu orientador, o professor Doutor Lino Marques, por acreditar em mim e nas minhas capacidades ao longo dessa caminhada, por mostrar sempre disponibilidades para me apoiar, bem como pelo saber que me transmitiu.

Gostaria também de agradecer os meus colegas e amigos da empresa Matereo, por me oferecerem a oportunidade de trabalho que me permitiu alcançar o que sou hoje em dia e pelas experiências partilhadas.

E finalmente gostaria de agradecer a minha família e aos meus amigos, pelo vosso apoio e preocupação constante, pela vossa companhia e paciência, tanto nos bons como maus momentos.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

Conteúdo

Resumo	iii
Agradecimentos	v
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Estrutura do documento	4
2 Enquadramento teórico	5
2.1 Fluorescência	5
2.1.1 Princípios fundamentais	5
2.1.2 Transições energéticas	7
2.1.3 Características de emissão da fluorescência	9
2.1.4 <i>Quenching</i> da fluorescência	10
2.2 Sensores químicos de fluorescência	12
2.3 Progressos no desenvolvimento de sensores portáteis de fluorescência	13
2.3.1 Detecção de fitoplâncton	14
2.3.2 Detecção bioquímica	16
2.3.3 Microscópio de fluorescência baseado em <i>smartphones</i>	19
3 Protótipo do sensor	21
3.1 Condicionamento ótico	21
3.1.1 Material fluorescente	22
3.1.2 Componentes óticos	23
3.1.3 Câmara de amostragem	24
3.2 Condicionamento e aquisição de sinal	26
3.2.1 Amplificadores de transimpedância	27

3.2.2	Abordagem sigma-delta	28
3.3	Comunicação	31
4	Testes experimentais	35
4.1	Ambiente experimental	35
4.2	Procedimentos e experiências	36
4.2.1	Abordagem com amplificadores de transimpedância	38
4.2.2	Abordagem sigma delta	40
4.3	Discussão de resultados	42
5	Conclusões	45
5.1	Trabalhos futuros	46
A	Resultados obtidos para cada uma das configurações	49
	Bibliografia	59

Lista de Figuras

2.1	Espectro eletromagnético	6
2.2	Fluorescência da quinina na água tônica	7
2.3	Diagrama de Jablonski	8
2.4	Stokes shift	10
2.5	Medidor de toxina portátil para detetar microcistina e cilindrospermopsina	15
2.6	Sensor microfluídico portátil baseado em xurografia para deteção de algas verdes	16
2.7	Detetor de fluorescência de bolso para teste no local de atendimento usando um cartucho de papel	17
2.8	Dispositivo portátil de imagem de fluorescência	18
2.9	Microscópio de fluorescência baseado em <i>smartphone</i> para geração de imagens e deteção de esporos patogénicos em abelhas desenvolvido	19
3.1	Diagrama da arquitetura do sensor	22
3.2	Fotografia do polímero com excitação ultravioleta	23
3.3	Espectros de absorção e emissão do polímero	23
3.4	Espectros emissão do LED e do polímero	24
3.5	Desenhos da câmara de amostragem	25
3.6	Fotografia da câmara de amostragem quando exposta à luz ultravioleta	26
3.7	Circuito amplificador de transimpedância com fotodíodo em modo fotocondutor	27
3.8	Circuito do Modulador Sigma-Delta para um fotodíodo	29
3.9	Formas de ondas do modulador sigma-delta	29
3.11	Resolução do filtro digital em função do <i>oversampling ratio</i>	31
3.12	<i>Dashboard web</i>	32

3.13	Arquitetura micro-ROS	33
3.14	Resposta do agente ROS	34
3.15	Print da consola ROS	34
4.1	Diagrama do circuito do gás	35
4.2	fotografia da bancada de teste	36
4.3	Resultados para uma concentração média de aproximadamente 14.3% da abordagem tradicional	38
4.4	Estimação do ΔR em função da concentração relativa para a abordagem tradicional	39
4.5	Resposta sem contaminação do sensor, usando TIA, com média e desvio padrão	40
4.6	Resultados para uma concentração média de aproximadamente 14.3% da abordagem Sigma-Delta	41
4.7	Estimação do ΔR em função da concentração relativa para a abordagem sigma-delta	42
4.8	Resposta sem contaminação do sensor, usando $\Sigma\Delta$, com média e desvio padrão	42
5.1	Circuito do Modulador Sigma-Delta controlando a luz de excitação	46
A.1	Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação	49
A.2	Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 7.69%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação	50
A.3	Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 4%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação	51

- A.4 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 1.64%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação . 52
- A.5 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 23.8%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação . 53
- A.6 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação . 54
- A.7 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 7.66%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação 55
- A.8 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 4%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação 56
- A.9 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 1.64%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação . 57
- A.10 Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 6.25%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação . 58

Lista de Tabelas

4.1	Parâmetros calculados para cada concentração que caracterizam a resposta do sensor para a abordagem tradicional	39
4.2	Parâmetros calculados para cada concentração que caracterizam a resposta do sensor para a abordagem sigma-delta	40

Lista de Abreviaturas

ADC	Analog (to) Digital Converter
TIA	Transimpedance Amplifier
ROS	Robot Operating System
PET	Photoinduced Electron Transfer
LED	Light Emitting Diode
CNC	Computer Numerical Control
PMT	Photomultiplier Tube
APD	Avalanche Photodiode
PCD	Photon-Counting Detector
AFE	Analog Front-End
HAB	Harmful Algal Bloom
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
RNA	Ribonucleic Acid
CMOS	Complementary Metal-Oxide-Semiconductor
FOP	Fiber Optic Plate
NB	Nitrobenzeno
DNB	Dinitrobenzeno
TNT	Trinitrotolueno
$\Sigma\Delta$	Sigma-Delta
MOSFET	Metal-Oxide-Semiconductor Field Effect Transistor
USB	Universal Serial Bus
HTTP	Hypertext Transfer Protocol

Constantes Físicas

Velocidade da luz $c = 2.997\,924\,58 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$

Constante de Planck $h = 6.626\,070\,15 \times 10^{-34} \text{ J s}$

Capítulo 1

Introdução

A detecção de elementos e substâncias químicas, em líquidos e gases, é uma matéria de grande importância para o nosso dia-a-dia, e para a qual já lidamos com alguma normalidade. É o caso da detecção do oxigênio presente no sangue com recursos a *smartwatches*, a medição de concentração de dióxido de carbono no ar que respiramos ou mesmo a medição do pH (concentração de íons de hidrogênio) da água que bebemos.

A detecção química pode ser feita recorrendo a diversas tecnologias, sendo a detecção ótica, isto é, o uso da luz como método de detecção, uma das técnicas com maior desenvolvimento e com resultados mais promissores. Cada elemento químico tem uma resposta própria à luz, funcionando como uma espécie de impressão digital, que não sendo única é um fator diferenciador dos outros elementos. A detecção ótica consiste, portanto, em conseguir ligar a resposta do elemento ou substância química à luz com a sua concentração no meio.

Uma das principais vantagens da detecção ótica é a ampla gama de propriedades óticas que podem ser usadas para detecção. Essas propriedades incluem absorvância [1], índice de refração [2], difração [3], quimiluminescência [4], dispersão [5] entre outras. Cada uma dessas propriedades pode ser usada para detetar diferentes tipos de produtos químicos e biomoléculas e pode ser medida usando uma variedade de técnicas óticas, incluindo espectroscopia, microscopia ou em intensidade por meio de câmaras. Dentro das várias técnicas existentes para a detecção ótica, as técnicas baseadas em fluorescências são consideradas altamente úteis, em aplicações práticas, por possuírem elevada sensibilidade, especificidade e precisão relativamente as outras técnicas [6, 7].

Outra vantagem da detecção ótica é a capacidade de realizar detecção remota e não invasiva. Os sensores óticos podem ser projetados para detetar produtos químicos e biomoléculas em líquidos, gases e até mesmo em organismos vivos, sem a necessidade de contacto físico ou preparação de amostras. Isso torna os sensores óticos particularmente úteis para aplicações em que a acessibilidade ou portabilidade da amostra é uma preocupação.

Nos últimos anos, os avanços na microfabricação e na nanotecnologia permitiram o desenvolvimento de sensores óticos miniaturizados e portáteis [8], que podem ser integrados em dispositivos vestíveis, *smartphones* [9, 10] e outros dispositivos eletrónicos portáteis. Esses sensores permitem assegurar a medição em tempo real de poluentes ambientais, garantir a segurança alimentar e melhorar a saúde da população [11].

Os sensores baseados em fluorescência, são instrumentos que usam as propriedades da fluorescência como método de detecção e quantificação de uma substância química alvo e podem ser categorizados em vários tipos com base em qual parâmetro da fluorescência está a ser medido. A propriedade mais básica da fluorescência é a intensidade e pode ser usado como método de medição associando o seu valor a uma dada concentração. Outro exemplo de propriedade é o tempo de vida da fluorescência determinado pelo decaimento da intensidade de emissão, sendo um fator único para cada substância fluorescente.

No entanto, a intensidade emitida de fluorescência depende de vários parâmetros, como, por exemplo, o tipo e a intensidade da fonte de luz de excitação, o que requer que o sensor possui uma *interface* optoeletrónicas com elevada faixa dinâmica, uma vez que a corrente correspondente a intensidade de fluorescência obtida a saída de um fotodetector pode variar de alguns nanoamperes a alguns microamperes.

De modo geral, as *interfaces* optoeletrónicas mais comuns consistem em amplificadores de transimpedância [12]. Que são dispositivos que convertem a corrente em voltagem a partir de um elemento de transimpedância, nomeadamente uma resistência (R-TIA) e necessitam de um ADC para a digitalização da voltagem obtida. Os R-TIAs são dispositivos muito versáteis e podem ser encontrado em múltiplas aplicações, uma vez que possuem circuitos simples e apresentam um equilíbrio razoável

entre vários parâmetros-chave como ganho largura de banda, potencia, ruído, etc. No entanto, o ruído térmico gerado pela resistência de realimentação dificulta a sua aplicação em sistemas de baixo ruído. Por outro lado, dispositivos como moduladores sigma-delta podem ser utilizados diretamente para digitalizar o sinal e devido à propriedade de sobre amostragem, permitem atingirem elevadas gamas dinâmicas com alta resolução, mas para sinais com baixa largura de banda.

O uso de sensores químicos em plataformas robóticas autônomas para aplicações de nariz eletrônico ou a detecção química em geral tem ganho popularidade nos últimos anos. Com a ajuda de sensores químicos, os robôs móveis podem seguir rastros químicos deixados no solo, rastrear plumas químicas para encontrar as suas fontes e construir mapas de distribuição de substâncias químicas [13].

Em suma, a detecção ótica é uma tecnologia promissora para detecção de produtos químicos, com potencial para revolucionar a maneira como medimos e detetamos produtos químicos e biomoléculas em vários ambientes.

A motivação leva à seguinte questão:

Será possível desenvolver um sensor ótico que usa a fluorescência para detetar substâncias químicas, que seja portátil, versátil e com elevada resolução?

1.1 Objetivos

O principal objetivo desta dissertação é o desenvolvimento de um sensor químico de fluorescência, que seja portátil, com elevada resolução e de fácil utilização por um utilizador comum. No entanto, para atingir este objetivo será necessário ultrapassar os seguintes desafios: (1) o desenvolvimento de um *interface* opto-eletrónico mais preciso, que as técnicas atuais, para medições de fluorescência em estado estacionário, com objetivo de conseguir medir concentrações com maior resolução de um elemento químico alvo; (2) implementação de diferentes formas de comunicação com o sensor: (2.1) integração do sensor em robôs baseados em Robotic Operating System (ROS), para ser usado em aplicações como a detecção de explosivos por robôs autônomos e (2.2) implementação de uma *interface web* para a visualização dos dados em qualquer dispositivo gráfico possuindo *WiFi*.

1.2 Estrutura do documento

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. O capítulo 2 introduz os conceitos teóricos necessários para perceber os princípios-base da fluorescência e as suas propriedades para serem usadas como método de deteção e medição. Também foi apresentado uma revisão da literatura sobre a construção de sensores baseados na fluorescência, com objetivo em obter maiores resoluções e portabilidade, bem como alguns exemplos de aplicações práticas. O capítulo 3 apresenta a arquitetura do prototipo do sensor desenvolvido, explicando os diferentes módulos envolvidos e as técnicas usados nos seus desenvolvimentos. No capítulo 4, ambiente de testes experimental desenvolvido e o resultados dos vários testes são apresentados, bem como uma breve conclusão sobre os mesmos. Por fim, o capítulo 5, resume e conclui todo o trabalho realizado, bem como apresenta próximos trabalhos que podiam ser feitos.

Capítulo 2

Enquadramento teórico

Antes de abordar a metodologia usada na construção do sensor, este capítulo vem apresentar os princípios fundamentais da fluorescência e como pode ser usado como mecanismo de deteção, com um levantamento da literatura sobre o uso desse princípio para a construção de um sensor, bem como alguns exemplos, recentes, de aplicações praticas onde este tipo de sensores são usados.

2.1 Fluorescência

2.1.1 Princípios fundamentais

A fluorescência é um fenómeno de luminescência, que consiste na emissão de luz por uma substância quando submetida a um estímulo externo. (Para escrever esta secção, consultou-se principalmente o livro de Joseph R. Lakowicz sobre o princípio da espectroscopia de fluorescência [14].) A luminescência pode ser classificado segundo o meio pelo qual a energia de excitação é fornecida. Se essa energia for resultante de reações químicas é chamado de quimiluminescência, reações bioquímicas de bioluminescência, mediante oxidação/redução num eléctrodo de eletroquimioluminescência ou pela interação de fotões de radiação eletromagnética, com a matéria, de fotoluminescência.

A fotoluminescência, é um processo que acontece ao nível atómico ou molecular. Os átomos, que constituem a unidade básica da matéria, são constituídos por um núcleo rodeados por eletrões em diferentes níveis de energia ou camadas. Os eletrões no seu estado fundamental ocupam os níveis de energia mais baixos disponíveis, no entanto, quando um fotão de energia apropriada, é absorvido por uma

molécula, esta é estimulada e os seus eletrões livres passam para níveis de energia mais elevados ou em estados excitados, sendo este processo regido pelos princípios da mecânica quântica. Quando isso acontece, eles tornam-se instáveis, sendo um estado temporário, pois os eletrões preferem retornar ao seu estado fundamental de energia mais baixa devido à sua estabilidade inerente. A medida que relaxam de volta ao estado fundamental, o excesso de energia que ganharam durante a absorção é libertado em luz. Sendo essa emissão de luz que observamos na fluorescência.

Aquilo que normalmente se designa de fluorescência é um fenómeno de fotoluminescência, que engloba tanto a fluorescência quanto a fosforescência. A principal diferença entre os dois é a escala de tempo do processo de emissão. Na fluorescência, a emissão de luz é quase instantânea, ocorrendo dentro de nanossegundos a microssegundos após a excitação. Por outro lado, a fosforescência envolve um estado excitado mais longo, levando a uma emissão atrasada que pode durar de milissegundos a minutos, ou mesmo horas, sendo o processo utilizado nos objetos que brilham no escuro.

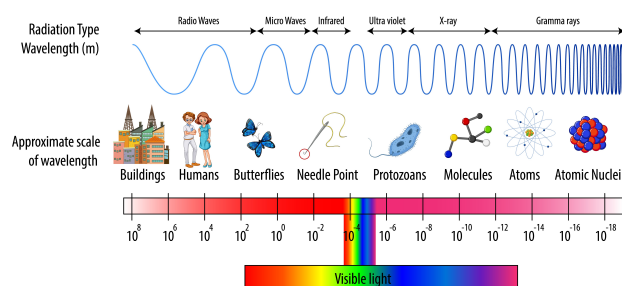


FIGURA 2.1: Comprimentos de onda do espectro eletromagnético comparado com os tamanhos físicos. ¹

A substância onde se realiza um fenómeno de fluorescência é chamada de fluoróforo. Existem duas classes principais de fluoróforos, os intrínsecos e os extrínsecos. Fluoróforos intrínsecos são aqueles que emitem luz naturalmente, já os extrínsecos são aqueles adicionados a amostras para desempenharem a função de sondas. Geralmente, os fluoróforos emitem luz geralmente em comprimentos de onda do espectro visível, ou seja, entre o infravermelho e o ultravioleta, tal como podemos observar na figura 2.1.

¹Fonte: https://img.freepik.com/free-vector/science-electromagnetic-spectrum-diagram_1308-57638.jpg?w=1480&t=st=1692981260~exp=1692981860~hmac=cbd807a5a087a8ae93e851a304dcaa9d573e131ff141d817cccd42501ed9728c

O fenômeno de fluorescência ocorre frequentemente em diversos compostos orgânicos com estrutura aromática, tais como a quinina, a fluoresceína, a rodamina, etc. A quinina, encontrada na água tônica, foi um dos primeiros fluoróforos estudados [15, 16] responsáveis por estimular o desenvolvimento dos primeiros espectrofluorímetros. A figura 2.2 mostra um exemplo de emissão da fluorescente pela quinina presente em água tônica, quando excitada por uma luz ultravioleta. Muitos fluoróforos são encontrados atualmente, nomeadamente, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, tais como o antraceno e o perileno, em proteínas o fluoróforo dominante é o grupo do triptofano que absorve próximo de 280 nm e emite próximo de 340 nm.

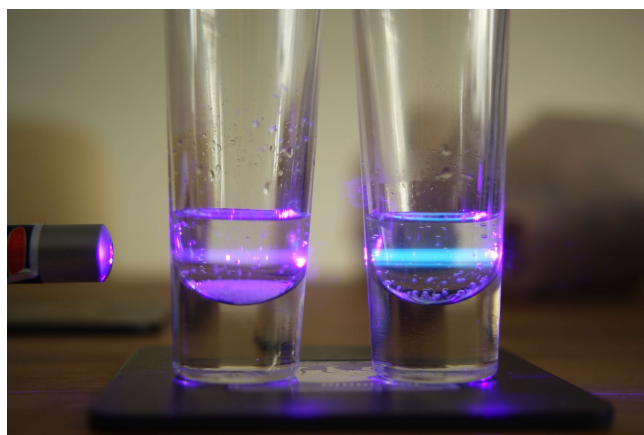


FIGURA 2.2: Quenching da Fluorescência da quinina da água tônica (direita) e da água tônica com sal de mesa (esquerda), com excitação de 411 nm. Fotografia realizada por Victor Claessen/ CC BY²

2.1.2 Transições energéticas

O diagrama de Jablonski, apresentado na figura 2.3, nomeado em homenagem ao professor Alexander Jablonski (1898-1980), considerado como o pai da espectroscopia de fluorescência, é uma ferramenta essencial para a descrição dos processos quânticos envolvidos na absorção e na emissão de luz, inerentes a processos de fluorescência e fosforescência [17].

Este diagrama consiste numa série de linhas horizontais que representam os diferentes níveis de energia de um fluoróforo. Esses níveis de energia incluem o estado

²Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Quenching_of_Quinine_fluorescence_by_chloride_ions.JPG

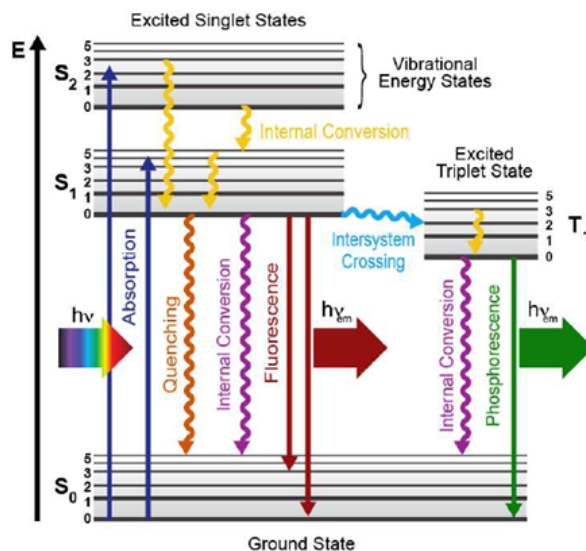


FIGURA 2.3: Diagrama de Jablonski simplificado sobre os processos de absorção, fluorescência, fosforescência e *quenching*³

fundamental (S_0) no nível de energia mais baixo e vários estados excitados (S_1 , S_2 , etc.) em níveis de energia mais altos. O diagrama também inclui subníveis energéticos vibracionais dentro de cada estado eletrônico.

O processo começa quando um fóton de energia apropriada é absorvido pelo fluoróforo. Essa energia é inversamente proporcional com o comprimento de onda do fóton e pode ser expressa pela equação 2.1, onde E é a energia, h a constante de Planck e λ o comprimento de onda.

$$E = h\lambda = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

Essa absorção promove um elétron do estado fundamental (S_0) para um estado excitado de energia mais alta, tipicamente o primeiro estado excitado singleto (S_1). Após a absorção, o fluoróforo está agora no estado excitado singleto (S_1). No entanto, muitas vezes este estado não é de longa duração, e o elétron rapidamente sofre relaxamento vibracional originando conversões internas dentro do estado excitado. Durante esse processo, o excesso de energia é dissipado como calor e o elétron transita para o nível vibracional mais baixo do estado excitado.

³Fonte: <https://www.simtrum.com/WebShop/SolutionInfo.aspx?id=1669>

Em alguns casos, o eletrão pode sofrer cruzamento intersistemas (*ISC*), um processo em que transita do estado excitado singlete (S_1) para um estado excitado tripleto (T_1). O estado tripleto tem eletrões de *spin* paralelo, o que o torna menos propenso a liberar energia como fóton de luz. O cruzamento intersistema é um processo com conversão de *spin* proibida, o que significa que é relativamente mais lento em comparação com as etapas anteriores.

Se o fluoróforo possuir um estado tripleto de longa duração, o eletrão pode permanecer no estado tripleto (T_1) por um período de tempo significativo antes de retornar ao estado fundamental. Quando o eletrão retorna ao estado fundamental do estado tripleto, ele emite um fóton, sendo este processo a fosforescência. Na maioria destes casos, o fluoróforo não possui um estado tripleto de longa duração. Em vez disso, o eletrão no estado singlete excitado (S_1) retorna rapidamente ao estado fundamental (S_0) por meio de um processo chamado fluorescência. Durante essa transição, o eletrão libera o excesso de energia que ganhou durante a absorção como um fóton (luz fluorescente) com comprimento de onda maior (menor energia) do que a luz absorvida.

2.1.3 Características de emissão da fluorescência

A partir do diagrama de Jablonski é possível observar que a energia de emissão é menor que a energia de absorção, ou seja, a fluorescência ocorre em energias menores ou comprimentos de onda maiores. Este fenómeno foi primeiramente observado por George. G. Stokes, sendo então a diferença entre o espectro de absorção e de emissão chamado *Stokes shift*, apresentado na figura 2.4, e a diferença de energia entre a excitação e a emissão é observada de maneira universal para todas as moléculas fluorescentes em solução. Outra propriedade da fluorescência é que o mesmo espectro de emissão pode ser observado para diferentes comprimentos de onda de excitação, conseqüentemente o espectro de emissão de um fluoróforo não é dependente do comprimento de onda da excitação.

O tempo de vida de fluorescência e o rendimento quântico são talvez as mais importantes características de um fluoróforo. O rendimento quântico é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, sendo que as substâncias com um grande rendimento quântico, aproximando-se da unidade, tais como a

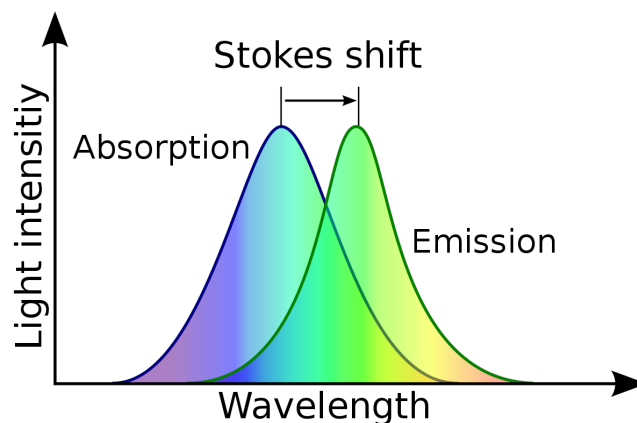


FIGURA 2.4: Apresentação do desvio de Stokes entre o espectro de emissão e absorção da fluorescência⁴

fluoresceína, apresentam uma emissão visivelmente brilhante. O tempo de vida determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir com ou difundir-se no meio, e assim disponibilizar a informação da sua emissão.

2.1.4 *Quenching* da fluorescência

O efeito de *quenching* refere-se à redução ou supressão da intensidade de fluorescência num fluoróforo devido à presença de certos fatores externos, ou interações. Quando um fluoróforo sofre *quenching*, ele emite menos fluorescência do que em condições normais. Existem vários mecanismos pelos quais esse fenómeno pode ocorrer, nomeadamente: *quenching* dinâmico e *quenching* estático.

O *quenching* dinâmico ocorre por meio de colisões entre o fluoróforo excitado e moléculas supressoras. Os supressores são tipicamente moléculas que podem aceitar energia do estado excitado do fluoróforo impedindo-o de emitir um fóton. Este processo efetivamente desativa o estado excitado e evita a emissão de fluorescência. Este processo geralmente não é radiativo, o que significa que a energia é dissipada como calor emitindo no infravermelho. O *quenching* colisional é um tipo de *quenching* dinâmico, onde o fluoróforo excitado colide diretamente com moléculas supressoras, transferindo energia para elas. A probabilidade de *quenching* colisional aumenta com concentrações mais altas de moléculas supressoras ou em pressões

⁴Fonte: https://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift#/media/File:Stokes_shift_diagram.svg

mais altas, onde as colisões são mais frequentes. Este tipo de supressão é normalmente encontrado em soluções ou ambientes com altas concentrações de supressores. Outro tipo de *Quenching* dinâmico é a transferência de elétrons fotoinduzida (PET), em que o fluoróforo e o supressor têm potenciais redox distintos. Durante a excitação, um elétron do fluoróforo é transferido para o supressor, desativando efetivamente o estado excitado. O *Quenching* de PET é frequentemente observado em sistemas onde o supressor tem uma afinidade eletrônica maior do que o fluoróforo.

O *quenching* estático envolve uma formação de complexo mais estável entre o fluoróforo e o supressor, mesmo antes de ocorrer a excitação. Neste cenário, o supressor e o fluoróforo ligam-se mutualmente de forma não covalente, formando um complexo de estado fundamental. Como resultado, o fluoróforo é incapaz de sofrer excitação e a sua fluorescência é extinta. A formação do complexo supressor-fluoróforo é reversível, e o fluoróforo ainda pode emitir fluorescência se o complexo se dissociar.

A distinção entre *quenching* dinâmica e estática é essencial porque elas têm efeitos diferentes na cinética da fluorescência e na relação entre a intensidade da fluorescência e a concentração do supressor. No *quenching* dinâmico, a intensidade da fluorescência diminui linearmente com o aumento da concentração do supressor, enquanto no *quenching* estático, a relação é mais complexa e pode seguir diferentes padrões.

De modo geral, para ambos os tipos de *quenching* a intensidade de fluorescência diminui com o aumento da concentração de moléculas supressores. Com base nesta propriedade é possível desenvolver então um sensor que consiga detetar a presença de uma determinada substância química, desenvolvendo um material fluorescente que reduz a sua intensidade de fluorescência na presença dessa substância. Por outro lado, com base no tipo de *quenching* é possível relacionar a diminuição da fluorescência com o número de moléculas supressores e conseqüentemente estimar a sua concentração.

2.2 Sensores químicos de fluorescência

A fim de desenvolver um sistema que usa a fluorescência para detetar substâncias químicas, mantendo todos os benefícios que os instrumentos de laboratório oferecem, as peças que ocupam maior volume e que consomem mais energia, precisam de ser substituídos por componentes alternativos mais compactos.

Em geral, os sistemas de sensores de fluorescência são compostos por três módulos essenciais: (1) uma fonte de luz de excitação, com emissão monocromática, (2) uma câmara de amostragem e (3) um detetor da radiação emitida por fluorescência. Alguns componentes adicionais normalmente utilizados são: um filtro ótico, para separar a luz de excitação da luz emitida por fluorescência, e fibras óticas, para guiar a luz da fonte para a sonda e da sonda para o detetor [18].

Para a fonte de luz de excitação, os instrumentos de bancada, como os espectrómetros, tipicamente usam lâmpadas de arco ou de incandescência, que permitem a emissão de radiação numa ampla gama de comprimentos de onda, indo do ultravioleta até ao infravermelho, combinados com monocromadores para seleccionar comprimentos de onda específicos de excitação. A seleção do comprimento de onda de excitação e de emissão pode ser feita usando dispositivos óticos mais compactos como os filtros dicróicos, filtros passa banda ou filtros de cores em vez do uso de monocromadores. Estas fontes de luz de excitação podem ser substituídas por fontes mais compactas e com menor consumo energético, como os díodos emissores de luz, (LEDs) ou os díodos laser, que são dispositivos mais compactos, mais baratos e com comprimentos de onda específicos.

A câmara de amostragem é onde o analito é colocado e pode apresentar diferentes formas, como cuvete ou canal microfluídico. Este elemento ajuda a suportar a parte ótica do sensor e a sua integração com os sistemas mecânicos. Estes tipos de componentes são normalmente caros e podem ser difíceis de implementar com técnicas de fabricação mais comuns, por exemplo, CNC e moldagem. Os avanços nas tecnologias de impressão 3D têm permitindo a prototipagem mais rápida e fácil de projetos mecânicos e óticos complexos a custos mais acessíveis.

No caso dos detetores, os em equipamento de laboratório mais usados têm sido tubos fotomultiplicadores, (PMTs), pois possuem elevada sensibilidade e baixo ruído.

No entanto, devido ao tamanho e requisitos de energia dos PMTs, eles não são adequados para aplicações portáteis. Em alternativa, dispositivos como fotodíodos [18, 19], fotodíodos de avalanche, (APDs) [20] ou detetores baseados em contagem de fótons, (PCDs) [11, 21] tem sido usados em sensores fluorescentes portáteis, uma vez que esses detetores apresentam dimensões reduzidas, baixa potência e sensibilidade semelhante aos PMTs. Assim, a escolha do detetor dependerá da aplicação específica e dos requisitos do sensor.

Tipicamente, a *interface* optoeletrônica com o detetor consiste num amplificador, alguma filtragem e um conversor analógico para digital, (ADC). Sendo a sua escolha crítica para obter o melhor desempenho do sistema, dado que cada *interface* apresenta compromissos em termos de largura de banda, ruído, impedância de entrada, potência, entre outros.

Tipicamente, para fazer *interface* com o detetor, o *front-end* analógico (AFE) consiste num amplificador, alguma filtragem e um conversor analógico-digital (ADC). Geralmente, no AFE para deteção de corrente, a saída do detetor é convertida em tensão usando circuitos como: amplificadores de transimpedância (TIA), conversores de corrente para frequência (I-to-F), ou usando *interfaces* com circuitos de modo corrente, circuitos em que as variáveis de estado são apenas correntes, para evitar a necessidade de um elemento de transimpedância. Sendo os circuito mais comuns os transportadores de corrente e os moduladores sigma-delta. Cada um desses *front-ends* apresenta uma constelação de compromissos, incluindo largura de banda, ruído, potência e impedância de entrada, entre outros [22]. Escolhendo e projetando o circuito de leitura de forma apropriada é fundamental para alcançar alto desempenho de qualquer sensor.

2.3 Progressos no desenvolvimento de sensores portáteis de fluorescência

Sensores bioquímicos portáteis encontram uma ampla variedade de aplicações em diversas áreas, tais como monitorização ambiental [23], diagnóstico de doenças [24], descoberta de medicamentos [25] e controle da qualidade dos alimentos [26]. Entre os sensores bioquímicos portáteis, os que utilizam fluorescência são especialmente

reconhecidos por suas vantagens significativas relativamente a outros métodos. Eles apresentam alta sensibilidade, alta seletividade, resposta rápida e operação simples [27]. Ao contrário das técnicas colorimétricas ou baseadas em absorbância, a fluorescência é medida diretamente, sem a necessidade de comparação com um feixe de referência. Por esse motivo, a detecção baseada em fluorescência é frequentemente preferida em aplicações de campo, onde apenas pequenas quantidades de amostras bioquímicas estão disponíveis, apresentando a seguir alguns exemplos recentes de aplicações usando a tecnologia de fluorescência.

2.3.1 Detecção de fitoplâncton

A monitorização de fitoplâncton é uma das tarefas importantes para apoiar a saúde humana e questões ambientais, especialmente para o controlo da qualidade da água. Detetar e analisar diferentes grupos de fitoplâncton permite obter informações importantes sobre os estados ecológicos marinhos e a sua composições em nutrientes [28]. Além disso, a detecção precoce de certas espécies de algas que causam proliferação de algas nocivas (HABs) permite proteger os ecossistemas marinhos e a saúde humana [29, 30]. Existem várias formas de detetar e analisar espécies de fitoplâncton, nomeadamente microscopia [31], citometria de fluxo [32], cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [33], espectrofotometria [34–36], espectrometria [37–39] e medição de peso a seco de algas [40, 41]. No entanto, esses métodos são difíceis de ser aplicado num sistema de detecção portátil.

Bickman *et al.* criaram um dispositivo portátil capaz de detetar biotoxinas marinhas (microcistina e cilindrospermopsina) libertadas por cianobactérias, apresentado na figura 2.5. Esse dispositivo utiliza a tecnologia de multiplexagem de imunoensaio de fluorescência [42], tornando a detecção das toxinas libertadas pelas florações de algas nocivas (HAB) mais precisa e direta do que usando os métodos convencionais de detecção indireta.

Este dispositivo usa um díodo laser de 639 *nm* acoplado a um guia de ondas de luz de plástico, permitindo a distribuição uniforme e projeção de luz de excitação sobre o substrato que contém a amostra. O sistema utiliza um cartucho descartável simples, pré-revestido com anticorpos, para detetar as toxinas na amostra recolhida.

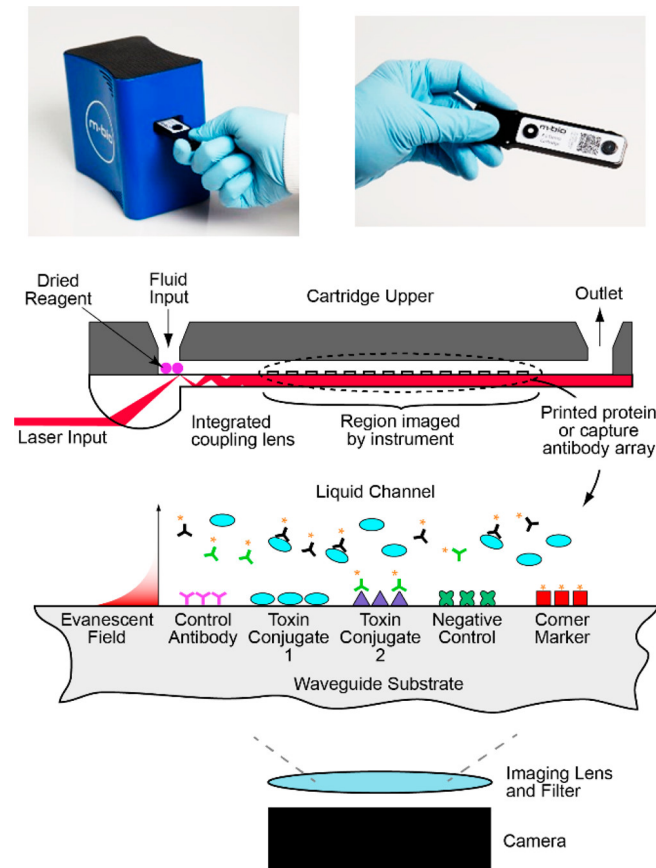


FIGURA 2.5: Medidor de toxina portátil para detetar microcistina e cilindrospermopsina desenvolvido por Bickman *et al* [42]

Quando as toxinas estão presentes, ocorre a inibição da ligação dos pontos de conjugados de biotoxina na superfície do cartucho, resultando numa redução do sinal de fluorescência. Uma câmara analisa toda a superfície do microarray para detetar a emissão de fluorescência. Os limites de deteção alcançados foram de $0,4 \text{ ppb}$ (partes por biliões) para microcistina e $0,7 \text{ ppb}$ para cilindrospermopsina. Isso representa um importante avanço na deteção rápida e eficiente dessas toxinas em ambientes marinhos.

Gosset *et al.* desenvolveram um biosensor microfluídico portátil baseado em xurografia, técnica de microfabricação, para detetar algas verdes através da medição da fluorescência total de clorofila-a [43]. Esse sensor, apresentado na figura 2.6, utiliza um LED com comprimento de onda de pico de 470 nm como fonte de excitação. Componentes óticos, como lentes colimadores e difusores, são colocados sob o LED para distribuir uniformemente a luz. O dispositivo emprega um chip microfluídico descartável, composto por dois vidros deslizando e um filme adesivo com $100 \mu\text{m}$

de espessura, para conduzir a amostra de microalgas ao sensor. O chip possui duas câmaras para a leitura, uma de controle e outra de medição do alvo de interesse.

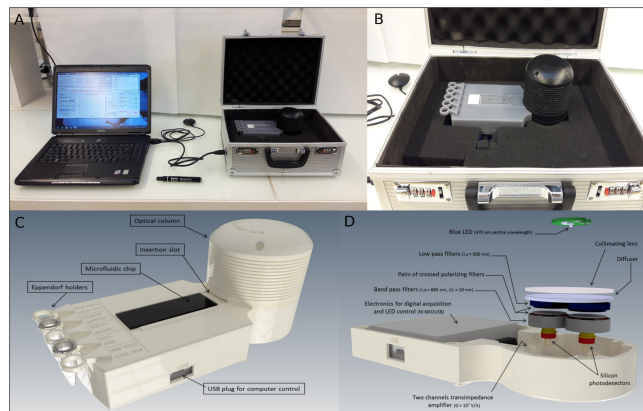


FIGURA 2.6: Sensor microfluídico portátil baseado em xurografia para deteção de algas verdes desenvolvido por Gosset *et al* [43]

Foram realizados experiências utilizando diferentes concentrações de soluções de herbicida misturadas com as amostras de algas, a fim de analisar a relação entre as mudanças de intensidade de fluorescência e a taxa de perturbação da fotossíntese das amostras. O sensor de fluorescência portátil foi demonstrado com sucesso usando três espécies diferentes de microalgas em combinação com a solução herbicida. O limite de deteção para medição de microalgas foi de 1 *ppb*.

Embora o uso desses fluorômetros tenha sido demonstrado com êxito para a deteção de fitoplâncton, ainda existem limitações, nomeadamente: a distinção simultânea de várias espécies de fitoplâncton, uma vez que os sinais de fluorescência dessas espécies frequentemente se sobrepõem e interferem uns com os outros. Além disso, a matéria orgânica dissolvida na água torna-se outra fonte de ruído que pode afetar a precisão das medições.

2.3.2 Deteção bioquímica

O desenvolvimento de novos fluoróforos ampliou significativamente as possibilidades de deteção sensível de diversas moléculas bioquímicas. Por exemplo, sondas fluorescentes no infravermelho próximo e distante têm sido amplamente utilizadas em bioimagem devido ao mínimo efeito de fotobranqueamento, alta profundidade

de penetração e baixa autofluorescência por biomoléculas [44, 45]. Além disso, alguns investigadores, como Wang et al., desenvolveram sondas fluorescentes baseadas em rodamina com diferentes cores e maior permeabilidade celular [46]. Halabi et al. também relataram um novo tipo de fluoróforo com capacidade de modular as suas propriedades em função da luz, permitindo a realização de experiências de microscopia de elevada resolução em longos períodos temporais [47].

Katzmeier *et al.* criaram um dispositivo portátil de detecção de fluorescência para realização de testes no ponto de atendimento, utilizando um cartucho de papel para entrega da amostra [48]. O dispositivo, apresentado na figura 2.7, consiste em duas partes: uma unidade de detecção e um cartucho de ensaio. A unidade de detecção contém uma fonte de luz de excitação e um fotodetector, enquanto o cartucho de ensaio é equipado com filtros óticos, uma tira de papel e uma moldura impressa em 3D que abriga todos os componentes.

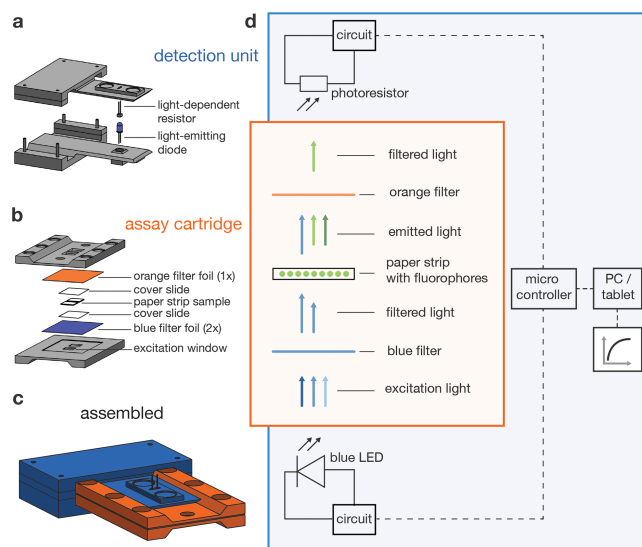


FIGURA 2.7: Detetor de fluorescência de bolso para teste no local de atendimento usando um cartucho de papel desenvolvido por Katzmeier *et al* [48]

Uma fonte de luz LED com pico de comprimento de onda de 466 nm foi utilizada para a excitação da amostra. Para garantir um comprimento de onda de excitação mais estreito, um filtro azul fino com pico de 440 nm foi colocado sobre o LED. A amostra de teste de papel foi posicionada entre duas tampas de vidro de lâmina, mantendo as amostras sobre o filtro de excitação para estimulação direta do fluoróforo. Um filtro laranja de passagem alta (700 nm) foi colocado sobre a tampa superior

de vidro para bloquear a luz difusa, permitindo apenas a passagem da emissão de fluorescência da amostra. Para medir a emissão de fluorescência da tira de papel, foi usado uma fotorresistência de sulfureto de cádmio (CdS). Numa demonstração, o ensaio de fluorescência baseado em no guia de RNA, Cas13a, foi utilizado para detetar RNA alvo. O limite de detecção relatado para esse método foi de 3.7 nM .

Sasagawa *et al* [49] apresentou um dispositivo portátil de imagem de fluorescência, apresentado na figura 2.8, sem o uso de lentes, o qual utiliza múltiplas camadas de filtros de interferência. O sensor de imagem CMOS, com uma dimensão de 67 mm^2 , foi escolhido para proporcionar uma grande área de imagem. Diversos componentes óticos foram cuidadosamente dispostos em camadas diretamente sobre o sensor de imagem, com o propósito de alterar o plano focal e bloquear a luz de excitação.

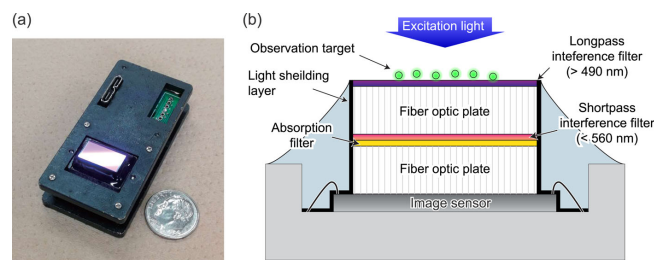


FIGURA 2.8: Sensor desenvolvido por Sasagawa *et al* [49]

Primeiramente, uma placa de fibra ótica (FOP) de 2.54 mm de espessura foi posicionada imediatamente acima do sensor de imagem. Dois filtros óticos foram inseridos, sendo um filtro de absorção (que permite passar comprimentos de onda acima de 500 nm) e um filtro de interferência passa baixo (que permite passar comprimentos de onda inferiores a 560 nm), visando bloquear as luzes dispersas e espalhadas durante a excitação com 448 nm . Outra FOP com um filtro de interferência de passe alto ($> 490 \text{ nm}$) foi colocada diretamente sobre a primeira FOP, dessa forma bloqueando o raio de excitação e a autofluorescência. Uma amostra pode ser carregada diretamente na parte superior da superfície da FOP. Para demonstrar a eficácia do dispositivo, foram obtidas imagens de fluorescência de um cérebro fatiado de um rato, manchado com um corante fluorescente verde com emissão em 515 nm .

2.3.3 Microscópio de fluorescência baseado em *smartphones*

A microscopia de fluorescência é uma técnica que consiste em observar imagens a níveis microscópicos da fluorescência, sendo altamente eficaz na biociência, porém, a sua aplicação é frequentemente dificultada pela complexidade e tamanho dos instrumentos tradicionais. Recentemente, tem sido usados os *smartphones* em aplicações de monitorização remota, devido à presença de múltiplos sensores integrados e módulos de comunicação. Além disso, os *smartphones* têm apresentado avanços em termos de qualidade de imagem e poder de processamento, possibilitando o desenvolvimento de microscópios de fluorescência compactos para aplicações analíticas em campo. Wei *et al.* [50] demonstrou um microscópio de fluorescência baseado em *smartphone*, capaz de detetar bactérias individuais. Esta deteção foi complementada com algoritmos avançados de processamento de imagem, como *machine learning* e técnicas de *deep learning*, para aprimorar a precisão de deteção [51, 52].

Snow *et al.* [53] implementaram um microscópio de fluorescência baseado em *smartphone*, apresentado na figura 2.9, visando gerar imagens e detetar esporos patogénicos em abelhas. Este sistema usou um fonte de excitação, baseada em quatro LEDs ultravioleta (com comprimento de onda específico não mencionado). Em frente a lente da câmara foi usado um filtro que deixa passar radiação com comprimento de onda superior a 460nm e uma lente ótica simples para reduzir o ruído da luz de excitação.

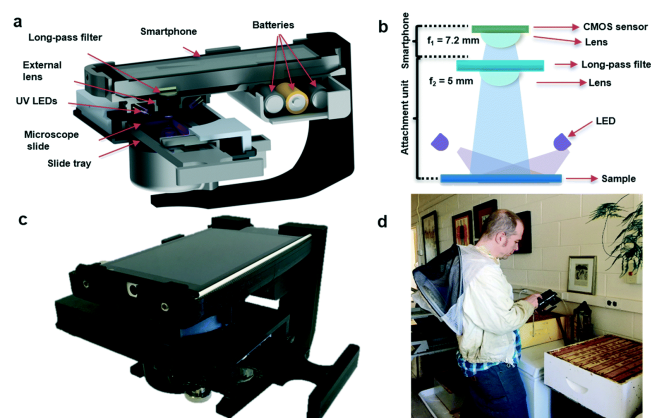


FIGURA 2.9: Microscópio de fluorescência baseado em *smartphone* para geração de imagens e deteção de esporos patogénicos em abelhas desenvolvido por Snow *et al* [53]

Para realizar a análise da amostra, utilizou-se uma lâmina de vidro microscópica

padrão, que foi facilmente inserida num suporte de slide impresso em 3D. Para a preparação, a amostra foi preparada com tecidos do intestino médio de abelhas foram com um corante fluorescente para a deteção dos esporos. Adicionalmente foi desenvolvido um aplicativo para *smartphone* que permite enviar as imagens capturadas para um servidor central para processamento posterior. O limite de deteção alcançado foi de $0,5 \times 10^6$ esporos por abelha, o que representou uma importante contribuição para a deteção rápida e eficiente de esporos patogénicos em populações de abelhas.

Capítulo 3

Protótipo do sensor

Com base nos princípios fundamentais explicados nos capítulos anteriores, este capítulo apresenta uma proposta de protótipo de um sensor de fluorescência para a detecção de substâncias químicas, que consiste essencialmente em três partes:

- Condicionamento ótico
- Condicionamento e aquisição de sinal
- Comunicação

De modo genérico, o protótipo do sensor foi desenhado para ser versátil, isto é, poder modificar qual a substância química em análise, alterando apenas o material fluorescente, sem ter que trocar toda a arquitetura do sensor ou ter que usar um sensor novo. Por outro lado, uma vez que um dos objetivos era conseguir desenvolver um sensor que consiga resoluções maiores que as técnicas tradicionais, duas abordagens diferentes de condicionamento e aquisição de sinal foram desenvolvidas, uma mais comum e outra que oferece maiores resolução de medição. A figura 3.1 apresenta o diagrama da arquitetura escolhida para o sensor.

3.1 Condicionamento ótico

O condicionamento ótico neste sensor é a parte responsável por converter uma propriedade química de um determinado gás, neste caso a concentração, numa variação ótica para ser transformada num sinal elétrico.

Para isso, o sensor irá conter um material fluorescente que reduz a sua intensidade luminosa na presença da substância química desejada, uma fonte de luz de

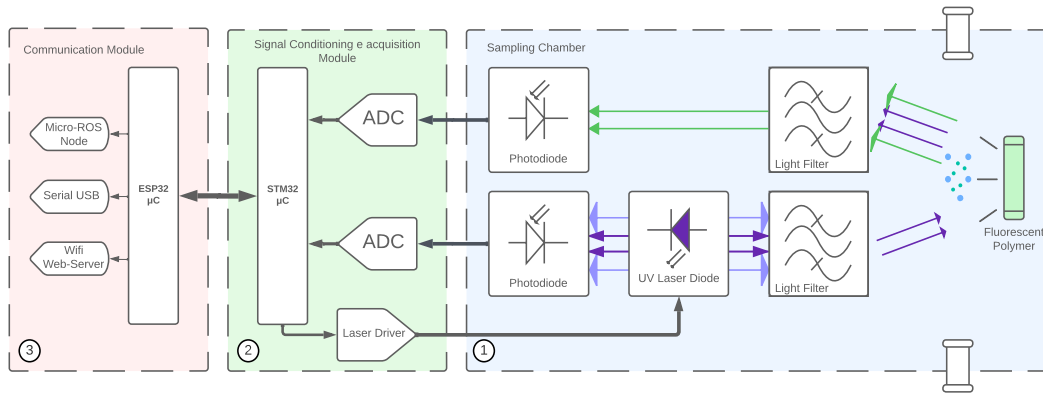


FIGURA 3.1: Diagrama da arquitetura do sensor

excitação, filtros óticos para separar a luz de excitação da de emissão e fotodíodos para monitorizar a intensidade emitida pela luz de excitação e de fluorescência. Ficando tudo contido numa câmara de amostragem. Foi escolhida uma abordagem monitorizando tanto a luz de excitação com a emitida pelo material fluorescente, para poder obter o rácio entre as duas e assim obter resultados imunes a variações de intensidade de excitação, que podem ocorrer com variações de temperatura e com o envelhecimento do LED, que podem alterar a potência emitida da luz de excitação e consequentemente alterar a luz emitida de volta pelo material fluorescente.

3.1.1 Material fluorescente

O material fluorescente usado, nesta dissertação, foi um polímero de etilcelulose, apresentado na fotografia da figura 3.2, que foi desenvolvido para o trabalho publicado no artigo da M. Martelo *et al* [54].

Este material foi criado com objetivo em realizar *quenching* da sua fluorescência na presença vapores de nitrobenzeno (NB) e 1,3-dinitrobenzeno (DNB) que são gases libertados em explosivos mais comuns como o Trinitrotolueno (TNT), uma vez que o foco do trabalho era o desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para a deteção de explosivos, consequentemente, este sensor foi dimensionado e testado para detetar a presença de vapores de nitrobenzeno no ar.

Para poder caracterizar a resposta ótica do polímero e consequentemente dimensionar o resto dos componentes óticos do sensor, obtivemos os espectros de absorção e emissão com e sem presença de nitrobenzeno, que estão apresentados na figura 3.3

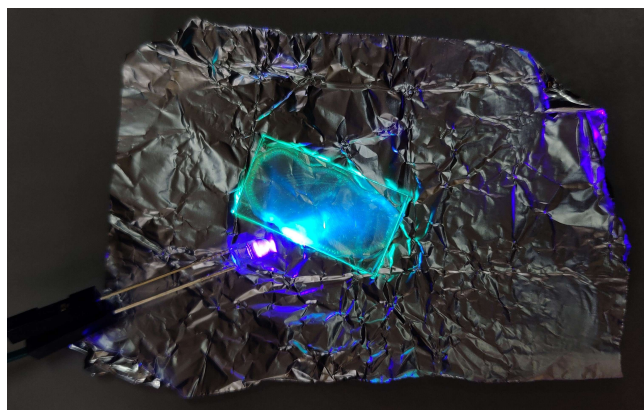


FIGURA 3.2: Fotografia do polímero com excitação ultravioleta com comprimento de 405 nm

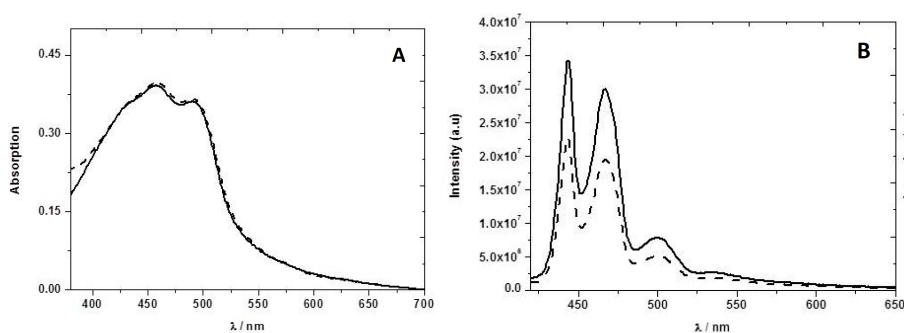


FIGURA 3.3: Espectro de absorção (A), e de emissão (B), do polímero com presença (linha tracejada) e sem presença (linha contínua) de vapores de nitrobenzeno

3.1.2 Componentes óticos

Com base nos espectros de absorção e de emissão do polímero, a luz de excitação escolhida foi um LED ultravioleta da Bivar, UV3TZ-405-30, com comprimento de onda de emissão em 405 nm e largura de banda esperada de 35 nm, figura 3.4a, permitindo assim separar a luz de emissão do polímero com a de excitação usando um filtro ótico, com referência 62975 da Edmund Optics, passa alto com comprimento de onda de corte em 450 nm, para poder detectar o máximo possível de luz emitida pela fluorescência havendo o mínimo de sobreposição entre os dois espectros e consequentemente perdas na medição.

Como era expectável, o espectro de emissão do LED não é constante e necessita de ser filtrado, pois possui uma largura de banda que aumenta com a potência de luz emitida, para isso, na luz de excitação, usamos um filtro ótico, com referência 65072

da Edmund Optics, passa banda com comprimento de onda de corte em 400 nm e largura de 25 nm , para eliminar os comprimentos de onda maiores que 425 nm deixando assim margem até os 450 nm , que é onde começa o espectro de emissão da fluorescência, uma vez que os filtros também não são perfeitos, o que se pode observar com os espectros, de emissão do LED, com e sem filtro ótico, da figura 3.4a.

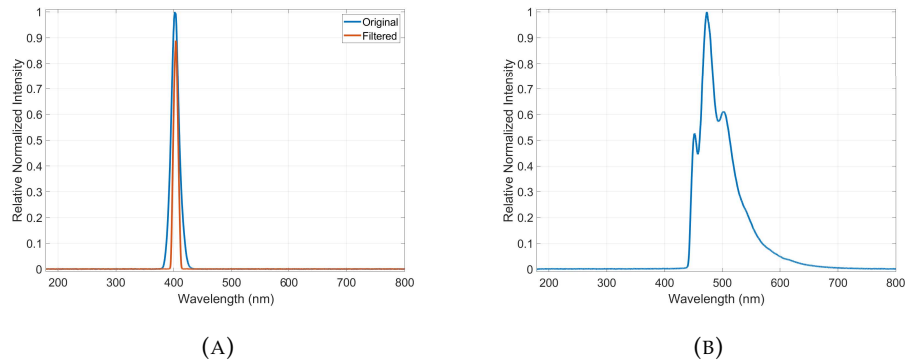


FIGURA 3.4: Espectro de emissão original (azul), filtrado (laranja), do LED ultravioleta de excitação (A), e espectro de emissão final do material fluorescente após as várias filtragens (B)

O espectro de emissão final, do material fluorescente, resultante das várias filtragens efetuadas na luz de excitação e na luz de emissão está apresentado na figura 3.4b.

Com base nos espectros finais da luz de emissão e de excitação, os fotodíodos escolhidos para converter a intensidade luminosa recebida em corrente elétrica, foram o BPW34-B e o PDB-C134, respetivamente, que são fotodíodos de silício, mas com maior sensibilidade na zona azul do espectro do que os mais comuns.

3.1.3 Câmara de amostragem

A câmara de amostragem, é o elemento físico por onde circula o gás a analisar e é onde é colocado o material fluorescente, servindo de base fundamental para a ótica do sensor. Ela foi projetada para ser compacta, uma vez que o tempo de resposta aumenta com o volume da câmara, e versátil para poder trocar facilmente o material fluorescente e consequentemente a substância química em análise.

Durante o decorrer deste trabalho o desenho da câmara de amostragem sofreu alterações com objetivo a melhorar o rendimento ótico do sensor, o desenho inicial e

final da câmara podem ser observados na figura 3.5, inicialmente a câmara foi desenhada com a forma de um prisma triangular retangular, que possuía uma tampa no seu topo onde podia ser inserido e removido com facilidade o material fluorescente, mas devido a esta configuração, o desenho obrigava à utilização de múltiplos circuitos separados o que não era muito compacto e era necessário desmontar o sensor de cada vez que era preciso alterar algum componente ótico, por exemplo, os filtros. Por outro lado, a versão final da câmara de amostragem foi desenhada com o aspeto de um paralelepípedo, estando os componentes eletrónicos todos apenas num circuito, e apresenta uma arquitetura mais versátil, isto é, permite a modificação de peças óticas sem ter que desmontar nada.

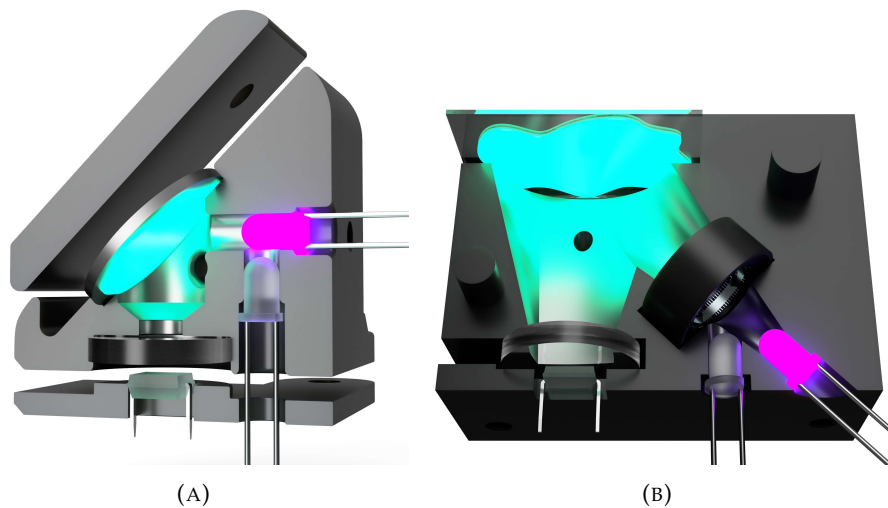


FIGURA 3.5: Desenho inicial (A) e final (B), da câmara de amostragem

A fabricação da câmara de amostragem foi realizada recorrendo a impressoras 3D de resinas que é uma tecnologia que apresenta diversas vantagens relativamente às mais comuns de filamento, nomeadamente possui precisão micrométrica e permite realizar prototipagem rápida, mas no caso deste sensor possui uma grande desvantagem que é o seu funcionamento, isto é, as resinas são fotopolímeros que se encontram, inicialmente, em estado líquido e para construir um objeto, a impressora vai curar, ou seja, solidificar, a resina com luz ultravioleta, de comprimento de onda por volta dos 400 nm , camada a camada até atingir o formato desejado do objeto, uma vez que a luz de excitação do sensor possui comprimento de onda de 405 nm , isto implica que grande parte dessa luz irá ser absorvida pela câmara de amostragem

e não pelo material fluorescente. Para colmatar este problema, o interior da câmara foi revestido com uma tinta refletora que diminui significativamente a absorção da radiação pela câmara como pode ser observado na figura 3.6.

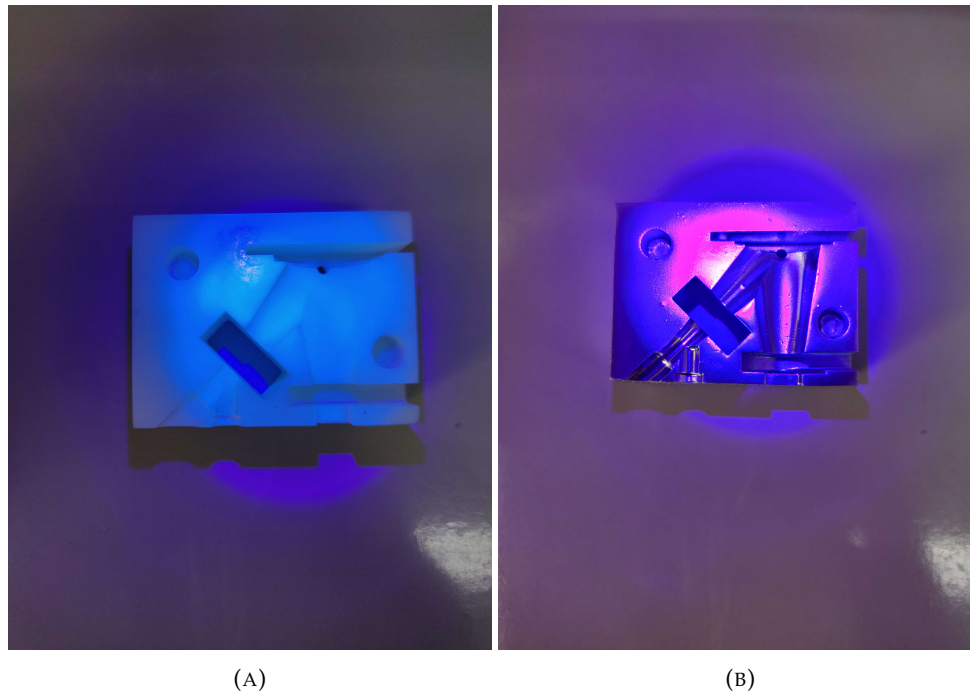


FIGURA 3.6: Fotografia da câmara de amostragem sem tinta refletora (A) e com tinta refletora (B) quando exposta à luz ultravioleta

3.2 Condicionamento e aquisição de sinal

A parte de condicionamento e aquisição de sinal corresponde às operações necessárias a efetuar ao sinal proveniente dos fotodíodos, como, por exemplo, filtragem e amplificação, para que este esteja em condições de ser digitalizado e a sua digitalização propriamente dita.

Para este projeto, foram estudadas duas abordagens diferentes de condicionamento e aquisição de sinal, uma abordagem mais tradicional usando amplificadores de transimpedância (TIA) e um ADC de aproximações sucessivas de 12 bits de um microcontrolador e outra abordagem mais inovadora, usando a tecnologia sigma-delta, visando uma digitalização do sinal proveniente dos fotodíodos com maior resolução.

3.2.1 Amplificadores de transimpedância

A abordagem tradicional implementada com amplificadores de transimpedância, que são, de modo geral, circuitos bastantes simples, para amplificar as correntes provenientes dos fotodíodos, que são proporcionais a intensidade luminosa recebida, convertendo-as em tensões para serem medidas por um ADC.

Para este trabalho o fotodíodo foi ligado ao amplificador em modo fotocondutor, como pode ser observado no circuito da figura 3.7, isto é, a exposição a luz irá gerar uma corrente inversa, I_{PD} , no fotodíodo que irá causar uma tensão positiva com ganho proporcional à resistência de realimentação, R_F , a saída do amplificador, $V_{OUT} = I_{PD}R_F$, esta configuração foi escolhida, pois o amplificador operacional irá ser alimentado com tensões positivas e não simétricas, uma vez que o ADC usado para digitalizar a tensão a saída do amplificador é de um microcontrolador com uma gama de 0V a 3.3V.

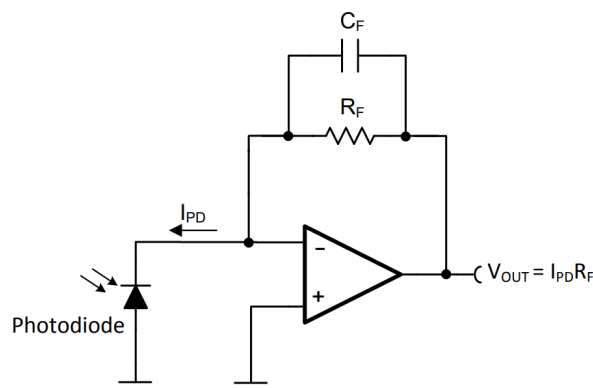


FIGURA 3.7: Circuito amplificador de transimpedância com fotodíodo em modo fotocondutor

A maioria dos circuitos de TIA para fotodíodos contém na sua malha de realimentação um condensador, C_F , necessário para manter estabilidade introduzindo um polo no sistema para compensar o zero introduzido pela capacitância do fotodíodo, limitando, por outro lado, a largura de banda de amplificação, ou seja, atua como filtro passa baixo. Uma vez que para este trabalho estamos apenas interessados em analisar sinais em modo contínuo, com frequência próxima de 0Hz, iremos usar um valor alto no condensador de realimentação, evitando assim os problemas de estabilidade produzidos pelos sinais de alta frequência.

De modo geral, para evitar a saturação do amplificador na sua alimentação negativa, quando há ausência de corrente no fotodíodo, aplica-se uma tensão de offset no terminal positivo do AmpOp, o que resolve o problema da saturação, mas tem como desvantagem a diminuição da gama disponível para medições. No caso deste sensor, estamos interessados em medir pequenas variações numa fonte luminosa que estará sempre a emitir, podemos considerar então que a corrente no fotodíodo terá sempre um valor elevado, não sendo então necessário aplicar uma tensão de offset no terminal positivo do AmpOp. Para poder aproveitar ao máximo a gama de medições do ADC, R_F será dimensionado, usando a equação 3.1, para que a tensão a saída do amplificador não ultrapasse os 3.3V quando a corrente é máxima no fotodíodo.

$$\frac{V_{OUT(MAX)} - V_{OUT(MIN)}}{I_{PD(MAX)}} = \frac{3.3V - 0V}{I_{PD(MAX)}} = R_F \quad (3.1)$$

Como mencionado anteriormente, a digitalização da tensão a saída dos amplificadores será realizada usando os ADCs de um microcontrolador, neste caso prático de um STM32, que possuem 12 bits de resolução, ou seja, será teoricamente possível detetar alterações com aproximadamente $806\mu V$ de diferença, mesmo se este valor poderia ser melhorado realizando *oversampling*, isto é, amostrar o sinal com frequências muito maiores que a frequência de Nyquist para aumentar o número de bits efetivos da digitalização realizada.

3.2.2 Abordagem sigma-delta

O modulador sigma delta ($\Sigma\Delta$) é um tipo de ADC que faz uso das técnicas de *oversampling* e *noise shaping* para realizar conversões com elevada resolução e precisão. Esta abordagem, usa um modulador $\Sigma\Delta$ e um filtro digital, e foi escolhida visando conseguir representar a corrente proveniente dos fotodíodos com maior resolução. O modulador converte a corrente do fotodíodo numa sequência de bits cuja média representa o seu valor analógico. Enquanto o filtro digital serve para digitalizar, converter num valor que representa a amplitude do sinal de entrada, a sequência de bit proveniente do modulador.

O circuito de um modulador básico de primeira ordem, figura 3.8, o qual é a estrutura usada neste sensor, e as suas formas de ondas obtidas para os pontos (1), (2) e (3), do circuito, com uma corrente constante e sinusoidal na entrada (i_{IN}), estão apresentados na figura 3.9.

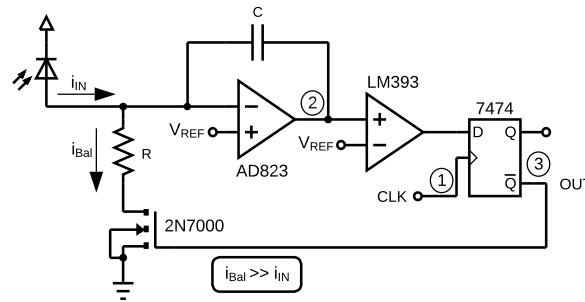


FIGURA 3.8: Circuito do Modulador Sigma-Delta para um fotodíodo

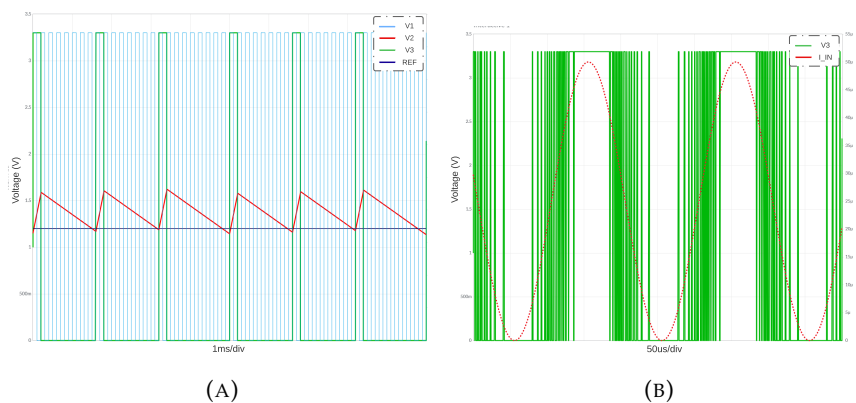


FIGURA 3.9: (A) Formas de onda dos pontos (1), (2) e (3), obtidas em simulação, do circuito correspondente as cores: ciano, vermelho e verde, respetivamente e o azul-escuro corresponde a tensão de referência, para uma corrente constante; (B) para uma corrente sinusoidal

Como mencionado anteriormente, este modulador procura gerar uma sequência de bits, *bit stream*, na sua saída (OUT), proporcional a corrente i_{IN} , que corresponde a corrente gerada pelo fotodíodo, com uma frequência definida pelo sinal de relógio (CLK). Para isso o modulador íntegra a corrente i_{IN} e a cada ciclo de relógio compara à tensão a saída do integrador (ponto 2 do circuito) com uma tensão de referência (V_{REF}), ligando ou desligando o MOSFET que irá permitir carregar ou descarregar, respetivamente, o condensador (C), presente no integrador do circuito, com objetivo de aproximar a sua tensão de saída ao valor da tensão de referência. Se o valor da

tensão à saída do integrador for superior ao valor de referência, o MOSFET é desligado e um impulso com valor de 0 lógico é obtido na saída, caso contrário, obtemos um impulso com valor de 1 lógico e o MOSFET é ligado. Conseqüentemente, quanto mais elevada a corrente a entrada, maior será a densidade de pulsos com valor lógico 1, e vice-versa, o que podemos observar na figura 3.9b que apresenta os impulsos obtidos à saída do modulador para uma corrente sinusoidal na sua entrada.

Por outro lado, se observámos a saída circuito em frequência, o erro que relaciona o valor da corrente à entrada com o seu valor amostrado é modelado como um ruído de quantização, na figura 3.10 podemos observar o espectro do ruído de quantização para abordagens típicas e para o caso do modulador sigma delta.

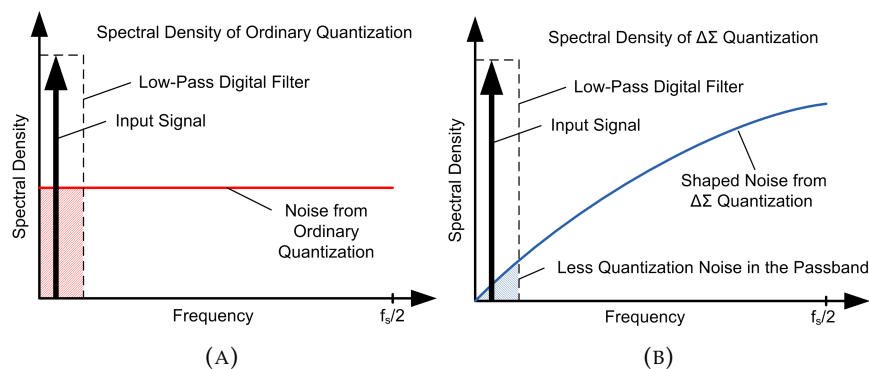


FIGURA 3.10: (A) Espectro do ruído de quantização típico; (B) Espectro do ruído de quantização do modulador $\Sigma\Delta$

Nas abordagens típicas, o ruído de quantização espalha-se uniformemente em todo o espectro até metade da frequência de amostragem, por outro lado, ao usar a modulação $\Sigma\Delta$ observa-se que a densidade espectral do ruído de quantização é "empurrado" para as altas frequências, devido ao processo de sobre-amostragem. Usando então um filtro digital passa-baixo, é possível digitalizar o sinal de entrada com muito maior resolução, podendo atingir até os 24bits.

A digitalização e filtragem da sequência de bits à saída do modulador foi implementada usando um microcontrolador da SMT32, que contém um filtro digital para moduladores $\Sigma\Delta$, integrado, que permite digitalizar sinais com resoluções até 24 bits filtro sinc, isto é, aplicando uma média móvel sobre um certo número de amostras do sinal com base no valor de *oversampling ratio* escolhido. A figura 3.11 apresenta a resolução obtida com base na ordem da sinc escolhida e do rácio de

sobre-amostragem, sendo que para este trabalho o filtro foi parametrizado para obter valores com resolução de 21 bits.

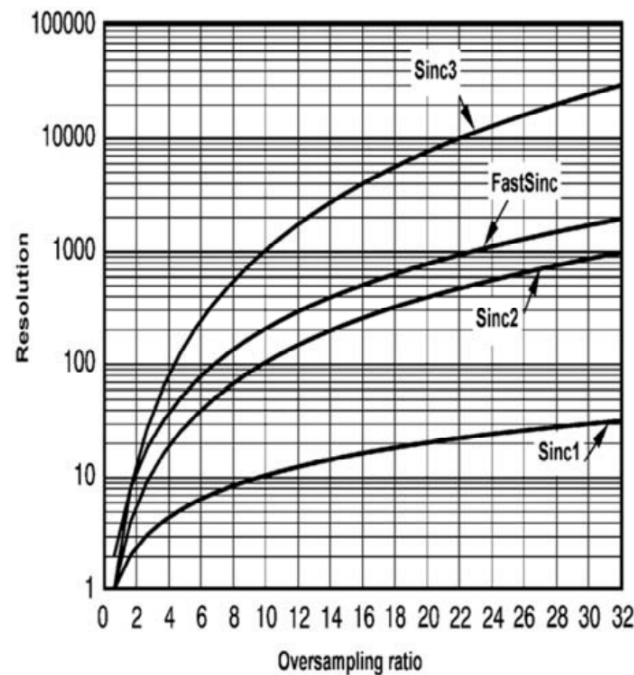


FIGURA 3.11: Resolução do filtro digital em função do *oversampling ratio*

3.3 Comunicação

A comunicação é a parte responsável por transmitir os dados adquiridos pelo sensor para um sistema hospedeiro. Este módulo foi desenhado para tornar o sensor mais portátil e versátil, tendo sido então implementado três formas diferentes de comunicação, USB, para permitir que qualquer dispositivo com *interface* USB possa interagir com o sensor, USB com micro-ROS, para permitir a integração do sensor e robôs que usam a *framework* ROS e uma *interface* Web, para que qualquer dispositivo possuindo WiFi possa interagir com o sensor sem a necessidade de software adicional. Para implementar o módulo de comunicação, foi usado um microcontrolador ESP32, uma vez que este possui um módulo WiFi, que assegura a transmissão dos dados pela *interface* Web. Adicionalmente, este é compatível com o sistema operativo de tempo real FreeRTOS que é um dos requisitos para implementar micro-ROS.

A *interface Web* foi realizada implementando um servidor HTTP dentro do ESP32, que quando acessado por clientes (*browsers*), dentro da mesma rede WiFi, devolve uma página web contendo um *dashboard* para visualizar os dados e interagir com o sensor. De modo a permitir que o *dashboard* comunica com o sensor e atualiza os dados sem ter que reatualizar a página web, também foi implementado um servidor de *websockets* no ESP32 onde o *dashboard* se conecta e comunica com o sensor de forma assíncrona.

A figura 3.12 apresenta o *dashboard* web desenvolvido que permite controlar e apresentar os dados. Este pode ser dividido em duas partes: a parte superior, encarregue de controlar o sensor, permitindo ligar ou desligar o LED ultravioleta, pausar as medições, alterar a frequência de medição, limpar os gráficos e modificar o número de pontos usados no processamento da média e do desvio padrão. A parte inferior do *dashboard* apresenta os dados recebidos em tempo real num gráfico e o resultado da média e do desvio padrão para cada um dos parâmetros em análises.



FIGURA 3.12: Print do *dashboard* web desenvolvido

A *interface* micro-ROS foi implementada com base na arquitetura apresentada na figura 3.13. A principal vantagem em usar esta arquitetura é que permite o sensor interagir diretamente com a *framework* ROS sem a necessidade de desenvolver um *driver* que converte as mensagens *raw* para tópicos ROS. Para atingir isso o microcontrolador implementa um cliente XRCE-DDS que pode comunicar com um agente genérico ROS através de diferentes protocolos como WiFi, bluetooth, serial, etc. Sendo

este agente responsável por transmitir a mensagens recebidas pelos clientes para o ROS.

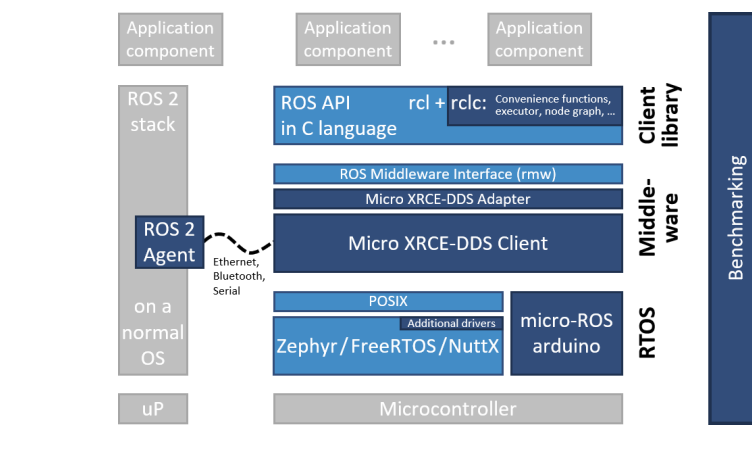


FIGURA 3.13: Arquitetura micro-ROS ¹

Para simular a sua aplicação em robôs moveis para a detecção autónoma de substâncias químicas no ar, o sensor foi conectado, por USB, a um computador com um agente ROS em execução, simulando o robô, a figura 3.14 apresenta a resposta obtida pelo agente, onde se observa que ao ligar-se um dispositivo novo, o agente executa os comando vindo do sensor, nesse caso, criou um *publisher* para um novo tópico chamado `"/ChemicalSensor"` onde os dados irão ser transmitidos bem como mensagens de receção de dados e a figura 3.15 apresenta a consola do ROS, onde podemos observar que os dados estão a ser publicados pelo sensor no tópico `"/ChemicalSensor"`.

¹Fonte: <https://micro.ros.org/docs/overview/features/>

```

[169442330.417863] info | TermosAgentLinux.cpp | init | Serial port not found. | device: /dev/ttyACM0, error 2, waiting for connection...
[169442331.425808] info | TermosAgentLinux.cpp | init | Serial port not found. | device: /dev/ttyACM0, error 2, waiting for connection...
[169442332.434138] info | TermosAgentLinux.cpp | init | Serial port not found. | device: /dev/ttyACM0, error 2, waiting for connection...
[169442333.239171] info | TermosAgentLinux.cpp | init | running... | fd: 3
[169442333.239742] info | Root.cpp | set_verbose_level | logger_setup | verbose_level: 6
[169442335.528192] info | Root.cpp | create_client | create | client_key: 0x27572456, session_id: 0x81
[169442335.528301] info | SessionManager.hpp | establish_session | session established | client_key: 0x27572456, address: 0
[169442335.528579] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 19, data:
0000: 81 00 00 00 04 01 00 00 00 58 52 43 45 01 00 01 0F 00
[169442335.538547] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 52, data:
0000: 81 00 00 00 01 07 2C 00 00 0A 00 01 01 03 00 00 1D 00 00 00 00 01 00 00 15 00 00 00 00 69 63 72
0020: 6F 5F 72 6F 73 5F 65 73 70 33 32 5F 6E 6F 64 65 00 00 00 00
[169442335.548914] info | ProxyClient.cpp | create_participant | participant created | client_key: 0x27572456, participant_id: 0x000(1)
[169442335.548999] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 14, data:
0000: 81 80 00 00 05 01 00 00 00 0A 00 01 00 00
[169442335.549014] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 01 00 00 00 80
[169442335.563187] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 01 00 00 00 80
[169442335.563215] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 80, data:
0000: 81 80 01 00 01 07 47 00 00 00 02 02 03 00 00 39 00 00 00 12 00 00 00 72 74 2F 43 68 65 6D 69
0020: 63 61 6C 53 65 6E 73 6F 72 00 00 01 1D 00 00 00 73 74 64 5F 6D 73 67 73 3A 6D 73 67 3A 3A 64
0040: 64 73 5F 3A 3A 53 74 72 69 6E 67 5F 00 00 01 00
[169442335.563380] info | ProxyClient.cpp | create_topic | topic created | client_key: 0x27572456, topic_id: 0x000(2), participant_id: 0x000(1)
[169442335.563480] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 14, data:
0000: 81 00 01 00 05 01 06 00 00 00 02 00 00
[169442335.563500] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 02 00 00 00 80
[169442335.572408] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 02 00 00 00 80
[169442335.572450] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 24, data:
0000: 81 80 02 00 01 07 10 00 00 0C 00 03 03 03 00 00 02 00 00 00 00 00 00 00 01
[169442335.572502] info | ProxyClient.cpp | create_publisher | publisher created | client_key: 0x27572456, publisher_id: 0x000(3), participant_id: 0x000(1)
[169442335.572639] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 14, data:
0000: 81 80 02 00 05 01 06 00 00 0C 00 03 00 00
[169442335.572655] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 03 00 00 00 80
[169442335.582631] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 03 00 00 00 80
[169442335.582698] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 36, data:
0000: 81 00 03 00 01 07 1C 00 00 00 05 05 03 00 00 0E 00 00 00 02 01 3F 02 00 01 83 05 00 00 00
0020: 00 00 00 03
[169442335.583551] info | ProxyClient.cpp | create_datawriter | datawriter created | client_key: 0x27572456, datawriter_id: 0x000(5), publisher_id: 0x000(3)
[169442335.583722] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 14, data:
0000: 81 80 03 00 05 01 06 00 00 0D 00 05 00 00
[169442335.583771] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 04 00 00 00 80
[169442335.591978] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 13, data:
0000: 81 00 00 00 0A 01 05 00 04 00 00 00 80
[169442335.592062] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 16, data:
0000: 81 00 00 00 0E 01 08 00 02 00 00 00 68 4D 82 24
[169442335.592337] debug | SerialAgentLinux.cpp | send_message | | client_key: 0x27572456, len: 32, data:
0000: 81 00 00 00 0F 01 18 00 00 5F 23 FF 64 79 63 4B 23 5F 23 FF 64 76 5B 4B 23 02 00 00 68 4D 82 24
[169442335.600189] debug | SerialAgentLinux.cpp | recv_message | [==== SER <====] | client_key: 0x27572456, len: 16, data:
0000: 81 00 00 00 02 01 08 00 00 0A FF FD 02 00 00 00

```

FIGURA 3.14: Resposta do agente ROS

```

root@ubuntu-Nitro-ANS15-54:/uros_ws# ros2 node list
/micro_ros_esp32_node
root@ubuntu-Nitro-ANS15-54:/uros_ws# ros2 topic list
/ChemicalSensor
/parameter_events
/rosout
root@ubuntu-Nitro-ANS15-54:/uros_ws# ros2 topic echo /ChemicalSensor
data: 1694442445.796582; 24, 669
---
data: 1694442446.796757; 27, 669
---
data: 1694442447.796579; 27, 667
---
data: 1694442448.796664; 24, 666
---
data: 1694442449.796835; 24, 664
---
data: 1694442450.796836; 26, 664
---
data: 1694442451.802037; 29, 666
---
data: 1694442452.796602; 24, 663
---
data: 1694442453.796551; 21, 658
---
data: 1694442454.796601; 18, 662
---
data: 1694442455.796575; 14, 666
---
data: 1694442456.796838; 12, 661
---
data: 1694442457.796610; 9, 661
---
data: 1694442458.796690; 5, 665
---
data: 1694442459.796605; 3, 667
---
data: 1694442460.796881; 1, 664
---
^Croot@ubuntu-Nitro-ANS15-54:/uros_ws#

```

FIGURA 3.15: Print da consola ROS

Capítulo 4

Testes experimentais

Este capítulo apresenta os testes realizados, bem como o ambiente experimental usado e os resultados obtidos para caracterizar a resposta do sensor para as várias abordagens definidas no condicionamento e aquisição de sinal do capítulo anterior.

4.1 Ambiente experimental

Para realizar as várias experiências, foi montado um ambiente experimental que visa avaliar a resposta do sensor para diferentes concentrações, com base no diagrama do circuito do gás da figura 4.1. O objetivo do circuito é de poder controlar a concentração relativa de nitrobenzeno presente num gás portador, inerte, que passa pelo sensor.

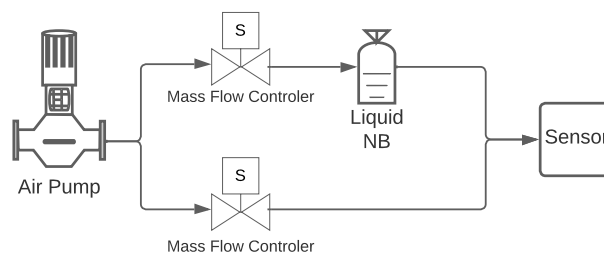


FIGURA 4.1: Diagrama do circuito do gás

O ambiente de teste experimental consiste numa bomba que envia um gás inerte, neste caso azoto, uma vez que faz parte de 78% do ar atmosférico, mas também poderia ter sido usado ar sintetizado para simular condições reais, em seguida este gás passa por dois controladores mássicos, os F-201CV da família EL-FLOW da Bronkhorst, que deixam apenas passar a quantidade de gás definida, sendo que um

deles vai diretamente para o sensor e outro está ligado a um recipiente, fechado hermeticamente permitindo assim que a quantidade de gás que entra seja igual à que sai, contendo nitrobenzeno, com saída para o sensor.

Assim, definindo a quantidade de gás não contaminado que passa em cada um dos controladores mássicos podemos definir a concentração relativa de contaminação por nitrobenzeno que passa pelo sensor, permitindo visualizar a resposta do sensor para concentrações diferentes, bem como testar a sua sensibilidade. A fotografia da figura 4.2 apresenta a bancada de teste com o circuito do gás mais o sensor montado.

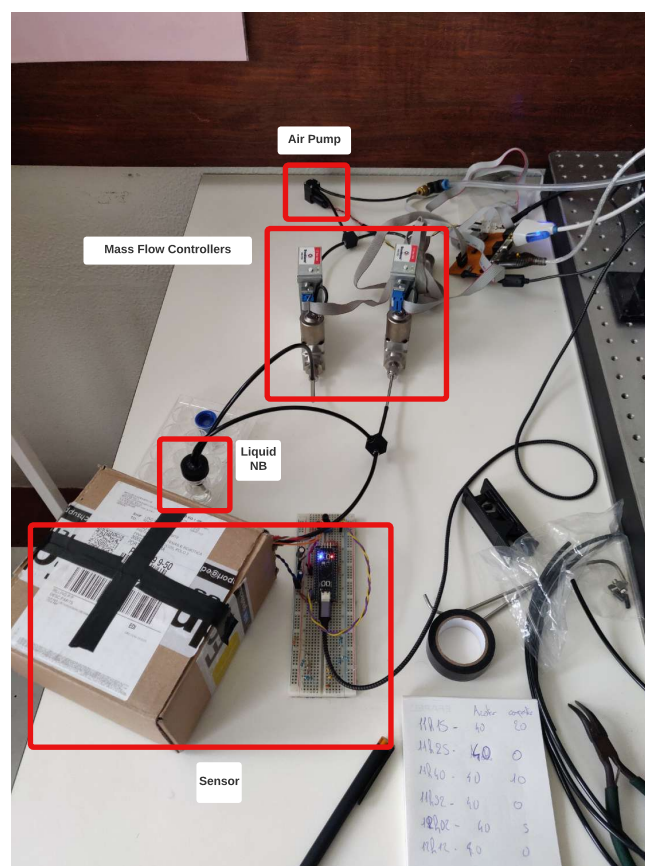


FIGURA 4.2: fotografia da bancada de teste

4.2 Procedimentos e experiências

Para caracterizar a resposta do sensor a várias concentrações de contaminação, as experiências realizadas foram as mesmas para ambas as abordagens, tradicional e sigma-delta, para poder assim comparar os resultados de ambas em situações de

testes iguais. Estes testes consistiram em usar uma quantidade constante de gás não contaminado para todos os testes, variando apenas a quantidade de gás contendo nitrobenzeno. Para cada teste é inicialmente introduzido ambos os gases até a resposta do sensor estabilizar, depois a saída do gás contaminado é desligada, deixando passar apenas gás puro até o sensor voltar ao seu valor inicial. Assim podemos obter as curvas de quenching e recuperação do material fluorescente, bem como estimar a sua sensibilidade relativa ao nitrobenzeno. Os parâmetros medidos em todas as experiências foram o fluxo de ar contaminado e de ar puro para obter o valor de concentração de contaminação relativa com base na equação seguinte:

$$C(\%) = \frac{\text{Ar Contaminado}}{\text{Ar Puro} + \text{Ar Contaminado}} * 100 \quad (4.1)$$

Os outros parâmetros medidos foram os sinais a saída dos fotodíodos de monitorização da fluorescência e do LED de excitação, normalizados em função da resolução máxima em cada uma das abordagens, 2^{12} e 2^{21} para a tradicional e sigma-delta respetivamente, para obter o valor do rácio entre ambos com base na equação seguinte:

$$\text{Rácio} = \frac{\text{Luz de Excitação}}{\text{Luz de Fluorescência}} \quad (4.2)$$

Por outro lado, outra métrica que pode caracterizar cada uma das abordagens do sensor é limiar de deteção. Um dos métodos para a sua determinação é calculando a média e o desvio padrão (σ) da resposta do zero do sensor [55], considerando que a distribuição da resposta do sensor é de tipo gaussiana, foi estatisticamente comprovado que para um range de 3σ em volta da média de uma distribuição, estará presente 99% do seu conteúdo, com base nisso a estimativa do limiar de deteção usado segue a seguinte equação:

$$LOD(\text{limiar de deteção}) = 3\sigma \quad (4.3)$$

Para obter então o limiar de deteção foram realizados testes, sem gás nenhum, medindo apenas os sinais a saída dos fotodíodos para uma intensidade constante, igual à intensidade usada nos testes anteriores, obtendo assim o 'zero' ou a *baseline*

do sensor para cada uma das abordagens, ao qual foi calculado a média e o desvio padrão para obter o limiar de detecção.

4.2.1 Abordagem com amplificadores de transimpedância

Para a abordagem com amplificadores de transimpedância, os resultados obtidos para cada um dos parâmetros em análise, com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, estão apresentados nos gráficos da figura 4.3.

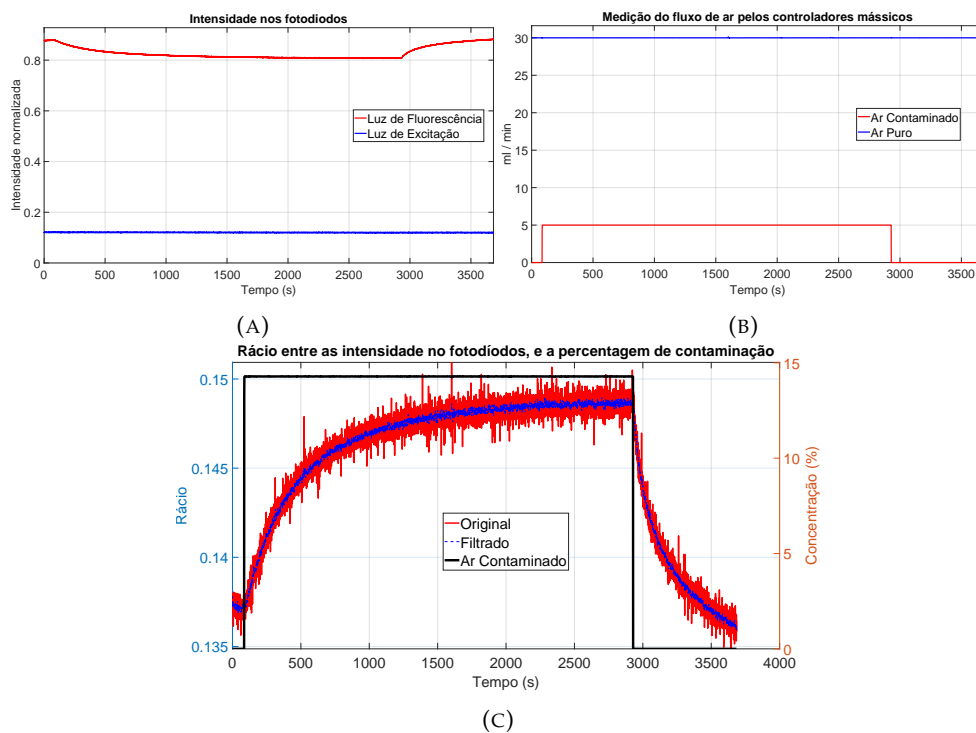


FIGURA 4.3: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação

A partir desses gráficos podemos obter alguns parâmetros que caracterizam a resposta do sensor, como o valor da concentração relativa de contaminação média (**C Médio**), o tempo de *quenching* até a estabilização (**T1**), o tempo de recuperação até ao valor inicial antes da contaminação (**T2**), o valor máximo atingido pelo rácio (**R Max**), o valor mínimo atingido pelo rácio (**R Min**) e a variação entre o rácio máximo e mínimos e a diferença entre eles, (ΔR). Os testes foram repetidos para diferentes valores de concentração, estando os gráficos referentes aos mesmos apresentados no

Anexo A, uma vez que as curvas são semelhantes às da figura 4.3. Os resultados para cada um dos parâmetros mencionados anteriormente para cada concentração testada estão apresentados na tabela 4.1,

TABELA 4.1: Parâmetros calculados para cada concentração que caracterizam a resposta do sensor para a abordagem tradicional

C Médio %	T1 segundos	T2 segundos	R Max	R Min	ΔR
23.780767	3362.913	289.995	0.163670	0.133103	0.030567
14.285402	2841.940	755.989	0.149002	0.135847	0.013156
7.692085	1017.988	294.996	0.140179	0.135446	0.004732
4.001204	591.977	46.000	0.136494	0.135210	0.001285
1.643861	85.999	320.006	0.135762	0.133355	0.002407

A partir dos dados da tabela obteve-se uma função que estima a variação do rácio do sensor em função da concentração relativa média, usando uma regressão polinomial de segundo grau, que está apresentado na figura 4.4. Com base na curva obtida, estima-se que para esta abordagem, a variação do rácio nunca será zero, ou seja, o erro de quantização é superior ao valor intensidade recebida pelos fotodiodos. Perdendo assim sensibilidade para baixas concentrações.

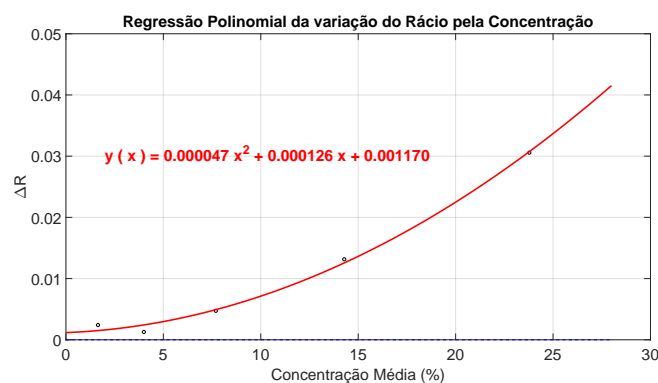


FIGURA 4.4: Estimação do ΔR em função da concentração relativa com uma função polinomial de segundo grau, para a abordagem tradicional

Os resultados obtidos para o cálculo do limiar de deteção estão apresentados na figura 4.5, aos quais foi removida a média para centralizar a distribuição da resposta em zero. Para esta abordagem o desvio padrão obtido foi de $1.4114mV$ sendo consequentemente o limiar de deteção alcançado de $4.2342mV$.

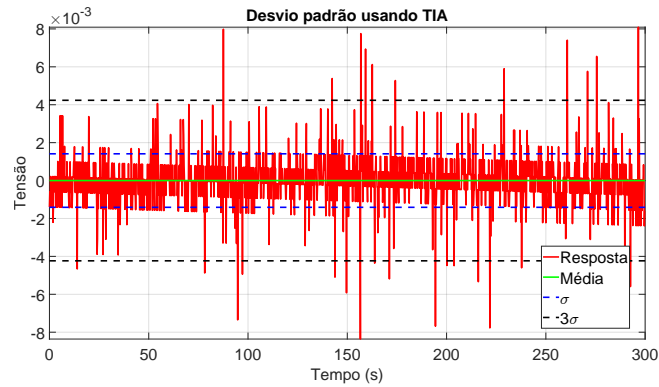


FIGURA 4.5: Resposta sem contaminação do sensor, usando TIA, com média e desvio padrão

4.2.2 Abordagem sigma delta

Para a abordagem Sigma-Delta, os resultados obtidos para cada um dos parâmetros em análise, com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, estão apresentados nos gráficos da figura 4.6.

Da mesma forma que na abordagem usando amplificadores de transimpedância, a partir desses gráficos obtiveram-se os parâmetros que caracterizam a resposta do sensor, nomeadamente o valor da concentração relativa de contaminação média (**C Médio**), o tempo de *quenching* até a estabilização (**T1**), o tempo de recuperação até o valor inicial antes da contaminação (**T2**), o valor máximo atingido pelo rácio (**R Max**), o valor mínimo atingido pelo rácio (**R Min**) e a variação entre o rácio máximo e mínimos e a diferença entre eles, (ΔR). Os testes foram repetidos para diferentes valores de concentração, estando os gráficos referentes aos mesmos apresentados no Anexo A, uma vez que as curvas são semelhantes às da figura 4.6. Os resultados dos parâmetros para cada uma das concentrações estão apresentados na tabela 4.2,

TABELA 4.2: Parâmetros calculados para cada concentração que caracterizam a resposta do sensor para a abordagem sigma-delta

C Médio %	T1 segundos	T2 segundos	R Max	R Min	ΔR
14.285861	2900.944	887.985	1.821939	0.812160	1.009779
7.661368	1343.757	126.999	0.991444	0.810766	0.180678
6.250035	937.978	75.008	0.866099	0.800797	0.065301
3.999593	331.994	39.000	0.828305	0.809742	0.018563
1.635399	42.999	168.998	0.809592	0.800829	0.008763

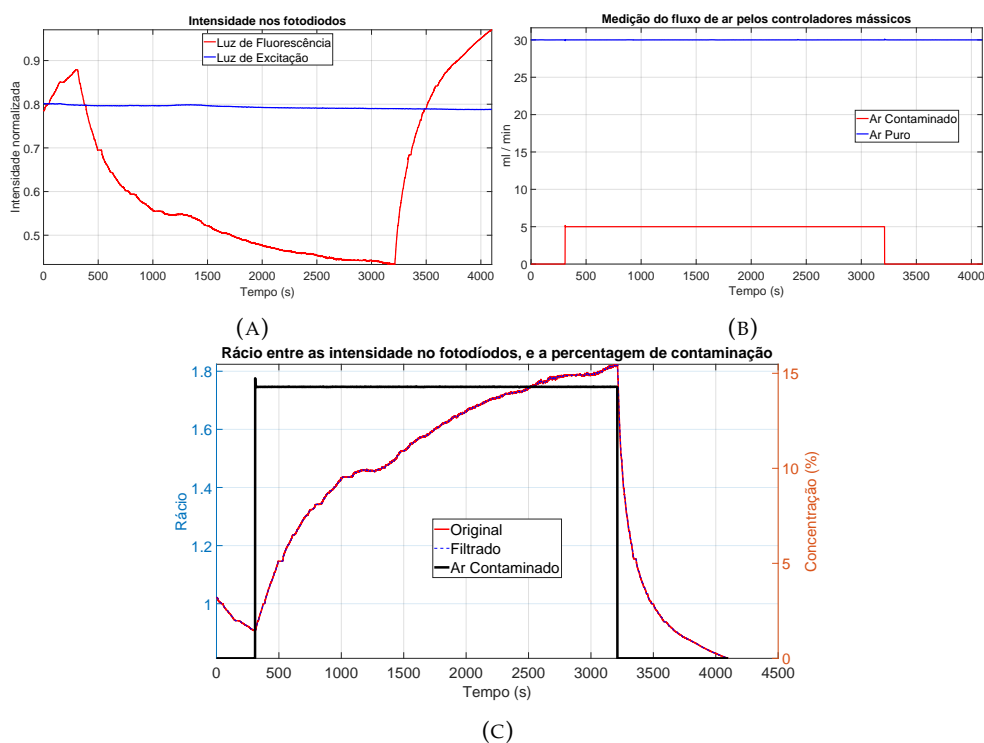


FIGURA 4.6: Resultados para a abordagem Sigma-Delta com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, (A) da intensidade dos fotodiodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodiodos e concentração relativa de contaminação

A partir dos dados da tabela obteve-se também uma função que estima a variação do rácio do sensor em função da concentração relativa média, usando uma regressão polinomial de segundo grau, que está apresentado na figura 4.7. Com base na curva obtida, estima-se que para esta abordagem, a variação do rácio é zero para uma concentração relativa de aproximadamente 2.47%, o que se verificou experimentalmente, uma vez que para concentrações próximas desse valor, o sinal do rácio pouco se altera, o que podemos concluir que é o ponto onde a taxa de recuperação do material fluorescente equilibra-se com o seu *quenching*, sendo então uma boa estimativa de sensibilidade relativa do sensor.

Os resultados obtidos para o cálculo do limiar de deteção estão apresentados na figura 4.8, aos quais foi removida a média para centralizar a distribuição da resposta em zero. Para esta abordagem o desvio padrão obtido foi de $0.0915mV$ sendo consequentemente o limiar de deteção alcançado de $0.2745mV$.

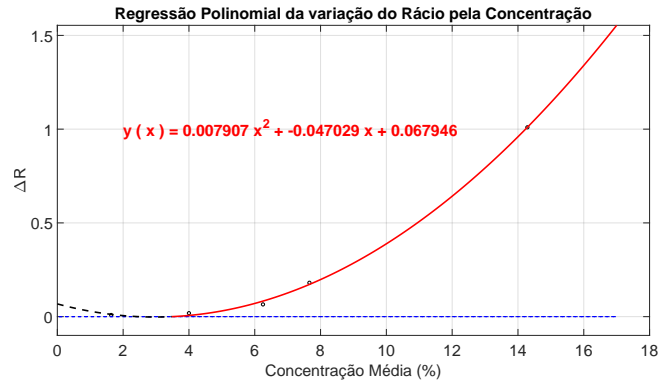


FIGURA 4.7: Estimação do ΔR em função da concentração relativa com uma função polinomial de segundo grau, para a abordagem sigma-delta

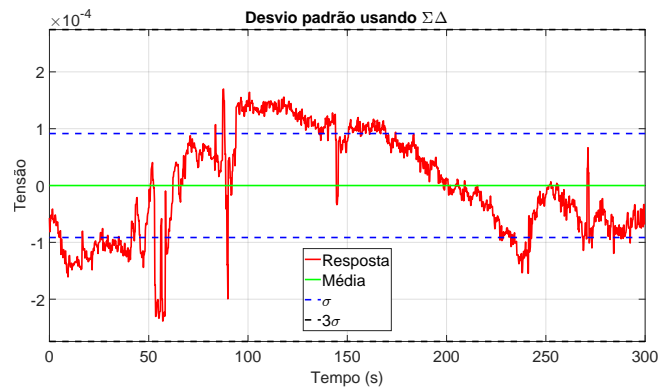


FIGURA 4.8: Resposta sem contaminação do sensor, usando $\Sigma\Delta$, com média e desvio padrão

4.3 Discussão de resultados

Com base nos resultados obtidos das experiências realizadas para ambas as abordagens, podemos observar que o sinal do rácio das intensidades dos fotodíodos, da abordagem tradicional, apresenta uma componente de ruído muito maior que na abordagem sigma-delta, para comparação filtramos ambos os sinais da mesma forma, e no caso do sigma-delta, o sinal filtrado é quase idêntico ao original, enquanto no outro caso é possível ver diferença.

Por outro lado, se analisarmos as equações obtidas da estimação da variação do rácio em função da concentração, o coeficiente do termo de maior grau, de segundo grau neste caso, para a abordagem sigma-delta, possui um valor que é aproximadamente 160 vezes maior que o da abordagem tradicional, o que permite então representar variações na concentração com muito maior resolução.

A partir da abordagem sigma delta foi também possível estimar que o sensor possui uma sensibilidade para concentrações relativas de contaminações até 2.47%, o que não aconteceu com a outra abordagem, uma vez que essa apresenta variações no rácio mesmo na ausência de gás contaminado.

Relativamente ao limiar de detecção obtido para cada uma das abordagens, observa-se que a abordagem sigma-delta possui um limiar que é aproximadamente 15 vezes menor que a abordagem usando amplificadores de transimpedância.

Capítulo 5

Conclusões

No início desta dissertação, definiu-se uma série de objetivos a atingir para responder à pergunta de investigação inicial que era, "Será possível desenvolver um sensor ótico que usa a fluorescência para detetar substâncias químicas, que seja portátil, versátil e com elevada resolução?". Os resultados obtidos ao longo deste trabalho demonstram que o sensor desenvolvido alcançou com sucesso as metas propostas.

Inicialmente, foi realizada uma revisão da bibliografia para compreender os princípios fundamentais da fluorescência, bem como as suas propriedades na deteção de substâncias químicas e foram apresentados alguns exemplos de trabalhos semelhantes já realizados. A partir desse conhecimento, foi possível selecionar os componentes e as técnicas mais adequados para a construção de um protótipo do sensor que fosse compacto, versátil e com elevada resolução.

Além disso, foram conduzidas experiências para caracterizar a resposta do sensor para diferentes tipos de abordagens, uma mais inovadora e outra mais tradicional, em que os resultados permitiram estimar a sensibilidade do sensor, a obtenção de dados com bastante resolução que os métodos tradicionais e relacionar a intensidade de fluorescência com a concentração presente de uma dada substância química.

Em suma, este estudo demonstrou que é possível desenvolver um sensor que fosse portátil, versátil, que usasse a fluorescência e correlacionar a sua resposta com a concentração de uma substância química alvo. Além de oferecer vantagens relativamente aos métodos tradicionais, nomeadamente uma maior resolução.

5.1 Trabalhos futuros

É importante ressaltar que, embora se conseguisse alcançar resultados encorajadores, ainda existem algumas áreas para aprimoramento. Nomeadamente, na construção da câmara de amostragem, encontrar materiais que não absorvam a radiação emitida pela luz de excitação e conseqüentemente aumentem o rendimento ótico do sensor.

Além disso, a investigação de novos materiais fluorescente para aprimorar a sensibilidade do sensor pode torná-lo ainda mais versátil e eficaz em diferentes cenários, bem como o desenvolvimento de uma matriz deles para poder detetar múltiplas substancias em simultâneo e conseqüentemente usar o sensor em aplicações de nariz eletrônico.

No caso da eletrônica também há melhorias possíveis, como o uso de eletrônica mais rápida que permitiria a medição de parâmetros como o tempo de vida da fluorescência, ou o uso da tecnologia de microfabricação visando melhorar ainda mais a resolução do sensor. Por outro lado, o circuito do modulador $\Sigma\Delta$ poderia ter sido implantado de outra forma como apresentado pela figura 5.1, em que o funcionamento é o mesmo, mas a luz de excitação é que seria controlada para controlar a corrente no fotodíodo para aproximar a saída do integrado ao valor da referência.

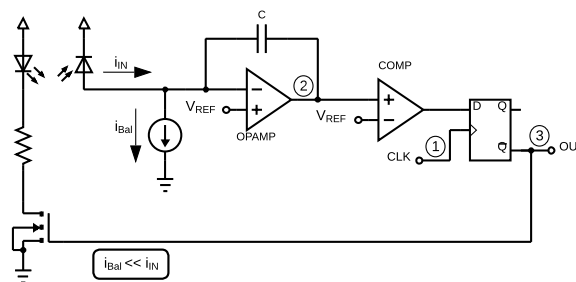


FIGURA 5.1: Circuito do Modulador Sigma-Delta controlando a luz de excitação

Por fim, neste trabalho o foco era comparar as duas abordagens de condicionamento e aquisição de sinal para ver se a abordagem sigma-delta permitia atingir maiores resoluções, sendo a principal métrica de comparação usada, o limiar de

deteção. Mas outros parâmetros poderiam ter sido analisados, nomeadamente a eficiência ótica ou o tempo de resposta da câmara de amostragem.

Apêndice A

Resultados obtidos para cada uma das configurações

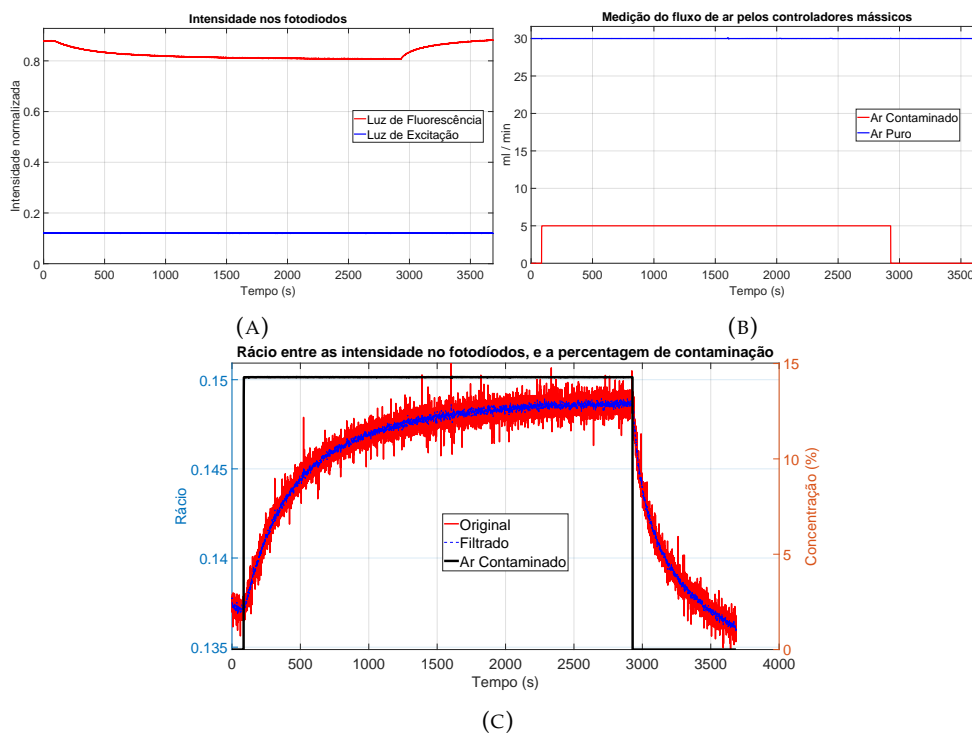


FIGURA A.1: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, (A) da intensidade dos fotodiodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodiodos e da concentração relativa de contaminação

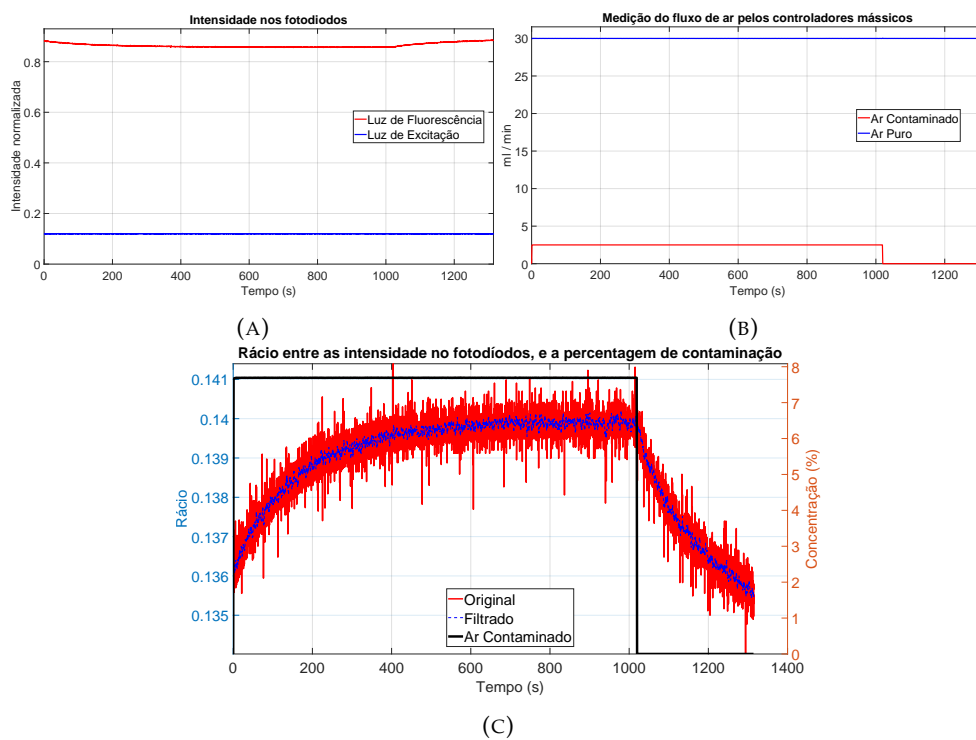


FIGURA A.2: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 7.69%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação

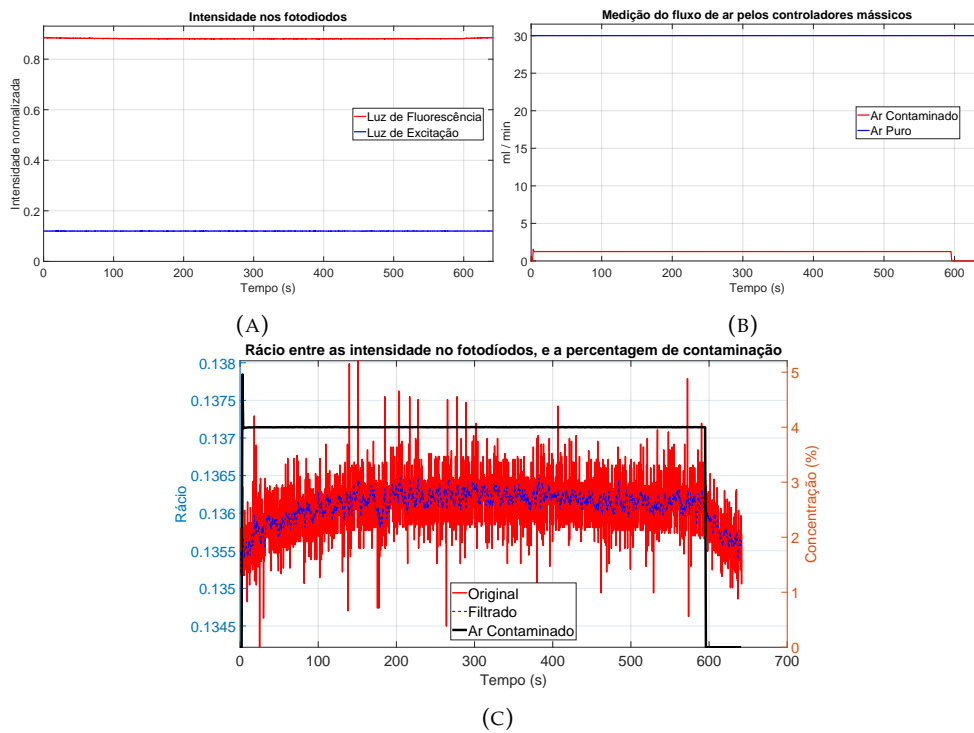


FIGURA A.3: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 4%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação

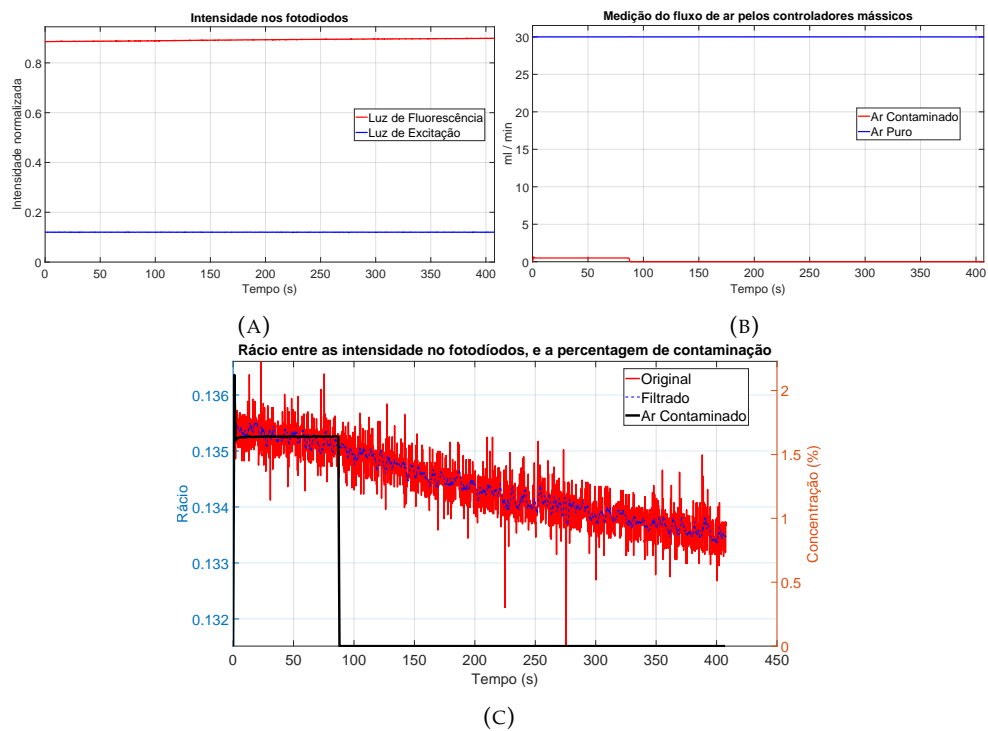


FIGURA A.4: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 1.64%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação

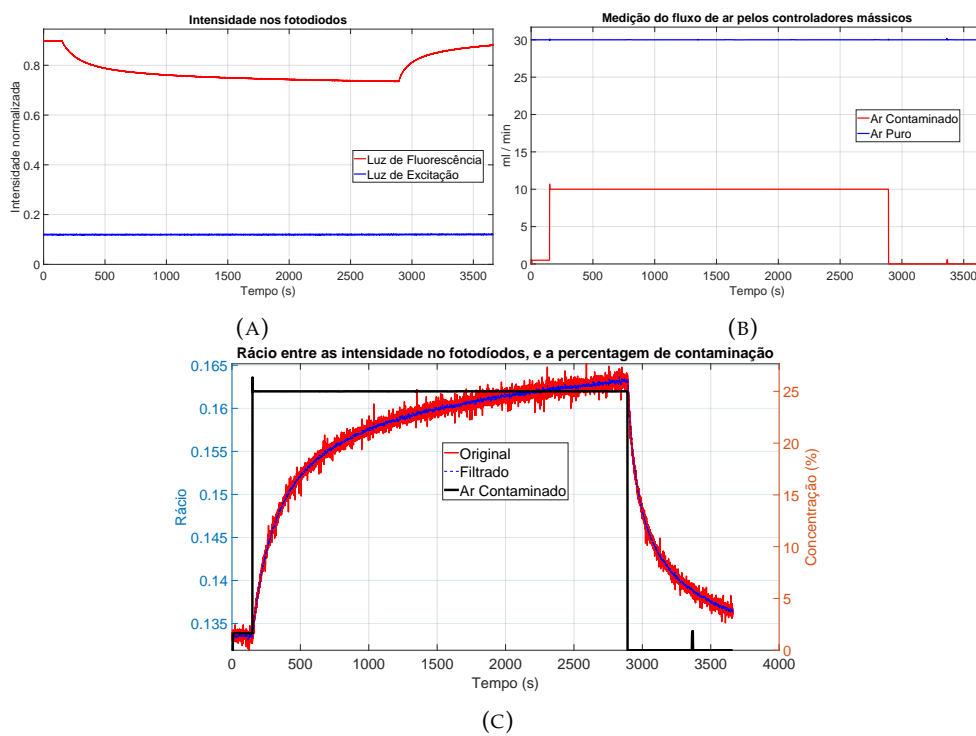


FIGURA A.5: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 23.8%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação

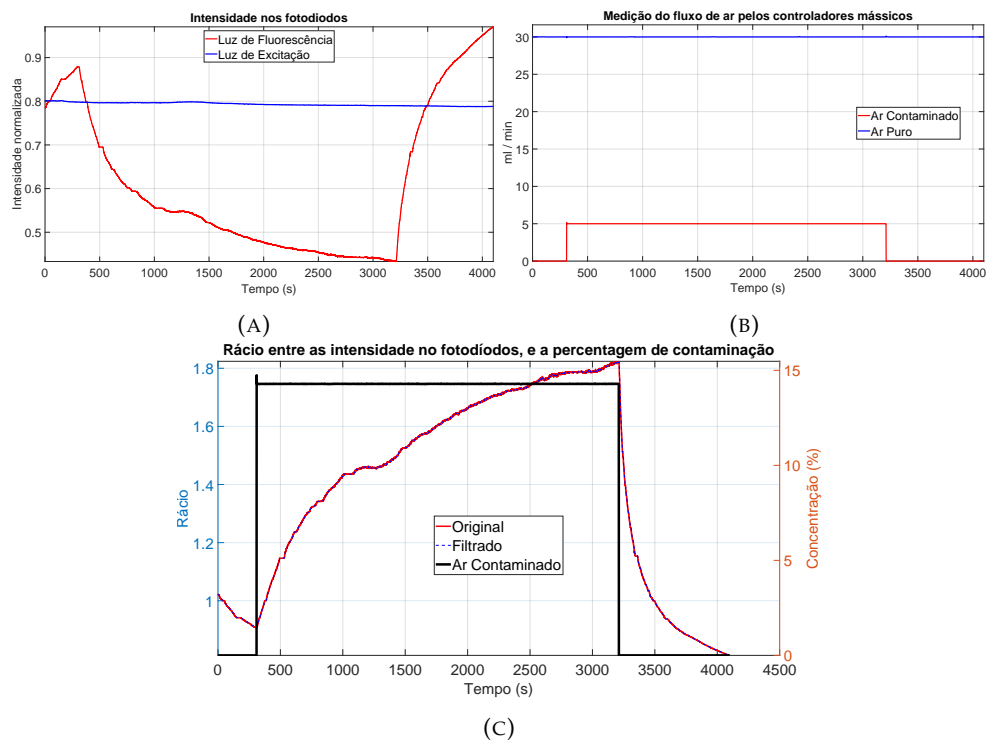


FIGURA A.6: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 14.3%, (A) da intensidade dos fotodiodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodiodos e concentração relativa de contaminação

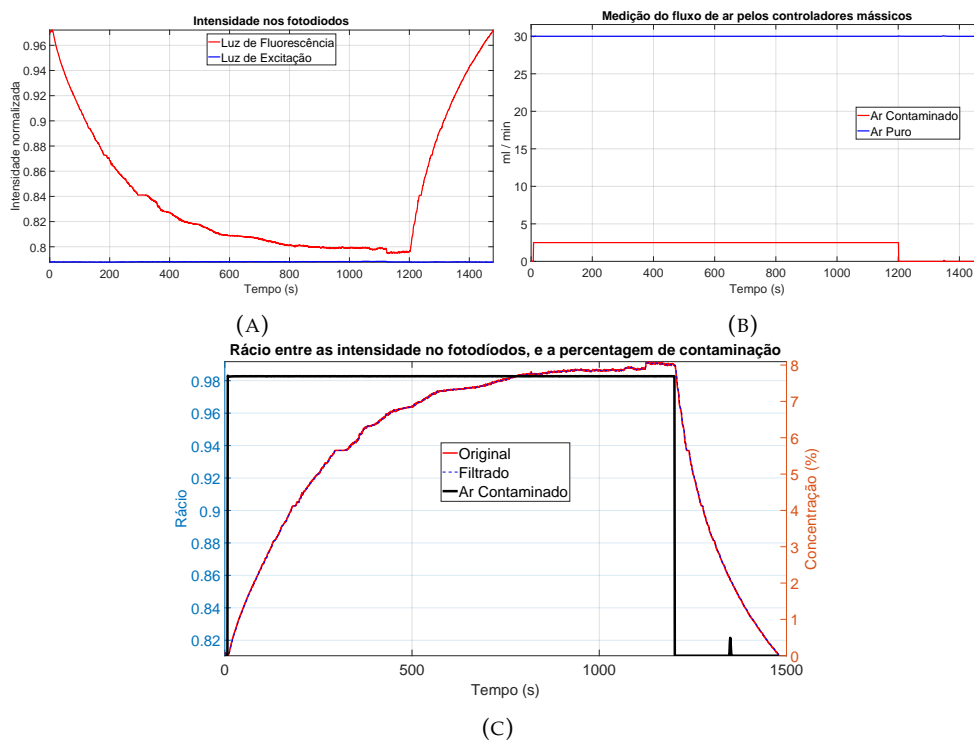


FIGURA A.7: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 7.66%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação

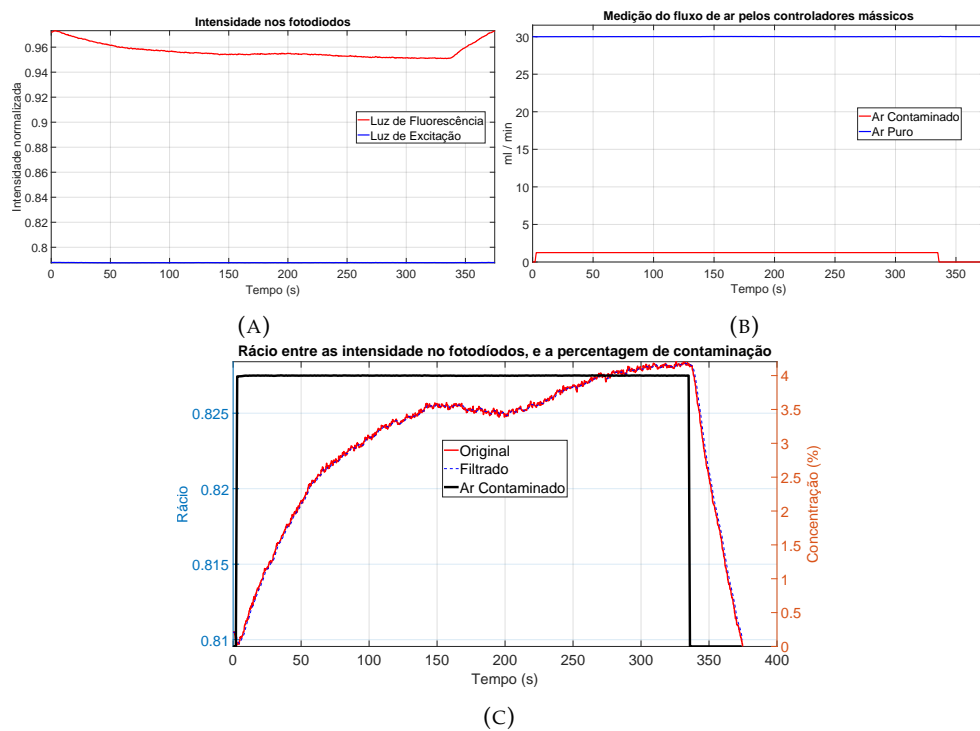


FIGURA A.8: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 4%, **(A)** da intensidade dos fotodíodos; **(B)** do fluxo de ar pelos controladores mássicos; **(C)** do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e da concentração relativa de contaminação

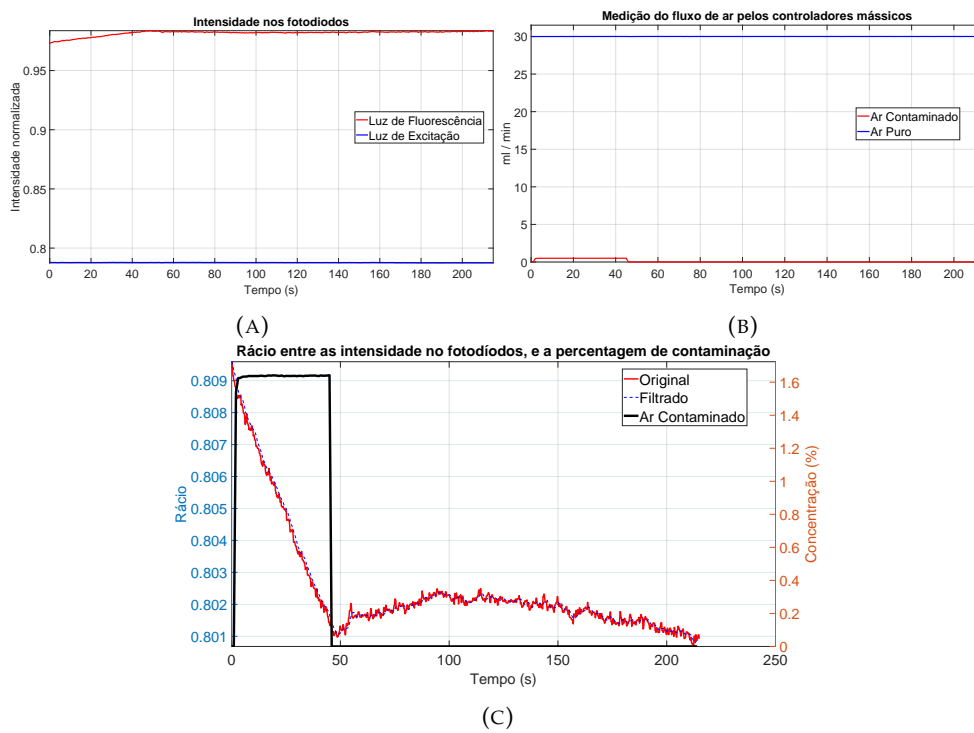


FIGURA A.9: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 1.64%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação

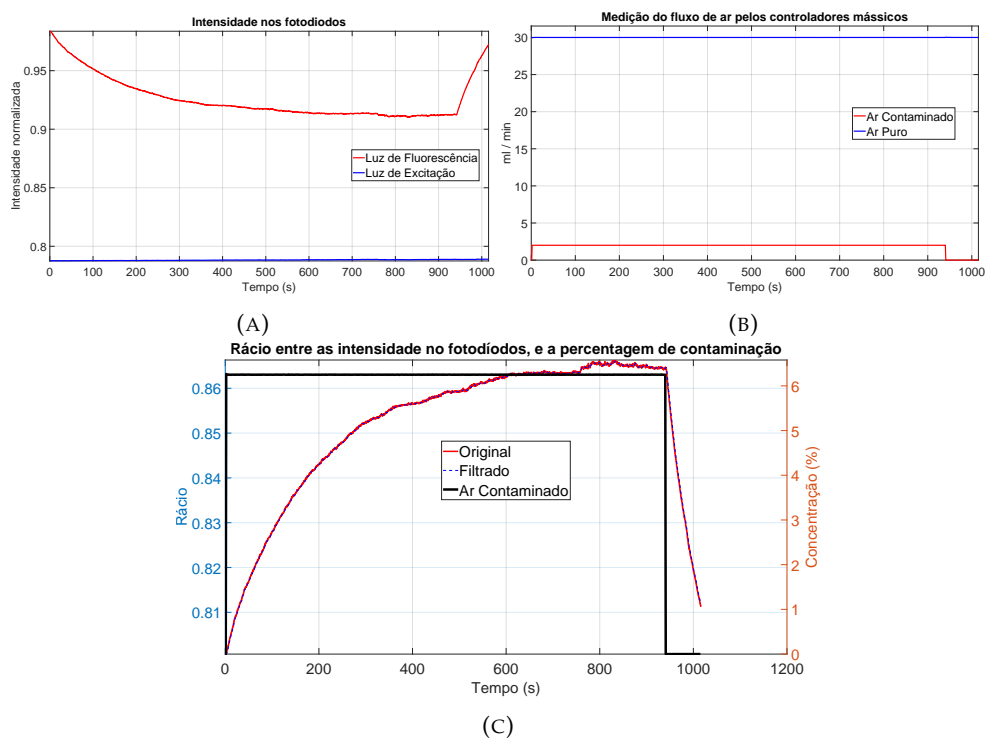


FIGURA A.10: Resultados para a abordagem tradicional com uma concentração média de aproximadamente 6.25%, (A) da intensidade dos fotodíodos; (B) do fluxo de ar pelos controladores mássicos; (C) do rácio entre as intensidades dos fotodíodos e concentração relativa de contaminação

Bibliografia

- [1] Diana Bueno et al. «Low-cost and portable absorbance measuring system to carbamate and organophosphate pesticides». Em: *Sensors and Actuators B: Chemical* 203 (2014), pp. 81–88.
- [2] Natan T Shaked. «Quantitative phase microscopy of biological samples using a portable interferometer». Em: *Optics letters* 37.11 (2012), pp. 2016–2018.
- [3] Hyungsoon Im et al. «Digital diffraction analysis enables low-cost molecular diagnostics on a smartphone». Em: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.18 (2015), pp. 5613–5618.
- [4] Yongfa Zhu et al. «Development of a gas sensor utilizing chemiluminescence on nanosized titanium dioxide». Em: *Analytical Chemistry* 74.1 (2002), pp. 120–124.
- [5] Tu San Park e Jeong-Yeol Yoon. «Smartphone detection of Escherichia coli from field water samples on paper microfluidics». Em: *IEEE Sensors Journal* 15.3 (2014), pp. 1902–1907.
- [6] Young-Ho Shin, M Teresa Gutierrez-Wing e Jin-Woo Choi. «Recent progress in portable fluorescence sensors». Em: *Journal of The Electrochemical Society* 168.1 (2021), p. 017502.
- [7] Peter Gründler. *Chemical sensors: an introduction for scientists and engineers*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [8] Xiaolin Wang et al. «Algorithm for an implantable fluorescence based glucose sensor». Em: *2012 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. IEEE. 2012, pp. 3492–3495.

- [9] Tao Liu et al. «Smartphone based platform for ratiometric fluorometric and colorimetric determination H₂O₂ and glucose». Em: *Sensors and Actuators B: Chemical* 305 (2020), p. 127524. ISSN: 0925-4005.
- [10] Arafat Hossain et al. «Lab-in-a-Phone: Smartphone-Based Portable Fluorometer for pH Measurements of Environmental Water». Em: *IEEE Sensors Journal* 15.9 (2015), pp. 5095–5102.
- [11] Yi Tian, Liping Wei e Derek Ho. «A low-cost time-correlated single photon counting portable DNA analyzer». Em: *Sensors* 19.13 (2019), p. 2838.
- [12] Geoffrey Mulberry, Kevin A. White e Brian N. Kim. «Analysis of Simple Half-Shared Transimpedance Amplifier for Picoampere Biosensor Measurements». Em: *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* 13.2 (2019), pp. 387–395.
- [13] Hiroshi Ishida, Yuta Wada e Haruka Matsukura. «Chemical Sensing in Robotic Applications: A Review». Em: *IEEE Sensors Journal* 12.11 (2012), pp. 3163–3173.
- [14] Joseph R Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, 2006.
- [15] J Herschel. «On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless». Em: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (1845), 143–145.
- [16] J Herschel. «On the epipölic dispersion of light, being a supplement to a paper entitled, "On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless"». Em: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (1845), 147–153.
- [17] Hans H Jaffé e Albert L Miller. «The fates of electronic excitation energy». Em: *Journal of chemical education* 43.9 (1966), p. 469.
- [18] Luis Fermín Capitán-Vallvey e Alberto J. Palma. «Recent developments in handheld and portable optosensing — A review». Em: *Analytica Chimica Acta* 696.1 (2011), pp. 27–46.
- [19] Z Shu et al. «Highly sensitive on-chip fluorescence sensor with integrated fully solution processed organic light sources and detectors». Em: *RSC advances* 7.42 (2017), pp. 26384–26391.

- [20] Jing Wu et al. «An economical fluorescence detector for lab-on-a-chip devices with a light emitting photodiode and a low-cost avalanche photodiode». Em: *Analyst* 137.2 (2012), pp. 519–525.
- [21] William J Pietro e Ozzy Mermut. «A SiPM-Enabled Portable Delayed Fluorescence Photon Counting Device: Climatic Plant Stress Biosensing». Em: *Biosensors* 12.10 (2022), p. 817.
- [22] Da Ying e Drew A Hall. «Current sensing front-ends: A review and design guidance». Em: *IEEE Sensors Journal* 21.20 (2021), pp. 22329–22346.
- [23] Anna Aliberti et al. «Fluorescent chemosensors for Hg²⁺ detection in aqueous environment». Em: *Sensors and Actuators B: Chemical* 247 (2017), pp. 727–735.
- [24] Mohammad Zarei. «Portable biosensing devices for point-of-care diagnostics: Recent developments and applications». Em: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 91 (2017), pp. 26–41.
- [25] Nauman Khalid, Isao Kobayashi e Mitsutoshi Nakajima. «Recent lab-on-chip developments for novel drug discovery». Em: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 9.4 (2017), e1381.
- [26] Yanli Lu, Zhenghan Shi e Qingjun Liu. «Smartphone-based biosensors for portable food evaluation». Em: *Current Opinion in Food Science* 28 (2019), pp. 74–81.
- [27] Meng Zhang et al. «A highly selective fluorescence turn-on sensor for cysteine/homocysteine and its application in bioimaging». Em: *Journal of the American Chemical Society* 129.34 (2007), pp. 10322–10323.
- [28] Sofie Spatharis e George Tsirtsis. «Ecological quality scales based on phytoplankton for the implementation of Water Framework Directive in the Eastern Mediterranean». Em: *Ecological Indicators* 10.4 (2010), pp. 840–847.
- [29] Raphael M Kudela et al. «Linking the physiology and ecology of *Cochlodinium* to better understand harmful algal bloom events: a comparative approach». Em: *Harmful Algae* 7.3 (2008), pp. 278–292.

- [30] Cynthia A Heil, Patricia M Glibert e Chunlei Fan. «Prorocentrum minimum (Pavillard) Schiller: a review of a harmful algal bloom species of growing worldwide importance». Em: *Harmful Algae* 4.3 (2005), pp. 449–470.
- [31] David A Caron et al. «Marine protistan diversity». Em: *Annual review of marine science* 4 (2012), pp. 467–493.
- [32] P Hyka et al. «Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae». Em: *Biotechnology advances* 31.1 (2013), pp. 2–16.
- [33] Shuxia Liu et al. «HPLC pigment profiles of 31 harmful algal bloom species isolated from the coastal sea areas of China». Em: *Journal of Ocean University of China* 13 (2014), pp. 941–950.
- [34] Jakub Gregor e Blahoslav Maršálek. «Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods». Em: *Water research* 38.3 (2004), pp. 517–522.
- [35] DP Sartory e JU Grobbelaar. «Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis». Em: *Hydrobiologia* 114 (1984), pp. 177–187.
- [36] Vivian A Lutz e JoséI Carreto. «A new spectrofluorometric method for the determination of chlorophylls and degradation products and its application in two frontal areas of the Argentine Sea». Em: *Continental Shelf Research* 11.5 (1991), pp. 433–451.
- [37] Diane M McKnight et al. «Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity». Em: *Limnology and Oceanography* 46.1 (2001), pp. 38–48.
- [38] Jacques Neveux e François Lantoiné. «Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique». Em: *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 40.9 (1993), pp. 1747–1765.
- [39] Yanna Liang, Nicolas Sarkany e Yi Cui. «Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions». Em: *Biotechnology letters* 31 (2009), pp. 1043–1049.

- [40] CJ Zhu e YK Lee. «Determination of biomass dry weight of marine microalgae». Em: *Journal of applied phycology* 9 (1997), pp. 189–194.
- [41] Ricardo M Letelier et al. «Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis». Em: *Limnology and Oceanography* 38.7 (1993), pp. 1420–1437.
- [42] Sarah R Bickman et al. «An innovative portable biosensor system for the rapid detection of freshwater cyanobacterial algal bloom toxins». Em: *Environmental science & technology* 52.20 (2018), pp. 11691–11698.
- [43] Antoine Gosset et al. «Xurography-based microfluidic algal biosensor and dedicated portable measurement station for online monitoring of urban polluted samples». Em: *Biosensors and Bioelectronics* 117 (2018), pp. 669–677.
- [44] Yan Zhang et al. «Ag₂S quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window». Em: *ACS nano* 6.5 (2012), pp. 3695–3702.
- [45] Lin Yuan et al. «Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging». Em: *Chemical Society Reviews* 42.2 (2013), pp. 622–661.
- [46] Lu Wang et al. «A general strategy to develop cell permeable and fluorogenic probes for multicolour nanoscopy». Em: *Nature Chemistry* 12.2 (2020), pp. 165–172.
- [47] Elias A Halabi, Dorothea Pinotsi e Pablo Rivera-Fuentes. «Photoregulated fluxional fluorophores for live-cell super-resolution microscopy with no apparent photobleaching». Em: *Nature communications* 10.1 (2019), p. 1232.
- [48] Florian Katzmeier et al. «A low-cost fluorescence reader for in vitro transcription and nucleic acid detection with Cas13a». Em: *PLoS One* 14.12 (2019), e0220091.
- [49] Kiyotaka Sasagawa et al. «Wide field-of-view lensless fluorescence imaging device with hybrid bandpass emission filter». Em: *AIP Advances* 9.3 (2019).
- [50] Qingshan Wei et al. «Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone». Em: *ACS nano* 7.10 (2013), pp. 9147–9155.

-
- [51] Yair Rivenson et al. «Deep learning enhanced mobile-phone microscopy». Em: *Acs Photonics* 5.6 (2018), pp. 2354–2364.
- [52] Yichen Wu et al. «Label-free bioaerosol sensing using mobile microscopy and deep learning». Em: *ACS Photonics* 5.11 (2018), pp. 4617–4627.
- [53] Jonathan W Snow et al. «Rapid imaging, detection, and quantification of *Novosema ceranae* spores in honey bees using mobile phone-based fluorescence microscopy». Em: *Lab on a Chip* 19.5 (2019), pp. 789–797.
- [54] Liliana M. Martelo et al. «Towards the Development of a Low-Cost Device for the Detection of Explosives Vapors by Fluorescence Quenching of Conjugated Polymers in Solid Matrices». Em: *Sensors* 17.11 (2017).
- [55] Hans-Peter Loock e Peter D. Wentzell. «Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications». Em: *Sensors and Actuators B: Chemical* 173 (2012), pp. 157–163.