



EDUARDO GIOMETTI BERTOINA

**PROJETO, CONSTRUÇÃO E APLICAÇÕES
DE CÂMARA ESCURA PORTÁTIL PARA MEDIDAS
DE BIOLUMINESCÊNCIA ULTRA-FRACA**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA E DE COMPUTAÇÃO**

EDUARDO GIOMETTI BERTOINA

**PROJETO, CONSTRUÇÃO E APLICAÇÕES DE CÂMARA ESCURA PORTÁTIL
PARA MEDIDAS DE BIOLUMINESCÊNCIA ULTRA-FRACA**

Orientador: Prof. Dr. Evandro Conforti

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano de Mello Gallep

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia Elétrica, na área de Telecomunicações e Telemática.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO EDUARDO GIOMETTI BERTOINA
E ORIENTADO PELO PROF. DR. EVANDRO CONFORTI

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

B462p Bertogna, Eduardo Giometti, 1963-
Projeto, construção e aplicações de câmara escura portátil para medidas de bioluminescência ultra-fraca / Eduardo Giometti Bertogna. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Evandro Conforti.

Coorientador: Cristiano de Mello Gallep.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação.

1. Biofotônica. I. Conforti, Evandro, 1947-. II. Gallep, Cristiano de Mello, 1974-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Design, construction and applications of a portable dark chamber for ultra-weak bioluminescence measurements

Palavras-chave em inglês:

Biophotonics

Área de concentração: Telecomunicações e Telemática

Titulação: Doutor em Engenharia Elétrica

Banca examinadora:

Evandro Conforti [Orientador]

Antonio Manoel Ferreira Frasson

Humberto Remigio Gamba

Rui Fragassi Souza

Eduardo Tavares Costa

Data de defesa: 03-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Elétrica

COMISSÃO JULGADORA - TESE DE DOUTORADO

Candidato: Eduardo Giometti Bertogna

Data da Defesa: 3 de maio de 2013

Título da Tese: "Projeto, Construção e Aplicações de Câmara Escura Portátil para Medidas de Bioluminescência Ultra-Fraca"

Prof. Dr. Evandro Conforti (Presidente):



Prof. Dr. Antonio Manoel Ferreira Frasson:



Dr. Humberto Remigio Gamba:



Prof. Dr. Rui Fragassi Souza:



Prof. Dr. Eduardo Tavares Costa:



Dedico este trabalho a todos aqueles que se interessarem pelos temas aqui tratados, em especial ao estudo dos Biofótons, que acredito poder trazer grandes avanços nas ciências biomédicas; espero ainda que essa tese possa colaborar de alguma forma no sentido de se avançar rumo a estes objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Evandro Conforti pela oportunidade que me deu ao me aceitar como orientado, pelas palavras de incentivo e presença inspiradora.

Ao Prof. Cristiano de Mello Gallep por me trazer seus amplos conhecimentos da área de biofotônica, pela colaboração na solução de questões práticas que me orientaram na direção a ser seguida.

Ao Departamento Acadêmico de Eletrônica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por me conceder o afastamento para este doutoramento e, assim, oportunizar minha ascensão na carreira docente.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Fotônica Aplicada/FT, Thiago, Jéssica, João e Rodrigo, e em especial ao Samuel por me ajudar a montar a câmara escura, e ainda planejar e executar os experimentos, mas acima de tudo pelo entrosamento de idéias e pensamentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Pesquisas em Comunicações Ópticas e Microondas/FEEC, Rafael, Peterson, Napoleão, Ernesto, Marcelo, Eduardo e Thisien, pelo ambiente acolhedor e de amizade que criam dentro e fora do laboratório.

À esposa Maria e filho Matheus pelo amor, apoio, paciência e por entenderem minha ausência por longos períodos longe de casa nestes últimos quatro anos.

“A realidade é meramente uma ilusão, apesar de ser uma ilusão muito persistente”

(Albert Einstein)

RESUMO

O estudo das emissões de fótons ultra-fracas de amostras biológicas tem se mostrado promissor em áreas como biomedicina, agronomia, ciências dos alimentos e meio ambiente, onde estas emissões se apresentam como um eficiente indicador biológico das condições fisiológicas das amostras e, portanto, uma ferramenta alternativa de análise e diagnóstico a ser explorada. Esta tese de doutorado visou apresentar uma solução em instrumentação para a eficiente medição destas emissões de fótons ultra-fracas e desenvolver aplicações desta em controle ambiental. O sistema de medição é dotado de controle de temperatura da amostra no seu interior, sistema de iluminação para medidas de emissões estimuladas utilizando modernas técnicas de detecção fotônica, integrando-se a um programa de computador na forma de um instrumento virtual que executa funções de controle e pós-tratamento dos dados adquiridos via placa de aquisição microcontrolada. Utilizando-se o sistema de medição projetado, foram realizadas medidas das emissões de fótons de amostras de sementes de trigo em germinação sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação no interior da câmara escura do sistema, tendo sido possível se desenvolver uma metodologia de aplicação das técnicas exploradas, tendo como base a análise comparativa dos padrões temporais das emissões simultâneas de duas amostras biológicas, em duas câmaras idênticas de medição, uma contendo a amostra de controle, e a outra a amostra sob estresse químico. A técnica possibilita correlacionar a presença do contaminante químico com desvios nas emissões de fótons em apenas algumas horas. Os experimentos de emissão estimulada por fonte externa de luz, também aplicados em análises em controle ambiental, se mostraram outra possibilidade, porém estas não foram extensivamente exploradas nesta tese, tendo apenas apresentado resultados preliminares.

Palavras-chave: Biofotônica, Biofótons, Contagem de Fótons, Controle Ambiental, Emissões de Fótons Ultra-Fracas.

ABSTRACT

Studies of ultra-weak photon emissions from biological samples has been shown promising in areas such as biomedicine, agronomy, food science and environmental studies, where those emissions could be used as an efficient biological indicator of the physiological conditions of the samples, and therefore an alternative tool for analysis and diagnostics to be explored. This thesis aimed to present an efficient solution for measuring ultra-weak photon emissions from small biological samples and also develop applications in environmental control. The measuring system, equipped with temperature control of the sample inside it and a lighting system for measuring stimulated emissions, was developed using modern photonic detection techniques, integrated to a computer program as a virtual instrument that performs control and post-processing of the data acquired via a microcontrolled board. Using the measurement system designed, several measurements of ultra-weak photon emissions from wheat seed samples germinating under controlled temperature, humidity and lighting inside the dark space of the system were performed, and it was possible to develop a methodology using the techniques exploited, based on a comparative analysis of simultaneous temporal patterns of the emissions from two biological samples, using two identical measuring chambers, one containing the control sample, and the other the sample under chemical stress. The technique makes it possible to correlate the presence of chemical contaminants with deviations in those photon emissions in a few hours period. Experiments of stimulated emissions by an external source of light, also applied to analysis in environmental control, proved to be another possibility, but these were not extensively explored in this thesis, only submitted as preliminary results.

Keywords: *Biophotonics, Biophotons, Photon Counting, Environmental Control, Ultra-Weak Photon Emissions.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 – Intensidades típicas e métodos de detecção dos biofótons para diversas amostras biológicas, adaptado de [4]..... 6
- Figura 2.2 – Estatísticas das foto-contagens mostrando a distribuição de Poisson, adaptado de [30]. 11
- Figura 2.3 – Comparação entre a distribuição de Boltzmann à temperatura fisiológica T, e a distribuição dos biofótons de uma sistema biológico, mostrando que este último não mostra dependência com a frequência sendo um sistema longe do equilíbrio térmico, cuja temperatura de excitação aumenta linearmente com a frequência, adaptado de [30]. 12
- Figura 2.4 – Evolução da contagem de fótons de sementes de grama em vários estágios de germinação (a). Evolução das contagens de fótons antes e depois da aplicação de estresse físico por esmagamento (b), resfriamento (c) e (d) aquecimento, adaptado de [32]. 13
- Figura 2.5 – DLs das amostras de alga antes (■) e depois (▣) de serem estressadas por (a) aquecimento a 40 °C, (b) atrazina a $3,2 \times 10^{-7}$ M, (c) acetaldeído a 1%, e em (d) efeito da concentração de atrazina nas DLs, adaptado de [17]. 15
- Figura 2.6 – Decaimento das contagens de fótons de emissão espontâneas em padrão hiperbólico para amostras em desidratação por aquecimento de sementes vivas (a), e exponencial para amostras de sementes mortas (b), adaptado de [9]..... 17
- Figura 2.7 – Imagem 2D da emissão de biofótons de uma semente de soja em germinação (a), e em (b) representação esquemática da posição do dano em forma de um X causado na semente, adaptado de [3]. Em (c) e (d) imagem de broto de soja com 5 dias de germinação gerada pela emissão de biofótons, e de foto tirada em baixa iluminação, respectivamente, adaptado de [35]. 19
- Figura 2.8 – Proliferação de células de carcinoma humano TE9 por 93 horas em meio de cultura RPMI 1640 em (a). Em (b) medição da UWPE de células TE9 em meio de cultura (●) e somente do meio de cultura (○). Em (c) espectro da UWPE das células TE9 (●), e do meio de cultura RPMI 1640 (○), adaptado de [1998]. 21

Figura 2.9 – Imagens da UWPE de um voluntário nas posições ventral, dorsal e de seus braços (A, D e G), obtidas por um sistema CCD operando à temperatura criogênica. Em (B, E e H) as correspondentes fotos em baixa iluminação, em (C, F e I) posições escolhidas para a medição usando um sistema com PMT móvel, copyright Elsevier [39].....	23
Figura 2.10 – Imagens da UWPE da face de um voluntário (A) e suas mãos (C), obtidas por um sistema CCD operando à temperatura criogênica. Em (B) e (D) as correspondentes fotos em baixa iluminação, copyright Elsevier [39].	24
Figura 2.11 – Absorção e emissão de fótons por um átomo. Na emissão o átomo passa de um estado de maior energia E_i para o de menor energia menor E_f , na absorção ocorre o contrário.	28
Figura 2.12 – Radiação de corpo negro para 3 temperaturas diferentes (a), o trecho marcado com V mostra o espectro visível. Em (b) o espectro de radiação para temperaturas corporais de 37 e 38 °C, adaptado de [51].	29
Figura 2.13 – Fóton gerado pelo efeito bremsstrahlung.	30
Figura 2.14 – Geração de fótons através da aniquilação de um par elétron-pósitron.	31
Figura 2.15 – Geometria para definição de intensidade radiante, adaptado de [52].....	33
Figura 2.16 – Conformação do DNA e a relação com a intensidade de emissão de biofótons, adaptado de [6].	35
Figura 2.17 – UWPE de raízes de batata doce em várias condições de inoculação por conídias de <i>F. oxysporum</i> , adaptado de [56].	36
Figura 2.18 – Diagrama simplificado de uma PMT (a), e diagrama de circuitos necessários para sua operação (b), adaptado de [52]	39
Figura 2.19 – Diagrama simplificado de uma PMT (a), e diagrama de circuitos necessários para sua operação (b), adaptado de [52].	40
Figura 2.20 – Circuitos usados no modo contagem de fótons de uma PMT, adaptado de [52]. ...	41
Figura 2.21 – Características de transmitância dos materiais usados nas janelas das PMTs, adaptado de [52].	44
Figura 2.22 – Tipos de estruturas de multiplicadores de elétrons, adaptado de [52].	45
Figura 3.1 – Diagrama em blocos esquemático do sistema da câmara escura.....	53

Figura 3.2 – Foto mostrando o sistema real completo, montado na bancada do laboratório, exceto a placa de contagem e o microcomputador.	54
Figura 3.3 – Projeto da câmara escura em AutoCAD.	55
Figura 3.4 – Fotos das partes inferior (a) e superior (b) da câmara, ainda em fase de construção. Em (a) estão mostradas, ainda, as mangueiras de entrada e saída de fluido na câmara de fluido; e em (b) estão mostradas as localizações de fixação do anel iluminador e de alojamento da PMT.	56
Figura 3.5 – Detalhes do mecanismo de proteção da câmara. Em (a) a câmara está aberta, mostrando o local onde a placa de Petri é colocada, a presença do anel de vedação, a entrada de fluido, e o <i>push-button</i> . Em (b) a câmara fechada e o <i>push-button</i> acionado.	57
Figura 3.6 – Detalhes do mecanismo de proteção da câmara. Em (a) a câmara está aberta, mostrando o local onde a placa de Petri é colocada, a presença do anel de vedação, a entrada de fluido, e o <i>push-button</i> . Em (b) a câmara fechada e o <i>push-button</i> acionado.	58
Figura 3.7 – Diagrama em blocos do módulo PMT da Hamamatsu modelo H7360, adaptado de [62].	59
Figura 3.8 – Gráficos da sensibilidade de contagem (a) e ruído de escuro (b) da PMT H7360, adaptado de [62].	59
Figura 3.9 – Foto e desenhos das vistas superior e laterais da placa de contagem de pulsos C8855, mostrando seus conectores e LEDs indicadores, adaptado de [63].	60
Figura 3.10 – Diagrama em blocos da placa de contagem de fótons C8855 da Hamamatsu (a), temporização da dupla contagem (b), adaptado de [63].	61
Figura 3.11 – Iluminador anelar com cabo de fibra óptica usado na câmara, adaptado de Edmund Optics.	62
Figura 3.12 –Foto da fonte de luz e <i>shutter</i> montado acima do acionador (a). Em (b) diagramas dos painéis frontal (acima) e traseiro (abaixo) do acionador do <i>shutter</i>	63
Figura 3.13 – Fotos do aquecedor/refrigerador/bomba marca Julabo (a) e do controlador de temperatura (b).	64
Figura 3.14 – Painel frontal do instrumento virtual feito em linguagem LabVIEW.	66

Figura 3.15 – Diagrama em blocos da solução microcontrolada para a placa de contagem e o controle de iluminação.....	72
Figura 3.16 – Foto do sistema microcontrolado.	72
Figura 3.17 – VI do sistema microcontrolado alternativo..	74
Figura 3.18 – Histogramas dos testes de desempenho do ruído de escuro da câmara escura para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50°C e para intervalos de contagem de 1,0 (a) e 10 segundos (b).....	76
Figura 3.19 – Luminescência retardada da câmara medida para diversas condições de teste. Em (a) para iluminação com 54 lx, e em (b) com 175,6 lx.....	78
Figura 3.20 – Picos iniciais e contagens finais após 90 s das DLs da Figura 3.19 para as diversas condições de teste (a). Em (b) valores finais das contagens após 90 segundos do início dos testes.....	79
Figura 3.21 – Teste comparativo de germinação.	81
Figura 3.22 – Testes simultâneos de germinação em duas câmaras de medição de UWPE idênticas.	82
Figura 3.23 – UWPEs de <i>E. coli</i> e coliformes crescendo dentro da câmara escura por 24 horas. 83	
Figura 4.1 – Testes de germinação com estresse por Hg 0,8 mM, correspondendo à EC ₅₀ . Em (a) teste 1 com medição a partir do 1º dia de germinação - 96 h, onde em (b) está mostrado apenas as 24 h finais deste teste. Em (c) e (d), testes 2 e 3 onde a UWPE foi medida somente as 24 h finais do período de 96 h de germinação.	92
Figura 4.2 – Testes de germinação com estresse por Hg 1,0 mM, correspondendo à EC ₁₀₀ . Somente foi medida a UWPE das 24 h finais das 96 h de germinação.	94
Figura 4.3 – Aproximações lineares dos perfis de emissão de UWPE dos testes de germinação com estresse por Hg EC ₅₀ (a) e EC ₁₀₀ (b). Em (c) correlação entre os coeficientes angulares destas aproximações com os ganhos de biomassa e soma total dos alongamentos das raízes.	96
Figura 4.4 – Fotos mostrando as placas de Petri com as amostras controle (esquerda) e sob estresse por Hg a 1,0 mM (direita).	96
Figura 4.5 – Testes preliminares com sementes de trigo estressadas por NaF 50 mM – EC ₅₀	98
Figura 4.6 – Testes 1 a 4, (a) a (d), da série completa de testes de germinação de sementes de trigo estressadas por NaF 50 mM - EC ₅₀ no 4º dia.....	100

Figura 4.7 – Testes 5 a 10, (a) a (f), da série completa de testes de germinação de sementes de trigo estressadas por NaF 50 mM - EC ₅₀ no 4º dia.	103
Figura 4.8 – Testes 1 a 3 (a) a (d) de germinação de sementes de trigo estressadas por NaF 100 mM - EC ₁₀₀ no 4º dia (24 horas finais de um período de 96 horas). Para o teste 1 as medições de UWPE se iniciaram no 1º dia de germinação (a).	106
Figura 4.9 – Correlação entre os coeficientes angulares das aproximações lineares dos perfis de emissão de UWPE dos testes de germinação com estresse por NaF EC ₅₀ com os ganhos de biomassa e soma total dos alongamentos das raízes para a série completa.	107
Figura 4.10 – Foto mostrando as placas de Petri com as amostras de controle (esquerda) e sob estresse por NaF a 100mM (direita).	109
Figura 4.11 – DLs das amostras de sementes de trigo em germinação após 24, 48, 72 e 96 horas sob ação de soluções de Hg de concentrações 0,1; 0,4 e 1,0 mM além do controle.	113
Figura 4.12 – Ganhos de biomassa e soma total dos comprimentos das raízes, versus concentração das soluções de Hg (a). Em (b) ganhos de biomassa e soma total da contagem dos fótons das DLs em 90 s, versus concentração das soluções de Hg.	115
Figura A.1 – Máquina de estados do VI no estado <i>Inic</i> , quadro 0.	127
Figura A.2 – Estado <i>Inic</i> da máquina de estados, quadro 0.	128
Figura A.3 – Estado <i>Inic</i> da máquina de estados, quadro 1.	129
Figura A.4 – Estado <i>Inic</i> da máquina de estados, quadro 2.	130
Figura A.5 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Loops, Pontos, Intervalo</i>	132
Figura A.6 – Estado <i>Event</i> no quadro 0 do evento <i>Setup</i>	133
Figura A.7 – Evento <i>Setup</i> , quadros 1 e 2.	134
Figura A.8 – Evento <i>ON/OFF</i>	135
Figura A.9 – Evento <i>PID</i>	136
Figura A.10 – Evento <i>Descrição</i>	137
Figura A.11 – Evento <i>Iniciar</i>	138
Figura A.12 – Evento <i>Load</i>	140
Figura A.13 – Evento <i>Save</i>	141
Figura A.14 – Evento <i>Sair</i>	142

Figura A.15 – Estado <i>Start</i> , quadro 0.....	143
Figura A.16 – Estado <i>Start</i> , quadro 1.....	144
Figura A.17 – Estado <i>Start</i> , quadros 2 e 3.	145
Figura A.18 – Estado <i>Start</i> , quadros 2 e 3.	146
Figura A.19 – Quadro 1 da <i>stack sequence</i> interna ao <i>For-Loop</i> do quadro 4 do estado <i>Start</i> . ..	147
Figura A.20 – Quadro 5 do estado <i>Start</i>	148
Figura A.21 – Estado <i>End</i>	149
Figura C.1 – Esquema elétrico do sistema alternativo.....	157
Figura D.1 – Máquina de estados do VI do sistema alternativo no estado <i>Inic</i> , quadro 0.....	159
Figura D.2 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Iniciar</i>	161
Figura D.3 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Sair</i>	162
Figura D.4 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Load</i>	163
Figura D.5 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Dir</i>	164
Figura D.6 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Loops, Nr.Ptos, DT</i>	165
Figura D.7 – Estado <i>Event</i> no evento <i>Descrição</i>	166
Figura D.8 – Estado <i>Start</i> da máquina de estados, quadro 0 da sequência.	167
Figura D.9 – Estado <i>Start</i> da máquina de estados, quadro 1 da sequência.	168
Figura D.10 – Estado <i>Start</i> da máquina de estados, quadro 2 da sequência.	169
Figura D.11 – Estado <i>Start</i> da máquina de estados, quadro 2 da sequência (continuação).	170
Figura D.12 – Estado <i>Stop</i> da máquina de estados.	171

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Dados experimentais de Colli e Facchini [22].....	9
Tabela 2.2 – Dados dos experimentos de Zeiger, adaptado de [9].....	16
Tabela 2.3 – Dados das medições das UWPEs das 12 localizações mostradas nas Figura 2.9 e 2.10 em percentuais do total das contagens, adaptado de [39].	24
Tabela 3.1 – Diferenças entre as versões do módulo H7360.....	58
Tabela 3.2 – Funções da biblioteca C8855api para acesso ao <i>hardware</i> da placa USB de contagem pelo programa de controle.	71
Tabela 3.3 – Estatísticas dos testes de desempenho do ruído de escuro da câmara escura para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50°C com durações de 1 h e 24 h.	77
Tabela 4.1 – Concentrações efetivas EC ₅₀ e EC ₁₀₀ para as soluções de NaF e Hg encontradas nos testes de sensibilidade.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Duas dimensões
BPE	Biophoton Emission
CCD	Charge Coupled Device
CL	Chemiluminescence
DC	Direct Current
DL	Delayed Luminescence
DNA	Desoxirribonucleic Acid
EC	Effective Concentration
EEG	Eletroencefalograma
FBS	Fetal Bovine Serum
FEEC	Faculdade de Engenharia Elétrica e da Computação
FT	Faculdade de Tecnologia
I/O	Input/Output
IR	Infravermelho
LaFA	Laboratório de Fotônica Aplicada
LAPCOM	Laboratório de Pesquisas em Comunicações Ópticas e Microonda
LCD	Liquid Cristal Display
MCP	Micro Channel Plate
PC	Personal Computer
pH	Potencial Hidrogênico
PID	Proporcional Integral Derivativo
PMT	Photomultiplier Tube
RISC	Reduced Instruction Set Computer
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium, meio de cultura de longo termo desenvolvido para células sanguíneas
RS232	Padrão de comunicação serial definido pela Electronics Industries Association
SNR	Signal to Noise Ratio
SPC	Single Photon Counting
TTL	Transistor-Transistor Logic
USB	Universal Serial Bus

UV	Ultravioleta
UWPE	Ultra-Weak Photon Emission
VI	Virtual Instrument

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XXV
SUMÁRIO.....	XXVII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	1
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	2
1.3 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES.....	3
1.4 ESTRUTURA DA TESE	3
2 REVISÃO TEÓRICA	5
2.1 OS BIOFÓTONS	5
2.1.1 Breve histórico dos biofótons.....	7
2.1.1.1 A radiação mitogenética de Gurwitsch.....	7
2.1.1.2 Strehler & Arnold e a UWPE de algas.....	8
2.1.1.3 Colli & Facchini e a UWPE de sementes	8
2.1.1.4 Fritz Albert Popp e o campo coerente	10
2.2 APLICAÇÕES DAS MEDIDAS DE UWPE	12
2.2.1 UWPE de sementes submetidas à estresse físico	12
2.2.2 DL de algas submetidas a estresse químico	14
2.2.3 UWPE em estudos de viabilidade de sementes	16
2.2.4 DETECÇÃO DA UWPE EM 2D	18
2.2.5 UWPE em oncologia.....	20
2.2.6 UWPE de partes do corpo humano	22
2.2.7 UWPE em microorganismos.....	25
2.3 PROVÁVEIS MECANISMOS DE GERAÇÃO DOS BIOFÓTONS.....	26

2.3.1 Conceituação de fóton.....	26
2.3.2 Geração de fótons	27
2.3.2.1 Emissão de linha	27
2.3.2.2 Radiação térmica	28
2.3.2.3 Efeito bremsstrahlung	30
2.3.2.4 Aceleração de uma carga elétrica.....	30
2.3.2.5 Aniquilação de pares de matéria e antimatéria	31
2.3.3 Caracterização de uma fonte de luz	31
2.3.3.1 Fluxo radiante e energia radiante	31
2.3.3.2 Irradiância, Emitância, Intensidade Radiante e Radiância.....	32
2.3.4 Teorias acerca da origem dos biofótons.....	33
2.3.4.1 Formação de espécies reativas de oxigênio como fonte de biofótons	33
2.3.4.2 DNA como fonte de biofótons	34
2.3.4.3 Mecanismos de defesa biológica como fonte de biofótons	35
2.3.4.4 Teoria da imperfeição	36
2.4 INSTRUMENTAÇÃO PARA A DETECÇÃO DOS BIOFÓTONS	37
2.4.1 A válvula fotomultiplicadora.....	37
2.4.1.1 Funcionamento da válvula fotomultiplicadora	38
2.4.1.2 PMT em contagem de fótons.....	40
2.4.2 Características construtivas das PMTs	41
2.4.2.1 Fotocatodo	41
2.4.2.2 Janela óptica da PMT.....	43
2.4.2.3 Dinodos	44
2.4.3 Especificações técnicas das PMTs	46
2.4.3.1 Resposta espectral da PMT	46
2.4.3.2 Eficiência de captação e eficiência de detecção	49
2.4.3.3 Ganho da PMT.....	49
2.4.3.4 Corrente de escuro	50
2.4.3.5 Relação Sinal/Ruído	51
2.4.3.6 Linearidade, uniformidade e estabilidade.....	51
3 PROJETO E TESTES DO SISTEMA	53
3.1 ARQUITETURA DO SISTEMA	53

3.1.1 Projeto da parte mecânica da câmara escura	54
3.1.2 Projeto eletrônico e fotônico	57
3.1.2.1 Módulo PMT	57
3.1.2.2 Placa USB de contagem de fótons	60
3.1.2.3 Subsistema de iluminação	62
3.1.2.4 Controlador PID de temperatura.....	63
3.1.3 Projeto do programa de controle em LabVIEW	65
3.1.3.1 Descrição da interface com o usuário	66
3.1.3.2 Estrutura do programa de controle	68
3.1.3.3 Acesso ao hardware da placa de contagem	70
3.2 SISTEMA ELETRÔNICO ALTERNATIVO	71
3.2.1 Programa de controle do sistema alternativo	73
3.2.1.1 Descrição da interface com o usuário do sistema alternativo.....	74
3.3 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA CÂMARA ESCURA.....	75
3.3.1 Testes de ruído de escuro em função da temperatura.....	75
3.3.2 Testes de luminescência retardada.....	77
3.3.3 Testes comparativos de germinação.....	80
3.3.4 Testes de germinação simultâneos.....	81
3.3.5 Testes comparativos com microorganismos.....	82
4 ENSAIOS BIOFOTÔNICOS APLICADOS EM CONTROLE AMBIENTAL.....	85
4.1 MOTIVAÇÃO	85
4.2 UWPE E DL DE SEMENTES COMO INDICADOR BIOLÓGICO	85
4.3 UWPE DE SEMENTES SOB ESTRESSE QUÍMICO	86
4.3.1 Testes de sensibilidade	86
4.3.2 Procedimento experimental	87
4.3.3 Resultados dos testes de germinação sob estresse por Hg.....	90
4.3.3.1 UWPE dos testes com Hg 0,8 mM (EC ₅₀)	90
4.3.3.2 UWPE dos testes com Hg 1,0 mM (EC ₁₀₀).....	92
4.3.3.3 Tratamento dos dados de UWPE dos testes com Hg.....	94
4.3.3.4 Foto das placas controle e estresse para Hg a 1,0 mM.....	96
4.3.3.5 Discussão dos testes de estresse por Hg	97
4.3.4 Resultados dos testes de germinação sob estresse por NaF.....	98

4.3.4.1 UWPE dos testes com NaF 50 mM (EC_{50})	98
4.3.4.2 UWPE dos testes com NaF - 100 mM (EC_{100}).....	104
4.3.4.3 Tratamento dos dados de UWPE dos testes com NaF	106
4.3.4.4 Análise estatística dos dados da série de testes de estresse por NaF.....	107
4.3.4.5 Foto das placas controle e estresse para NaF a 100 mM.....	109
4.3.4.6 Discussão dos testes de estresse por NaF	109
4.3.5 DL de sementes em germinação sob estresse químico por Hg	110
4.3.5.1 Procedimento experimental.....	110
4.3.5.2 Resultados dos testes de DL após 24, 48, 72 e 96 h	111
4.3.5.3 Resultados das medições do ganho de biomassa e comprimento das raízes	114
4.3.5.4 Discussão sobre os resultados dos testes de DL	115
5 CONCLUSÕES.....	117
REFERÊNCIAS.....	119
APÊNDICES.....	125
APÊNDICE A – DIAGRAMAS EM BLOCOS DO PROGRAMA EM LABVIEW	127
APÊNDICE B – CÓDIGO FONTE EM C DO FIRMWARE DO SISTEMA ALTERNATIVO.....	151
APÊNDICE C – ESQUEMA ELÉTRICO DO SISTEMA ALTERNATIVO.....	157
APÊNDICE D – DIAGRAMAS EM BLOCOS DO VI DO SISTEMA AVR	159
APÊNDICE E – PUBLICAÇÕES	173

1 INTRODUÇÃO

Neste século XXI a Biofotônica, ciência de fronteira que trata da interação entre luz e matéria biológica, alcançou uma dimensão quase inimaginável há várias décadas atrás, especialmente graças à incorporação dos recentes avanços tecnológicos das áreas da eletrônica, fotônica e da computação, e esperam-se inovações ainda maiores nas próximas décadas com os novos desenvolvimentos nestas áreas. Sendo uma ciência interdisciplinar, físicos, químicos, engenheiros e pesquisadores de diversas áreas da biologia e da medicina têm se dedicado, redundando grandes benefícios à sociedade. Soluções inovadoras dotadas de alto grau de sofisticação estão presentes em sistemas de diagnósticos por imagens e instrumentos da medicina terapêutica [1] dentre uma infinidade de outras contribuições.

Outros problemas, no entanto, estão na fronteira entre ciência e tecnologia como aqueles que tratam da medição e estudo das Emissões Ultra-Fracas de Fótons (do idioma inglês: *Ultra-Weak Photon Emissions* - UWPE) provenientes de seres vivos, emissões estas também conhecidas como bioluminescência ultra-fracas ou ainda “biofótons”. Estas emissões podem ser tanto espontâneas como estimuladas, como detalhado no Capítulo 2, e esta tese de doutorado trata exatamente desta questão.

1.1 OBJETIVOS

O principal objetivo desta tese foi desenvolver uma aplicação das medições das emissões ultra-fracas de fótons de sementes em germinação usadas como indicador biológico, tendo a viabilidade de ser usada na área de controle e monitoramento de uma possível contaminação ambiental. Para tanto, foi desenvolvida uma instrumentação aplicada a estas medições de bioluminescência ultra-fracas, tanto de natureza espontânea como estimuladas, para uso com amostras biológicas de tamanho reduzido, tais como sementes em germinação e bactérias em crescimento.

Estes organismos sob estudo poderão, assim, serem usados como indicadores biológicos, através das medições de suas bioluminescências ultra-fracas em resposta a variáveis ambientais.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Tendo apoio financeiro da Fapesp, Fotonicon, CEPOF-Fapesp e CNPq, a primeira etapa do projeto de tese tratou da concepção e implementação da câmara escura portátil dotada dos sistemas eletrônicos e fotônicos necessários para a aquisição dos dados de contagem de fótons das emissões de bioluminescência ultra-fracas. Esta instrumentação teve como elemento central um módulo constituído de uma válvula foto-multiplicadora (do idioma inglês: *Photomultiplier Tube* - PMT) de baixo ruído e demais circuitos eletrônicos, que foram associados a um programa de controle feito em ambiente LabVIEW, integrando assim um sistema automático capaz de fazer aquisições de dados de contagens de fótons provenientes de amostras biológicas de tamanho reduzido (acomodadas em uma placa de Petri de tamanho máximo de 10 cm de diâmetro) colocadas no interior da câmara escura. Tal desenvolvimento se deu nas dependências tanto do LAP-COM/FEEC/Campinas como do LaFA/FT/Limeira.

A instrumentação projetada e implementada contou, ainda, com um controlador de temperatura microcontrolado do tipo proporcional-integral-derivativo para a manutenção da temperatura da amostra biológica sob experimentação, além de controle da iluminação de excitação para ensaios de bioluminescência ultra-fracas estimulada e, por fim, controle de tensão/corrente de alimentação da válvula fotomultiplicadora, controles estes implementados no programa em LabVIEW. O programa permite que o usuário determine o período de tempo da aquisição, proporciona salvamento automático de dados a cada período por este especificado, e ainda aciona/desaciona a fonte de alimentação do módulo PMT de forma automática.

Os dados adquiridos pelo sistema de contagem de fótons em experimentações com sementes de trigo em germinação sob estresse químico e micro-organismos do tipo coliformes, após transferidos para um computador pessoal, através de uma placa de contagem do tipo USB, foram então analisados/processados posteriormente empregando o programa *OriginLab* focando em aplicações da área de controle ambiental, o que resultou na publicação de 3 artigos em conferências internacionais e um em revista de grande fator de impacto.

1.3 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES

As principais contribuições desta tese de doutorado são as seguintes:

- Apresentou o projeto, implementação e validação de um protótipo portátil de câmara escura para medidas de contagens de fótons ultra-fracas. O protótipo é dotado de dispositivos eletrônicos e fotônicos, e programa de controle automático capaz de se constituir em uma solução versátil para as aplicações na área de controle ambiental;
- Validar o uso do sistema desenvolvido em aplicações na área de controle ambiental, tanto com medidas de bioluminescência espontânea como estimulada; estas últimas através de um sistema constituído de fonte de luz e anel iluminador provido de fibra óptica para conduzir a luz ao interior da câmara escura e obturador/acionador para controlar a iluminação;
- Apresentou uma metodologia de uso da técnica biofotônica em controle de qualidade de água a partir do resultado dos experimentos biofotônicos realizados na germinação de sementes de trigo em condições de estresse químico por aplicação de soluções de mercúrio e de fluoreto, sendo as sementes em germinação usadas como indicador biológico para se avaliar as condições sanitárias da água;

1.4 ESTRUTURA DA TESE

Neste capítulo introdutório foram apresentados a motivação da tese, seus objetivos, materiais e métodos simplificados e as principais contribuições obtidas. Dando prosseguimento ao desenvolvimento da tese, os seguintes capítulos são sinteticamente descritos a seguir:

- No Capítulo 2, é apresentada uma revisão teórica, abordando questões que dizem respeito à natureza da bioluminescência ultra-fracas, suas características, prováveis origens e uma breve revisão histórica. Em seguida, as principais aplicações da medição deste sinal são abordadas, dando destaque aos principais trabalhos publicados na área;

- No Capítulo 3, é apresentada uma descrição funcional e detalhes da implementação da câmara escura, dando destaque aos sistemas eletrônico e fotônico, e ao programa de controle em LabVIEW. São apresentados também dados da avaliação de desempenho da câmara escura, no tocante ao ruído de contagem de escuro medidos para várias temperaturas de operação, assim como resultados de desempenho em medições de luminescência atrasada para diversas condições de testes;
- No Capítulo 4, os resultados dos experimentos utilizando a câmara escura implementada em testes de germinação de sementes de trigo em condições de estresse químico são apresentados, com o enfoque nas aplicações em controle de qualidade de água. Algumas medições de emissões estimuladas de curta duração de amostras de semente de trigo estressadas por diferentes concentrações de uma solução de mercúrio por períodos de 24/48/72 e 96 horas, são também apresentadas de forma preliminar, porém mostrando resultados bastante interessantes;
- No Capítulo 5, as conclusões finais do trabalho de tese são apresentadas, juntamente com as perspectivas de trabalhos futuros;
- Como apêndices são fornecidos o esquema elétrico e o código fonte em C do *firmware* da placa de contagem de fótons desenvolvida, os códigos em linguagem G (LabVIEW) das implementações dos programas de controle, e por fim artigos publicados durante o trabalho de tese.

2 REVISÃO TEÓRICA

2.1 OS BIOFÓTONS

Emissões de Biofótons (*Biophotons Emissions* - BPE) são emissões de fótons extremamente fracas, porém permanentes, detectadas em todos os organismos vivos, sendo caracterizadas por uma emissão eletromagnética espontânea cobrindo a faixa contínua da luz visível e estendendo-se, ainda, até o ultravioleta e o infravermelho próximo, ou seja, algo em torno de 200 a 850 nm, e intensidades que variam de dezenas até milhares de $fótons.cm^{-2}.s^{-1}$, ou de 10^{-16} a $10^{-18} W/cm^2$ [2, 3].

Os biofótons não podem ser confundidos com a radiação de calor na faixa do infravermelho, que segue uma distribuição de Boltzmann, nem com bioluminescência comum, de origem fotoquímica, que algumas espécies de peixes de mar profundo e vagalumes exibem, em geral empregando proteínas fluorescentes, e/ou as enzimas da classe luciferase que catalisam esta bioluminescência.

Outro tipo de emissão de fótons ultra-fracas de origem comum à dos biofótons é a Emissão Estimulada ou Luminescência Retardada (no idioma inglês: *Delayed Luminescence* - DL), que aparece após a estimulação da amostra biológica por uma fonte de luz, produzindo uma radiação re-emitida que apresenta longos tempos de duração, da ordem de minutos a horas, se comparado com a fluorescência normal, que tipicamente dura microsegundos apenas; além disto, ela apresenta um perfil de decaimento hiperbólico bastante distinto em relação a amostras inanimadas que apresentam decaimento exponencial. Ao término da DL, a emissão de fótons ultra-fracas da amostra biológica volta ao estado estacionário de sua emissão espontânea de biofótons que as caracterizam.

A Figura 2.1 apresenta em diagrama um comparativo entre os biofótons e a luz visível em termos de intensidade para vários tipos de amostras biológicas e os possíveis métodos de detecção.

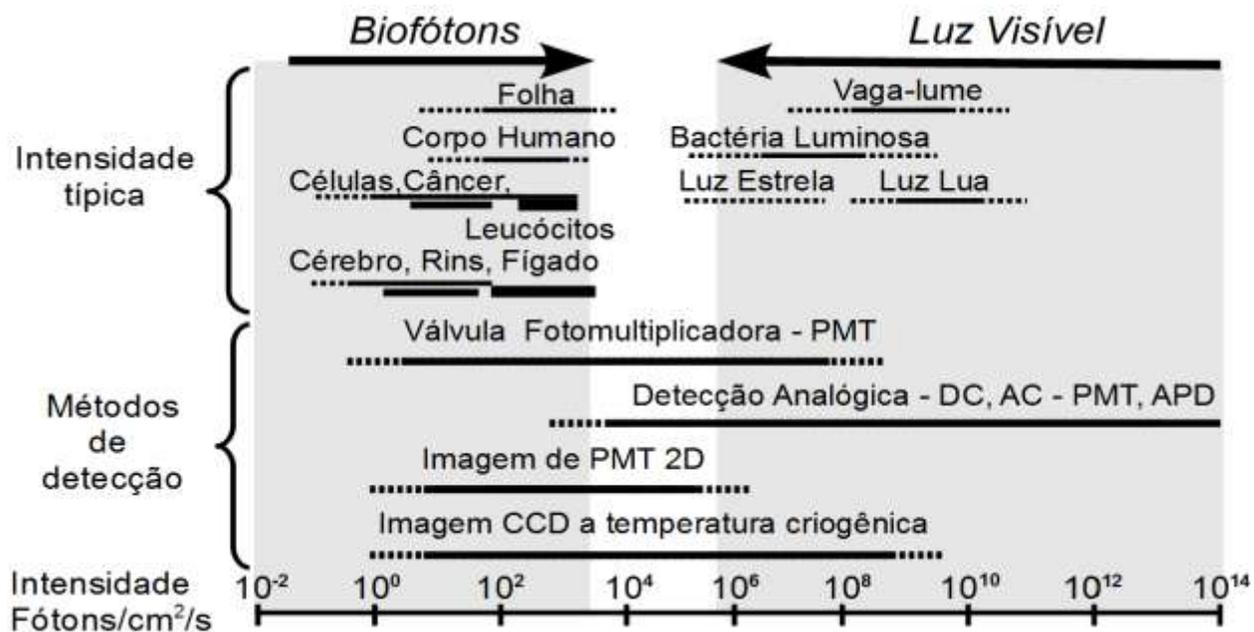


Figura 2.1 – Intensidades típicas e métodos de detecção dos biofótons para diversas amostras biológicas, adaptado de [4].

As áreas de estudo em que as medições da BPE e DL podem ser encontradas abrangem, em geral, linhas de pesquisas de caráter multidisciplinar, e em especial em:

- **Biomedicina**
 - Estudo de tecidos [5];
 - Estudos em genética [6];
 - Oncologia - testes em tecidos tumorais [7];
 - Pesquisas básicas [8].
- **Agronomia e Ciência dos Alimentos**
 - Viabilidade de sementes [9, 10, 11, 12];
 - Testes de qualidade de alimentos [13, 14];
 - Efeitos de poluentes [15];
 - Pesquisas básicas em citologia [16].
- **Meio Ambiente**
 - Análise de qualidade de água [17];
 - Estudos da ação de contaminantes em recursos hídricos [17, 18];
 - Testes ecotoxicológicos [19];
 - Testes biológicos de tolerância a influências externas [12].

O termo Biofótons, criado pelo biofísico Fritz Albert Popp em 1976, apresenta outras denominações na literatura tais como: Emissão de Fótons Ultra-Fraca (*Ultra-Weak Photon Emission* - UWPE), Bioluminescência Ultra-Fraca, Luminescência de Baixo Nível, Luminescência Escura, Quimioluminescência, Bioluminescência e Radiação Mitogenética. Para evitar confusões os termos Biofótons - *Biophotons Emissions* (BPE) e Emissão de Fótons Ultra-Fraca - *Ultra-Weak Photon Emissions* (UWPE) serão adotados neste documento.

As possíveis origens destas emissões de fótons pelos seres vivos ainda não é totalmente conhecida, mas há fortes indícios que tais emissões estejam relacionadas com a atividade metabólica celular [3]. Algumas destas teorias serão abordadas mais adiante na seção 2.3.4.

2.1.1 Breve histórico dos biofótons

2.1.1.1 A radiação mitogenética de Gurwitsch

A história dos Biofótons se remete a 1923, com as observações do ilustre médico e histologista ucraniano, Alexander Gavrilovich Gurwitsch (1874-1954) no campo da Morfogênese, ramo da Embriologia que tenta modelar tecidos, órgãos e organismos, do ponto de vista da forma que irão tomar. Gurwitsch teorizou a existência de um tipo de radiação que controlava o processo de divisão celular. Tal radiação foi denominada “Radiação Mitogenética”, em razão do princípio que a induzia ser de natureza exógena. Por não ser explicada pela ação de alguma substância química, mas na forma de um campo, que ele denominou de “Campo Morfogenético”, induzindo mitose nas células. Gurwitsch comprovou a natureza física da Radiação Mitogenética através do uso de filtros de vidro e quartzo, e do isolamento químico entre a amostra indutora e a amostra detectora.

Gurwitsch observou ainda, a existência de uma relação entre a frequência da divisão celular e a área superficial das células meristêmicas [20]. Ele conduziu o primeiro experimento para a comprovação da sua teoria em 1923, usando para isto 130 pares de raízes de cebolas. Ao colocar uma raiz indutora a uma distância de 1,5 a 2,0 mm da superfície do meristema da raiz detectora, durante 1 a 2 horas, ele observou um incremento de 20 a 25 % na mitose da zona "iluminada" em relação a outras partes do meristema, e em relação ao grupo de controle.

Nas duas décadas seguintes muitos artigos científicos e alguns livros foram editados sobre o assunto, principalmente na Rússia, Alemanha, França, e Itália, e os trabalhos de maior relevância, e com valiosos dados sobre o assunto, no entanto, foram escritos em idioma Russo, inacessível à comunidade científica da época. Com a eclosão da 2ª Grande Guerra e a destruição da Alemanha e Rússia, houve um declínio nas pesquisas da Radiação Mitogenética. Outro motivo deste declínio foi, a publicação de experimentos de pesquisadores que ao tentarem reproduzir os resultados de Gurwitsch obtiveram resultados contraditórios, principalmente por não usarem o método experimental adequado, usando detectores físicos como chapas fotográficas e detectores Geiger sensível a UV.

2.1.1.2 Strehler & Arnold e a UWPE de algas

Embora o advento da Válvula Fotomultiplicadora (PMT), capaz de detectar fótons, tenha ocorrido em 1936, na *RCA Corporation*, esta se tornou uma forma efetiva de comprovação da existência da Radiação Mitogenética somente na década de 1950. Portanto, na década de 1950, que a comunidade científica retomou o interesse no assunto. Os primeiros estudos conduzidos para a detecção de fótons emitidos por plantas, incluindo 3 tipos de algas, se devem a Bernard L. Strehler e William Arnold, no ano de 1951 [21].

2.1.1.3 Colli & Facchini e a UWPE de sementes

As primeiras medições de biofótons em sementes foram realizadas por Colli e Facchini em 1954 [22, 23], utilizando sementes de trigo, milho, feijão e lentilha. As medições se deram no sexto dia de germinação em placas de Petri e no escuro, para evitar a formação de clorofila e a consequente ocorrência de fosforescência de cor vermelha, característica da clorofila. As amostras continham quantidades iguais (60 g) que foram sendo hidratadas regularmente.

O dispositivo usado na contagem de fótons era constituído de uma câmara escura com PMT refrigerada por água circulante nos experimentos com trigo, e gelo seco e acetona nos demais, sendo as temperaturas estabilizadas em 30 °C e 22 °C, respectivamente. Algumas das amostras de sementes de milho foram esterilizadas com solução de HgCl_2 a 0,3 % durante 20 minutos

para garantir que estivessem livres de colônias de bactérias; porém, Colli e Facchini não observaram contagens de fótons diferentes das amostras não esterilizadas, levando-os a concluir que os fótons detectados não eram oriundos de bactérias luminescentes.

Na Tabela 2.1, a seguir, estão apresentados os dados obtidos nos experimentos de germinação conduzidos por Colli e Facchini, em 1954. Estes dados mostraram serem as sementes de milho as que produziram as maiores contagens de fótons. Além disto, o ruído de escuro produzido na temperatura de 30 °C é bastante superior que em 22 °C.

Tabela 2.1 – Dados experimentais de Colli e Facchini [22].

Amostra (60 g)	Temp. (°C)	Contagem Total/min	Contagem Ruído/min	Contagem Líquida/min
Trigo	30	7.936	4.608	3.328
Lentilha	22	7.680	1.024	6.556
Milho	22	11.520	1.280	10.240
Milho estéril	22	8.960	1.280	7.680

Em outra série de experimentos, Colli e Facchini moeram diferentes partes das plantas (caules, raízes e sementes sem casca) no 6º dia de germinação, e as polpas homogêneas resultantes em porções de 10 g foram diluídas em água, numa razão de 5:1, e levadas à câmara escura por 25 min à temperatura de 20 °C. Os resultados mostraram contagens três vezes superiores nas raízes se comparadas ao caule e sementes sem casca. Nesta série de experimentos eles observaram também a forte dependência da temperatura na intensidade da emissão, aumentando para temperaturas de até cerca de 60-70 °C, e então diminuiu rapidamente. Finalmente, Colli e Facchini observaram o resultado da adição de 1,0 cm³ de uma solução de H₂O₂ em concentração de 1/30.000 a 20 g da polpa e constataram que a emissão de fótons sofreu um incremento de 10 vezes. Através do uso de filtros, Colli e Facchini ainda puderam mensurar a faixa de espectro da luz emitida, que se concentraram em maior grau na faixa de comprimentos de onda entre 450 e 650 nm.

2.1.1.4 Fritz Albert Popp e o campo coerente

O proeminente biofísico, pesquisador e professor alemão Fritz Albert Popp, fundador do *International Institute of Biophysics* (IIB) em Neuss, Alemanha, que congregou até 2010 uma rede de pesquisadores de mais de 10 países, e aos estudos da área de biofotônica, é uma personalidade importante no campo da biofotônica que desde 1970 estuda as emissões de biofótons.

A conceituação de Popp acerca das emissões de biofótons é bastante robusta, e se baseia tanto em resultados experimentais como teóricos, tendo o apoio de renomados cientistas como o físico Herbert Fröhlich, membro da *Royal Society* de Londres, e Ilya Prigogine prêmio Nobel de química de 1977, entre outros.

Popp considera os biofótons como um campo coerente de fótons¹, originado dentro de sistemas vivos, proporcionando a comunicação inter e intracelular necessária à regulação de funções biológicas, tais como: crescimento e diferenciação, mecanismos de defesa e reparo de danos, entre outras atividades bioquímicas [2, 25]. Existem muitos artigos que dão suporte à sua teoria, como por exemplo, aqueles que tratam da estatística das foto-contagens que se mostra na forma de uma distribuição de probabilidades de Poisson [26, 27, 28], própria de um campo coerente, como se vê na Figura 2.2, onde estão mostrados alguns resultados destas estatísticas para vários organismos diferentes.

Outra evidência de que os biofótons de fato se constituem em um campo coerente baseia-se na análise da luminescência retardada produzida por um sistema biológico vivo após ser submetido à iluminação. O decaimento hiperbólico ($1/t$) produzido pela luminescência, ao invés de exponencial ($e^{-t/T}$, T =constante de decaimento), é característica de um processo coerente e não aleatório [29].

As características da estatística de Poisson e o decaimento hiperbólico da luminescência retardada, juntas são condições suficientes para um campo completamente coerente [30].

¹ Campo coerente, conceito introduzido por Schrödinger em 1926 [24], é o equivalente da mecânica quântica à onda eletromagnética clássica monocromática.

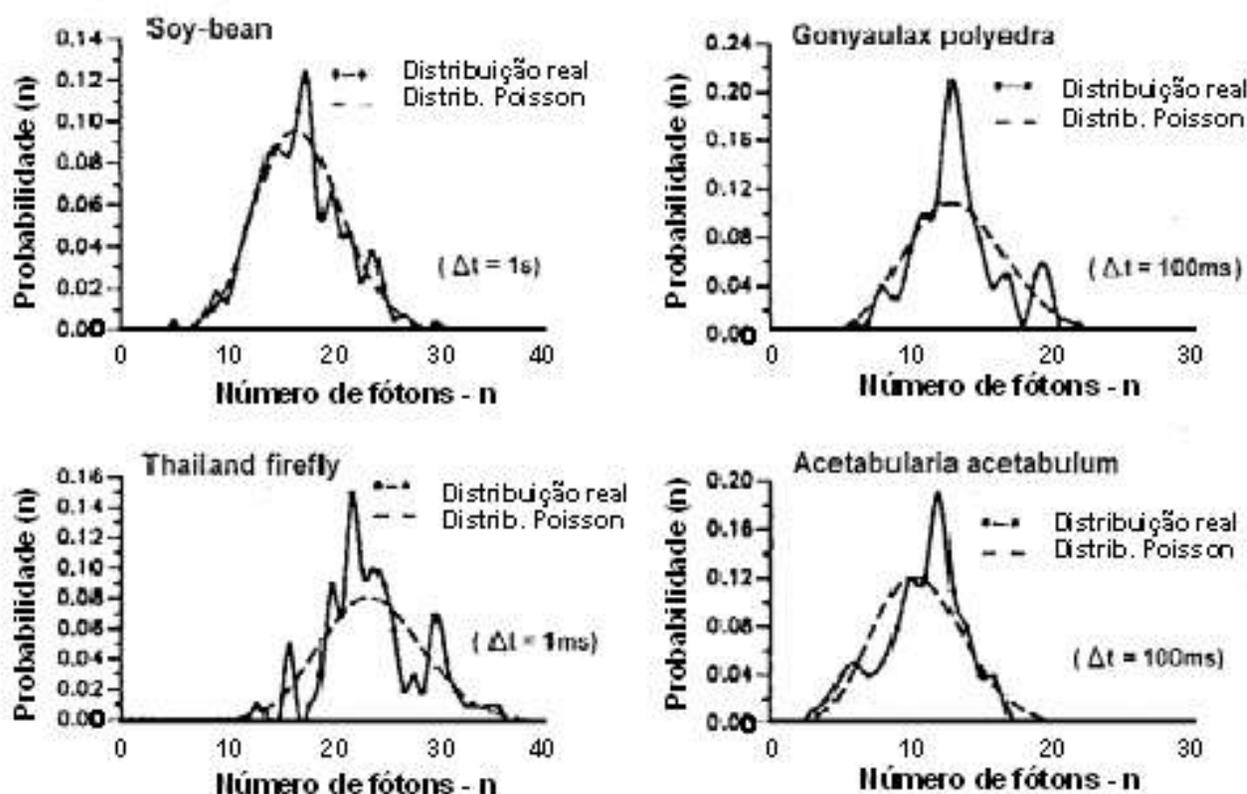


Figura 2.2 – Estatísticas das foto-contagens mostrando a distribuição de Poisson, adaptado de [30].

A argumentação de Popp de que este campo coerente de fótons promove a regulação dos processos biológicos dentro da célula reside no fato de que dentro de uma célula humana típica ocorrem 100.000 reações químicas por segundo, e sendo estas reações ativadas pela presença de enzimas específicas, e de um campo de fótons apropriado, fótons de origem térmica seriam insuficientes para a ativação destas reações químicas. Popp, através de dados experimentais, provou que os biofótons são a única fonte de fótons capaz de ativar esta quantidade imensa de reações químicas, ocorrendo no lugar certo e no instante certo [31]. Seus experimentos com sementes de pepino em germinação mostraram que os biofótons disponibilizam da ordem de 10^{10} a 10^{20} mais fótons que um campo de fótons de origem térmica a temperaturas fisiológicas. Esta constatação se baseia na distribuição espectral da emissão de biofótons, que se apresenta plana dentro de uma faixa entre 300 a 800 nm, caracterizando assim um sistema longe do equilíbrio térmico, já que a probabilidade de ocupação $f(\nu)$ dos estados excitados não segue a distribuição de Boltzmann²,

² Um sistema em equilíbrio térmico segue a distribuição de Boltzmann $f(\nu) = e^{-h\nu/k_B T}$, onde: $h\nu$ é a energia do fóton e $k_B T$ é a energia térmica, detalhes são dados na seção 2.3.2.

mas excede esta de um fator de 10^{10} na faixa do vermelho e de até 10^{40} na faixa do UV (Figura 2.3). Essa distribuição espectral mostra que a temperatura de excitação aumenta linearmente com a frequência ν , chegando a assumir valores entre 400 e 1000 K.

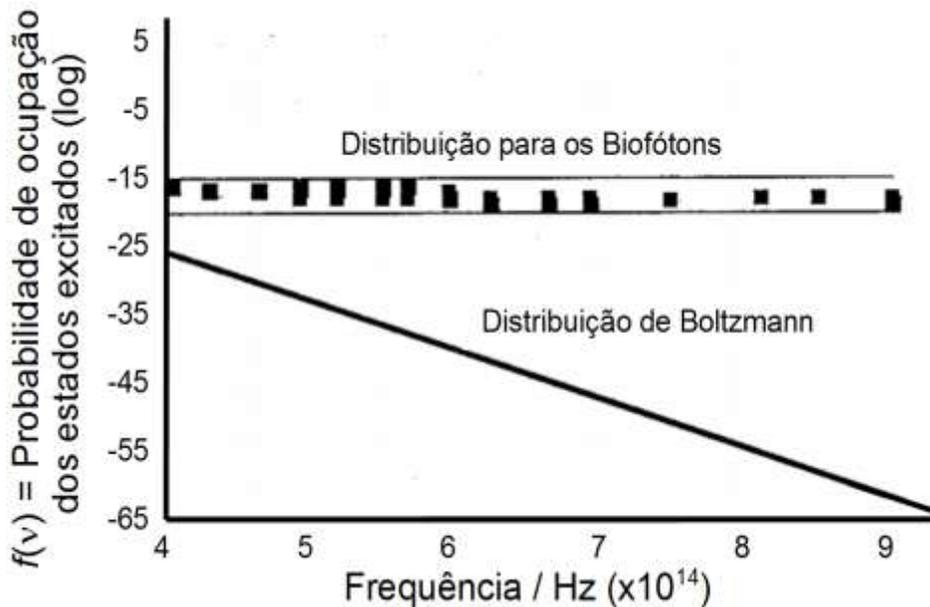


Figura 2.3 – Comparação entre a distribuição de Boltzmann à temperatura fisiológica T , e a distribuição dos biofótons de uma sistema biológico, mostrando que este último não mostra dependência com a frequência sendo um sistema longe do equilíbrio térmico, cuja temperatura de excitação aumenta linearmente com a frequência, adaptado de [30].

2.2 APLICAÇÕES DAS MEDIDAS DE UWPE

2.2.1 UWPE de sementes submetidas à estresse físico

R. P. Bajpai et al., no artigo intitulado: *Ultraweak Photon Emission in Germinating Seeds: A Signal of Biological Order* [32], relatam resultados de medições de UWPE de sementes de grama em vários estágios de germinação, e destas antes e depois de serem submetidas à estresses físicos por esmagamento, resfriamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min) e aquecimento ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min). Estes resultados, mostrados na Figura 2.4, apresentaram variações entre os vários estágios de germinação e também entre os resultados antes e depois da aplicação do estresse físico.

As medidas de UWPE sem estresse foram feitas em 3 séries, e as sementes permaneceram durante 9 dias submetidas a luz de intensidade constante antes de serem colocadas na câmara escura. Os resultados mostraram variações entre os vários estágios de germinação, porém um padrão comum pôde ser verificado, como o mostrado na Figura 2.4 (a).

As medições da UWPE antes e após aplicação de estresse físico estão mostradas na Figura 2.4 (b) para os estresses por esmagamento, (c) resfriamento e (d) aquecimento. Os autores explicaram que as diferenças nos padrões das emissões, antes e depois do estresse físico, se devem às mudanças na ordem da organização espaço-temporal da semente, alterando ou mesmo cessando, processos metabólicos inerentes a estas. Todas as três figuras apresentaram padrões similares, ou seja, após o estresse a emissão inicial é mais lenta, além de ser mais intensa.

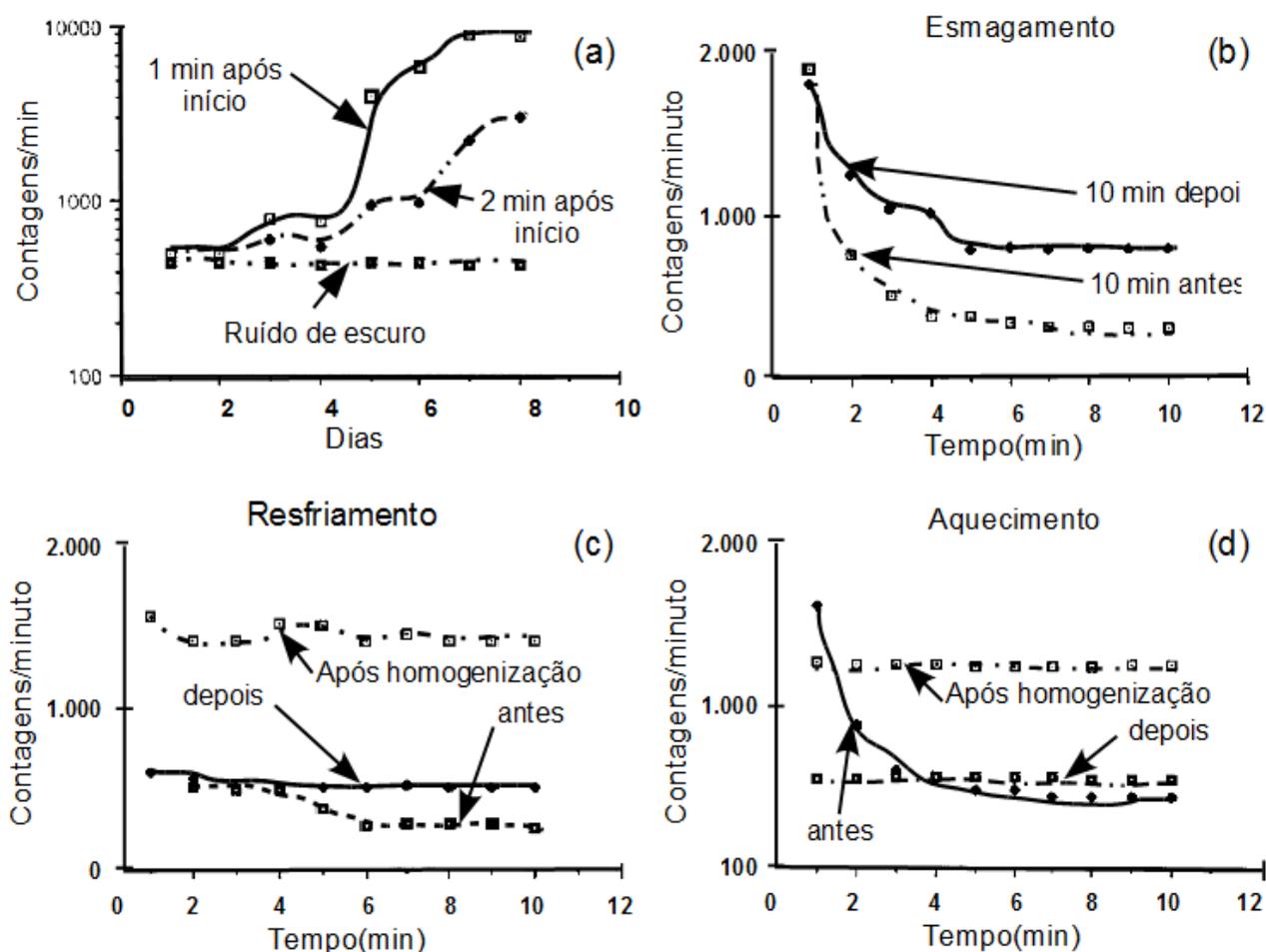


Figura 2.4 – Evolução da contagem de fótons de sementes de grama em vários estágios de germinação (a). Evolução das contagens de fótons antes e depois da aplicação de estresse físico por esmagamento (b), resfriamento (c) e (d) aquecimento, adaptado de [32].

Wang e Yu [13] estudaram as correlações existentes entre tempo de armazenamento de sementes de trigo, dose de radiação gama aplicada a estas, com a intensidade de emissão UWPE e a taxa de germinação. Estas medidas mostraram que UWPE pode ser usada para determinar o vigor de sementes de trigo. Eles mostraram ainda que, aumentando a dose irradiada, aumenta a emissão de UWPE, mas o tempo de armazenagem destas não produziu o mesmo efeito.

2.2.2 DL de algas submetidas a estresse químico

A possibilidade de análises de qualidade de água através de detectores biológicos, associado à característica de emissão da UWPE em resposta a quantidades extremamente pequenas de contaminantes químicos, foi demonstrada no artigo de Scordino et al. [17], através da medição da luminescência retardada de uma espécie de alga unicelular marinha gigante (*Acetabularia acetabulum*), quando estressadas por traços de atrazina e acetaldeído. Estas algas, cujo tamanho varia entre 1,5 e 4 cm, foram colocadas em água comum acrescida de sal marinho e atrazina em concentrações entre $3,2 \times 10^{-11}$ e $3,2 \times 10^{-6}$ M, diferindo uma da outra de uma ordem de grandeza, e mantidas em um ciclo de escuro-claro de 12 h - 12 h à temperatura controlada em 20 °C, o mesmo sendo feito com acetaldeído a 1 %. As DLs foram medidas com duração de 150 s, intervalos de contagem de 100 ms, e ocorrendo 30 min após as amostras individuais de algas, em 12 ml do meio de cultura, serem colocadas no interior da câmara escura dotada de PMT resfriada a -20 °C. A iluminação das amostras foi feita através de LEDs em 3 comprimentos de onda (565, 585 e 660 nm).

Os gráficos da Figura 2.5 relativos a estes experimentos, demonstraram uma clara mudança nas características das DLs entre as amostras sem ação estressante e sob estresse químico. Pode-se observar que houve mudanças tanto em relação à intensidade da DL, quanto em relação ao decaimento inicial desta, e quanto mais agressivo o agente estressante, maior a mudança observada nestes gráficos. Na Figura 2.5 (d), pode-se ver como a DL varia para diferentes concentrações do contaminante atrazina, afetando tanto à intensidade da DL como o decaimento inicial desta, sendo que quanto maior a concentração de atrazina, o agente estressante agressivo, maior a mudança observada nestes gráficos.

A técnica biofotônica, baseada na medição da DL, e estudada pelo grupo italiano fornece uma alternativa mais barata que o método tradicional, baseado em espectroscopia de fluorescência, para se efetuar testes de avaliação da qualidade de água para consumo humano capaz de detectar quantidades muito pequenas de contaminantes, como demonstrado no artigo, da ordem de $0,5 \mu\text{g/l}$.

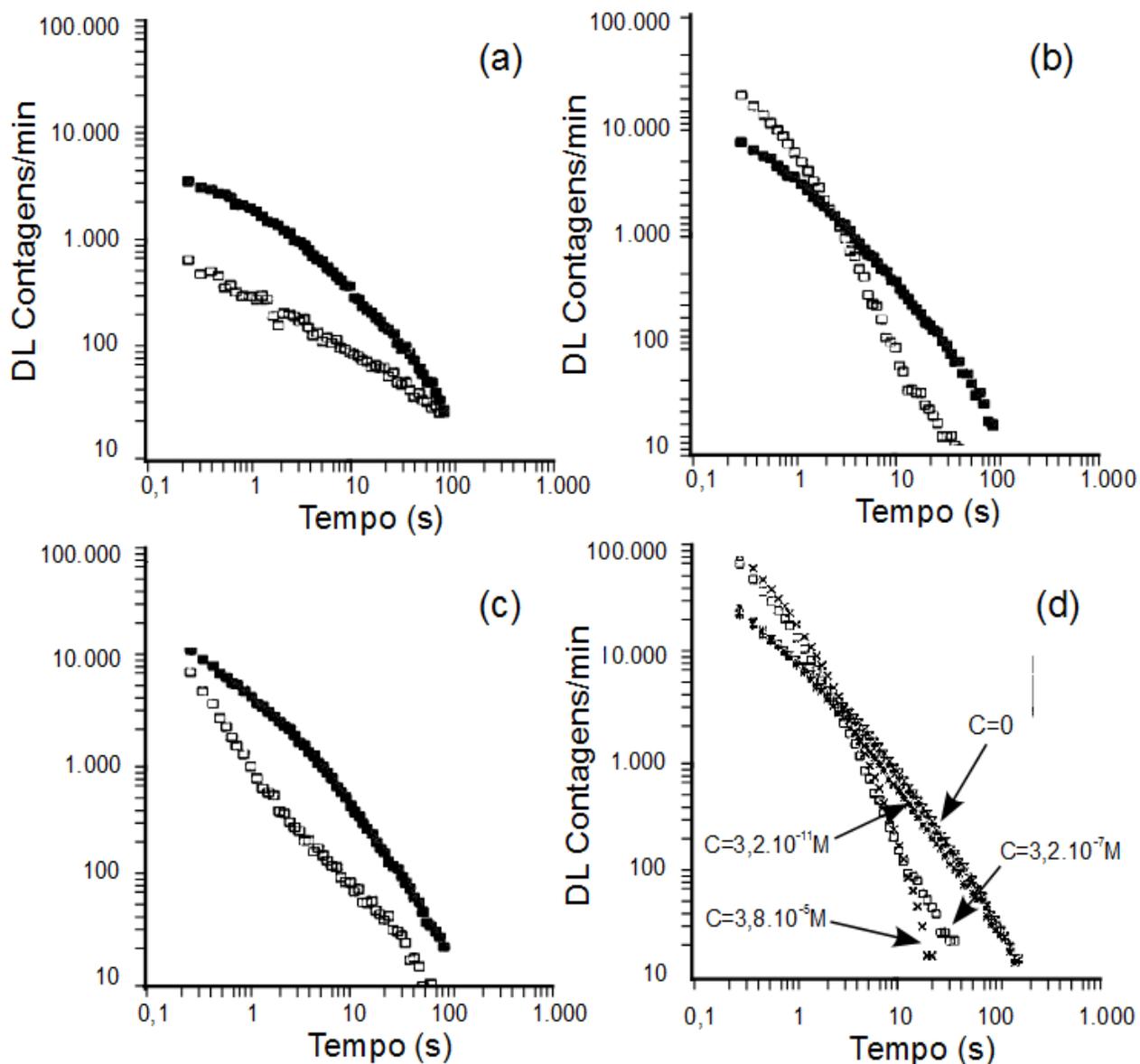


Figura 2.5 – DLs das amostras de alga antes (■) e depois (□) de serem estressadas por (a) aquecimento a 40°C , (b) atrazina a $3,2 \times 10^{-7} \text{ M}$, (c) acetaldeído a 1%, e em (d) efeito da concentração de atrazina nas DLs, adaptado de [17].

2.2.3 UWPE em estudos de viabilidade de sementes

No artigo de Zeiger de 1998 [9], emissões espontâneas de UWPE de 7 amostras de sementes de trigo, medidas durante 60 minutos, em temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C e 50 °C, foram correlacionadas com a capacidade de germinação e vigor destas amostras, sendo estes dados apresentados na Tabela 2.2, onde a capacidade de germinação (g) é representada pelo percentual de sementes que germinaram após 4 dias a 25 °C.

Tabela 2.2 – Dados dos experimentos de Zeiger, adaptado de [9].

Amostra	Contagens de fótons por 60 min						g(%)
	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	
4	14	24	42	73	126	215	92
3	12	22	40	70	122	210	92
1	9	16	29	50	89	156	84
2	9	14	25	46	82	143	82
6	8	13	23	40	67	110	64
5	4	8	16	31	54	91	56
7	6	11	19	32	54	87	32

A relação direta entre a capacidade de germinação (g) e o total das contagens de fótons de emissão espontânea (n) a uma dada temperatura pode ser expressa pela equação 2.1.

$$n_1 < n_2 < n_3 \dots \rightarrow g_1 < g_2 < g_3 \dots \quad (2.1)$$

Zeiger demonstrou, ainda, que o comportamento da emissão espontânea de fótons se traduz por uma relação exponencial com a temperatura da amostra, sendo dada pela equação 2.2, onde: n representa a contagem total de fótons, T a temperatura em °C, B um parâmetro depen-

dente tanto da quantidade de sementes na amostra (10 g) como do intervalo de medição (60 min), e C a inclinação da reta definida pela relação exponencial.

$$n = B \cdot \exp(C \cdot T) \rightarrow \ln(n) = C \cdot T + \ln(B) \quad (2.2)$$

Outro aspecto apresentado neste artigo está associado ao efeito da hidratação e subsequente desidratação das sementes, nas emissões espontâneas de fótons, proporcionadas por um ciclo de desidratação das sementes previamente hidratadas através de um aquecimento de 20 °C a 50 °C, mantendo-as então nesta temperatura por 3 horas e meia. Os resultados das contagens de fótons obtidas nestas condições estão mostrados na Figura 2.6 (a) e (b), para amostras de sementes vivas e mortas em autoclave, respectivamente, mostrando ainda que, para as sementes vivas o decaimento das contagens se deu de modo hiperbólico, e para as mortas de modo exponencial. Este fato tem como consequência a observação de um comportamento coerente para a emissão da semente viva e não-coerente para a morta.

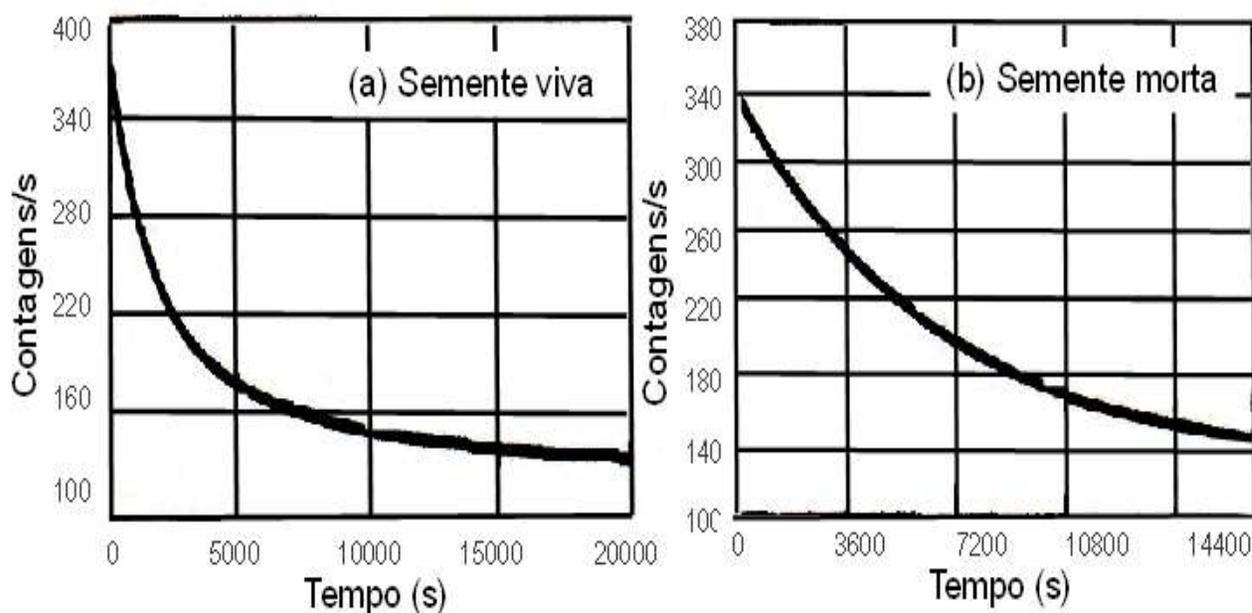


Figura 2.6 – Decaimento das contagens de fótons de emissão espontâneas em padrão hiperbólico para amostras em desidratação por aquecimento de sementes vivas (a), e exponencial para amostras de sementes mortas (b), adaptado de [9].

As emissões de biofótons de sementes em germinação e as correlações destas com capacidade de desenvolvimento e taxa de germinação têm sido estudadas por muitos grupos de pesquisas com diferentes tipos de sementes como: café [11], trigo [15], cevada [10], arroz [33] e soja [12]. As emissões de UWPE de sementes de trigo quando estressadas por diferentes concentrações de soluções de sedimentos de estação de tratamento de esgoto aplicadas a estudos em ecotoxicologia foram exploradas no artigo de Gallep e Santos, onde estas foram correlacionadas com o crescimento dos brotos produzidos, tendo mostrado uma relação direta entre estes parâmetros [15].

2.2.4 DETECÇÃO DA UWPE EM 2D

Inaba e Kobayashi, do *Tohoku Institute of Technology* – Japão, em uma série de artigos apresentaram resultados de suas pesquisas na análise espaço-temporal das emissões de biofótons, tanto de plantas como de mamíferos, de modo a caracterizar respostas patofisiológicas induzidas por estresse de diversas naturezas, como danos físicos e aquecimento, alguns destes artigos são discutidos a seguir.

Em 1989, o grupo de Inaba registrou pela primeira vez a imagem da emissão de biofótons de sementes de soja em germinação usando uma válvula fotomultiplicadora para contagem de fótons em 2D [16]. Neste experimento pioneiro, eles puderam verificar a maior intensidade de emissão localizada durante a divisão celular. Posteriormente, Suzuki et al., em [34], registraram a imagem de uma semente de feijão azuki em germinação na qual fora provocado um dano físico evidenciando uma maior intensidade luminosa na região afetada, demonstrando que algum mecanismo de defesa da planta se manifestava, ver Figura 2.7 (a) e (b).

Em 1999, o grupo de Inaba foi também pioneiro em adquirir imagens da UWPE in vivo do cérebro de um rato, correlacionando-as aos seus sinais de EEG [8]. Para tanto, eles usaram uma PMT 2D da Photek, modelo IPD440, com uma área efetiva de 40 mm de diâmetro, sensibilidade espectral entre 350 e 900 nm, corrente de escuro de 76 s^{-1} e resolução espacial de cerca de 200 μm , tendo sido resfriada a $-35 \text{ }^\circ\text{C}$.

Inaba e Kobayashi utilizaram em suas pesquisas válvulas fotomultiplicadoras para contagem de fótons com discriminação 2D do tipo MCP (*Micro-Channel Plate*) e câmaras CCD

(*Charge Coupled Device*) ultra-sensíveis resfriadas com nitrogênio líquido a temperaturas inferiores a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Com um tempo de integração de 30 min, o grupo de Inaba [35] obteve a imagem de uma amostra de semente de soja em germinação a qual foi deixado em completa escuridão por 5 dias, tendo registrado uma maior emissão na região do hipocótilo, área esta responsável pelo crescimento e respiração sugerindo que os biofótons carregam informações a respeito do metabolismo celular, ver Figura 2.7 (c) e (d).

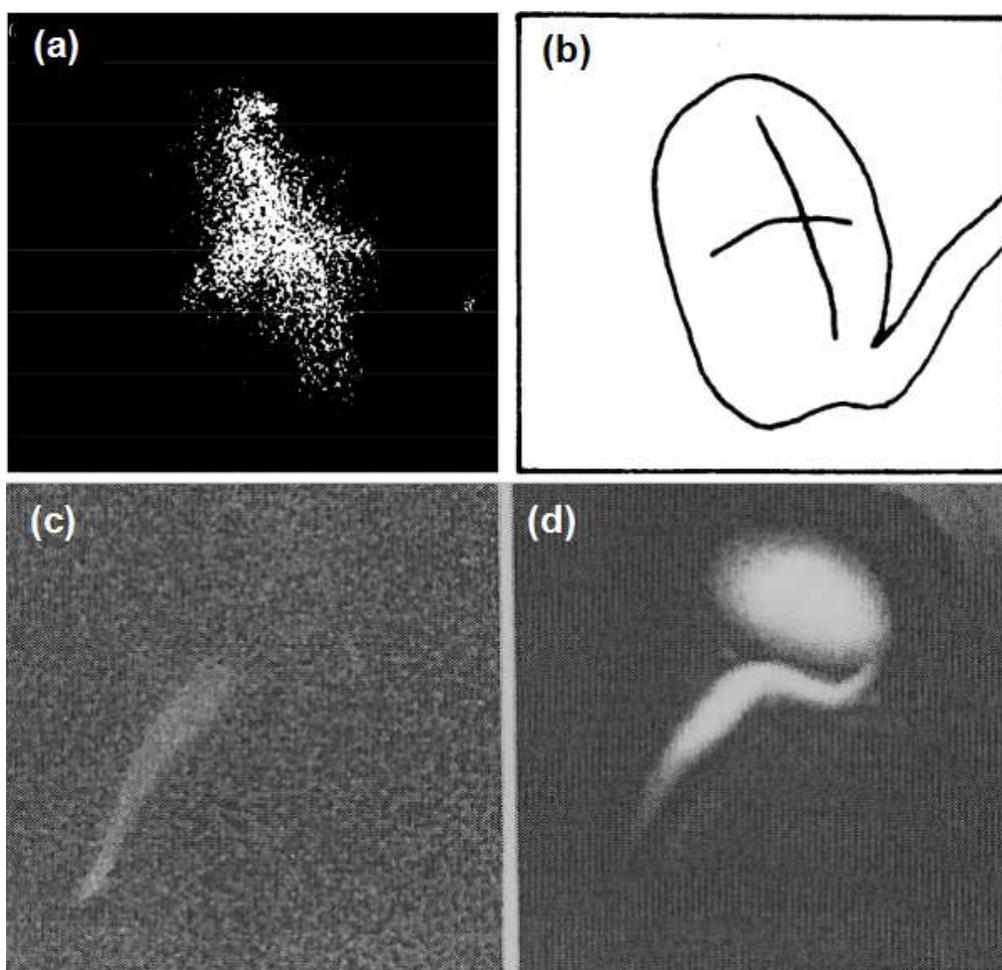


Figura 2.7 – Imagem 2D da emissão de biofótons de uma semente de soja em germinação (a), e em (b) representação esquemática da posição do dano em forma de um X causado na semente, adaptado de [3]. Em (c) e (d) imagem de broto de soja com 5 dias de germinação gerada pela emissão de biofótons, e de foto tirada em baixa iluminação, respectivamente, adaptado de [35].

2.2.5 UWPE em oncologia

No artigo de Takeda *et al.* [7], medições da UWPE durante 93 h de culturas de células de carcinoma esofágico humano (TE9) na forma de uma monocamada agregada ao fundo de uma cuvete de quartzo, mantida à temperatura de 37 °C num fluxo contínuo de meio de cultura RPMI 1640 com 10 % de soro fetal bovino (FBS), e de ar com CO₂ a 5 %, foram correlacionadas com a curva de proliferação destas células. A Figura 2.8 (a) mostra a curva de proliferação das células com medições em 12, 23, 47, 70 e 93 h, para uma população inicial média de 5×10^5 células, e em (b) os resultados das medições da UWPE somente do meio de cultura, e deste com as células TE9. As figuras mostram que após as 18 h iniciais, quando a fluorescência retardada do meio já se desvaneceu, um padrão na UWPE similar ao da curva de proliferação até cerca de 60 h é observado.

O sistema de medição de UWPE usado contou com uma PMT ultra-sensível (Hamamatsu modelo R1333), sensível à faixa de 300 a 900 nm e resfriada a -40 °C, e proporcionou uma análise espectral da UWPE por meio de um disco rotativo de filtros ópticos de banda estreita (entre 10 e 40 nm) cobrindo a faixa de 400 a 850 nm. O espectro de emissão de UWPE obtido, tanto das células TE9, como do meio de cultura RPMI 1640, podem ser vistos na Figura 2.8 (c).

Os autores de [7] argumentam que este espectro de emissão, como uma assinatura espectral, têm o potencial uso em diagnósticos clínicos, onde diferenças entre espectros podem trazer informações da atividade metabólica das células, e exemplificam serem os picos em 580, 634 e 703 nm são atribuídos à produção de oxigênio *singlet*³, devido à reações oxidativas da membrana lipídica das células. O ombro em 450 nm, por sua vez, seria atribuído à produção de *carbonila triplet* também relacionado a reações oxidativas da membrana lipídica das células.

³ Oxigênio *singlet* é a forma mais reativa do oxigênio apresentando dois elétrons emparelhados em um mesmo orbital ou em orbitais diferentes, diferentemente da forma mais estável do oxigênio, chamada *triplet* que apresenta dois elétrons desemparelhados no mais alto orbital.

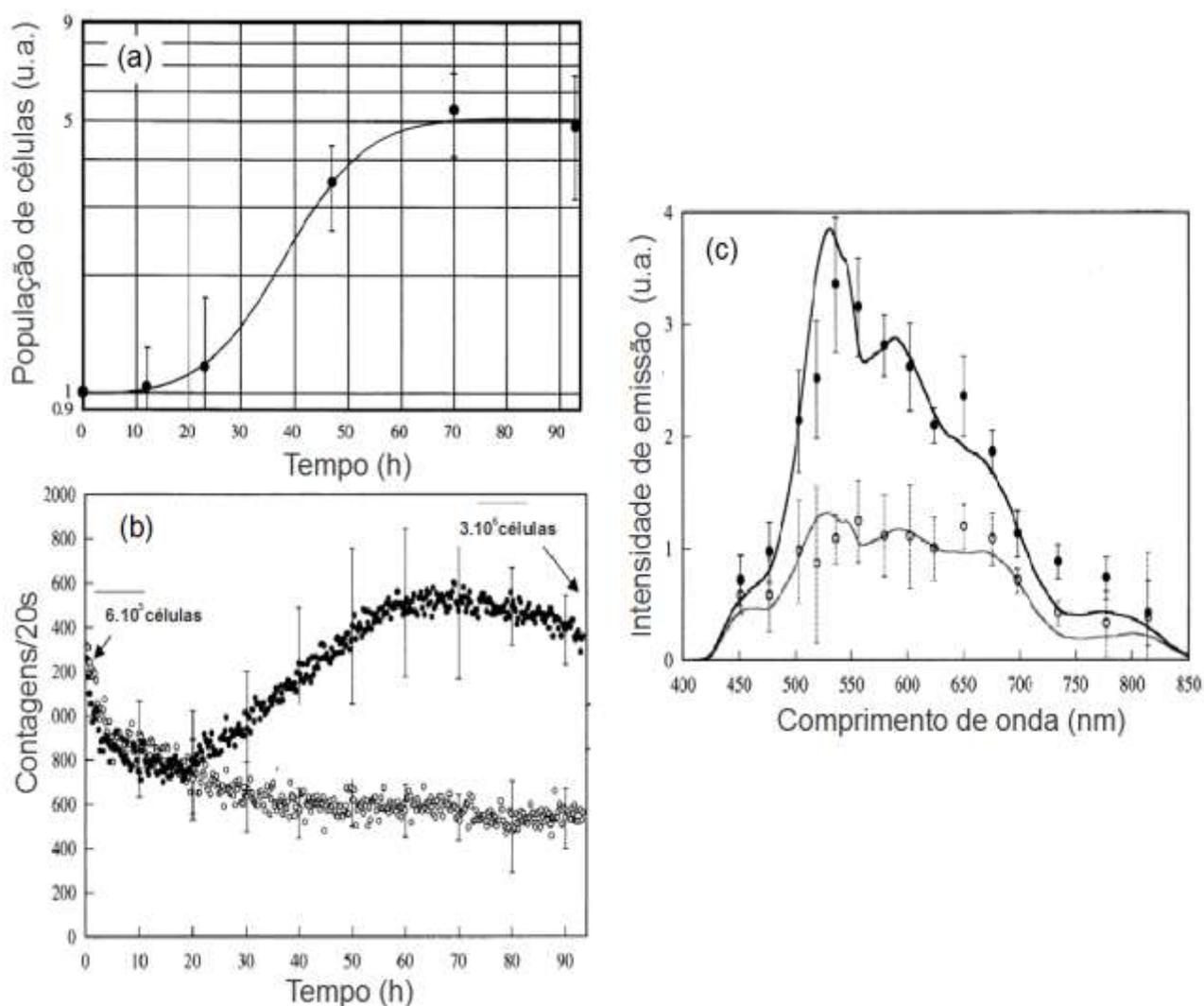


Figura 2.8 – Proliferação de células de carcinoma humano TE9 por 93 horas em meio de cultura RPMI 1640 em (a). Em (b) medição da UWPE de células TE9 em meio de cultura (●) e somente do meio de cultura (○). Em (c) espectro da UWPE das células TE9 (●), e do meio de cultura RPMI 1640 (○), adaptado de [1998].

Em artigos similares, mais recente, o grupo coreano liderado por Soh também verificou a relação entre o crescimento da população de uma cultura de células HeLa⁴ e a UWPE desta cultura [36, 37].

Outro experimento na área da oncologia, realizado pelo grupo de Soh, escaneou as emissões de UWPE de um rato, da cabeça até a calda, tendo este um ovário transplantado contendo células cancerígenas [38]. O animal foi colocado em uma câmara escura em uma posição apro-

⁴ Tipo de célula usada em pesquisas científicas derivada de uma linhagem de células cancerígenas retiradas em 1951 de Henrietta Lacks nos EUA que originou uma linhagem imortal de células humanas.

priada e movendo-se em passos de 1 cm a cada 60 segundos (0.17 mm/s), teve o sinal de UWPE registrado por um módulo PMT (Hamamatsu modelo H6180-01) com resposta espectral de 300 to 650 nm, pico em 400 nm e ruído de escuro de 10/s. Neste experimento eles puderam observar o aumento da UWPE no local onde o câncer crescia, atestando a eficácia do método, como um tipo de biópsia não invasiva.

2.2.6 UWPE de partes do corpo humano

R. Van Wijk et al. [39] usando um sistema constituído de uma câmara CCD altamente sensível, com resposta espectral de 400-900 nm e pico em 550 nm, com eficiência quântica >90%, tendo sido resfriada a -100°C e instalada dentro de uma sala escura, obtiveram imagens da UWPE em 256 x 256 pixels, de partes do corpo humano. Em uma primeira rodada de experimentos as imagens a 1,0 m de distância de um voluntário saudável foram registradas nas posições ventral e dorsal, além de seus braços, como pode ser visto na Figura 2.9 (A, D e G), respectivamente. Na Figura 2.9 (B, E, H), fotografias em baixa iluminação foram tiradas mostrando a posição do voluntário dentro da sala escura, e em (C, F e I), posições foram escolhidas para medições posteriores usando uma PMT móvel.

Em uma segunda rodada as imagens foram da face e mãos deste voluntário, a uma distância de 40 cm, como mostrado na Figura 2.10, sendo estas consideradas mais anatomicamente complicadas. As medições se iniciaram 30 minutos após a entrada do voluntário na sala escura, e duraram mais 30 minutos.

Os resultados das imagens da 1ª rodada de medições mostraram maiores intensidades de emissão na face e pescoço, gradualmente diminuindo através do torso e abdômen, e diminuindo da parte central do torso para suas laterais, como pode ser constatado através das imagens (A, D e G) da Figura 2.9. A maior intensidade de emissão foi registrada na área do pescoço, e no braço a intensidade de emissão aumenta com a proximidade das mãos.

Para as imagens da 2ª rodada de medições, os olhos exibiram a menor intensidade de emissão, e as faces e testa mostraram certa homogeneidade na intensidade.

As posições anatômicas mostradas na Figura 2.9 em (C), (F) e (I) foram escolhidas para tentar caracterizar as emissões de UWPE de um grupo de 20 voluntários, através do uso de uma

PMT móvel, resfriada a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo alguns destes resultados apresentados na Tabela 2.3 na forma de percentuais da contagem total de fótons.

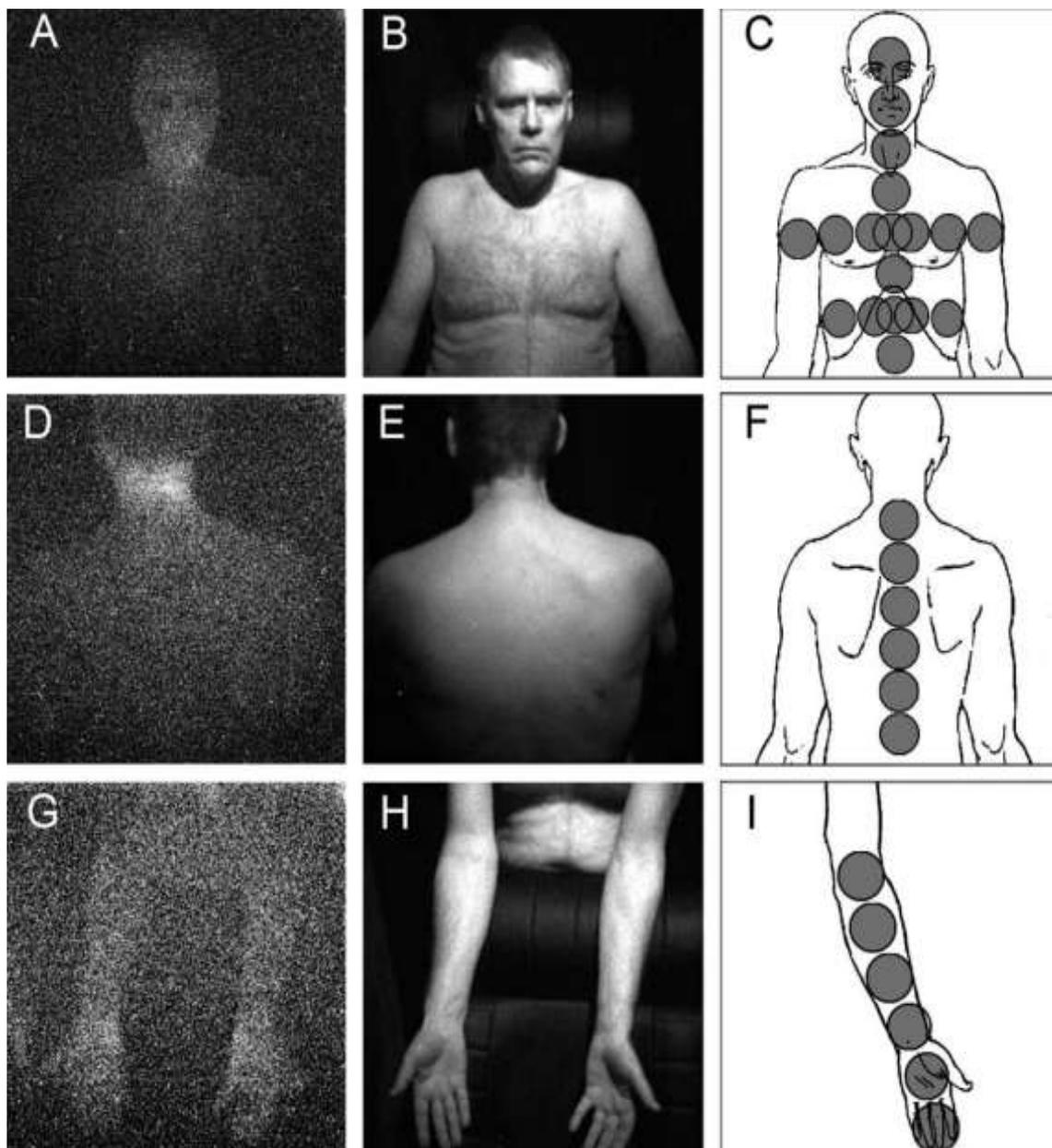


Figura 2.9 – Imagens da UWPE de um voluntário nas posições ventral, dorsal e de seus braços (A, D e G), obtidas por um sistema CCD operando à temperatura criogênica. Em (B, E e H) as correspondentes fotos em baixa iluminação, em (C, F e I) posições escolhidas para a medição usando um sistema com PMT móvel, *copyright* Elsevier [39]

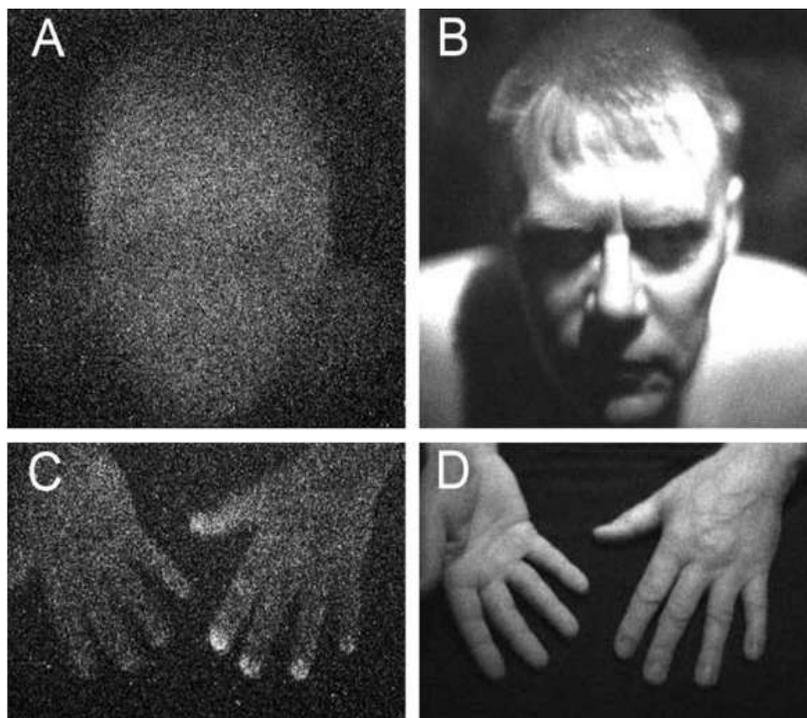


Figura 2.10 – Imagens da UWPE da face de um voluntário (A) e suas mãos (C), obtidas por um sistema CCD operando à temperatura criogênica. Em (B) e (D) as correspondentes fotos em baixa iluminação, *copyright* Elsevier [39].

Tabela 2.3 – Dados das medições das UWPEs das 12 localizações mostradas nas Figura 2.9 e 2.10 em percentuais do total das contagens, adaptado de [39].

Localização anatômica	Contribuição (%)
Abdômen - direita	4,8
Abdômen - esquerda	4,7
Estômago	7,0
Coração	9,8
Pescoço	10,3
Face direita	10,1
Face esquerda	9,2
Testa	11,2
Palma da mão direita	10,1
Palma da mão esquerda	9,2
Dorso da mão direita	8,4
Dorso da mão esquerda	7,0

No artigo de Choi *et al.* de 2002 [27] foram investigadas a UWPE das palmas e dorso das mãos de 20 voluntários saudáveis, não tendo sido encontradas variações significativas em relação à idade e gênero.

O grupo de pesquisas de Soh mediu a UWPE das mãos de 3 voluntários saudáveis durante 52 semanas tendo registrado sua variação com as estações do ano [40]. Eles puderam verificar que durante todo o ano as emissões das palmas das mãos se mantiveram estáveis, mas aquelas do dorso da mão variaram em grande medida, sendo que no outono eles verificaram os menores níveis de emissão.

2.2.7 UWPE em microorganismos

Um dos primeiros estudos da UWPE em microbiologia foi feito por Quickenden e Hee em 1974 com o objetivo de verificar a existência da radiação mitogenética, usando para isto uma cultura de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) [41]. Nestes experimentos eles mediram a UWPE da cultura de levedura em seu ciclo completo de vida. Em trabalho posterior, dois anos mais tarde, Quickenden e Hee determinaram a distribuição espectral entre 200 e 700 nm, em intervalos de 50 nm, de tais emissões, para as fases, logarítmica (Log) e estacionária do crescimento da população [42]. A distribuição espectral na fase Log em que a população está crescendo continuamente, evidenciou uma intensidade maior de contagens de fótons em uma ampla faixa do UV, entre 200 e 425 nm, e na faixa do visível entre 525 e 700 nm. Já a fase estacionária teve intensidades e largura de faixa em UV menores, com um pico apenas centrado em 250 nm, e uma faixa mais ampla entre 325 e 525 nm, além de apresentar um pico pronunciado de emissão em 650 nm. Através destes experimentos, eles puderam corroborar trabalhos publicados antes, a respeito das diferentes faixas de espectro de emissão e suas origens em relação ao metabolismo celular.

Em [43], Vogel e Süsmuth exploraram a interação de culturas de bactérias com o meio de cultura e suas implicações na UWPE produzidas.

Tilbury no artigo de 1992 [44] correlacionou a emissão de UWPE com mecanismos de defesa a estresse químico.

Nos artigos de Mathew et al. [14] e Roda et al. [18], *Escherichia coli* foi usada como indicador biológico associado a um substrato quimioluminescente de modo a se poder detectar a sua presença ao reagir com a enzima β -glucorosidase.

UWPE de alguns outros microorganismos foram pesquisados desde então, e entre eles estão: *Pseudomonas fluorescens* por Nikolaev [45], *Paramecium caudatum* por Fels [46], *Serratia mercenscens* [47], *Deinococcus radiodurans* [43], *Proteus vulgaris* [48] e *Lactococcus lactis lactis* [49] por Vogel et al..

2.3 PROVÁVEIS MECANISMOS DE GERAÇÃO DOS BIOFÓTONS

2.3.1 Conceituação de fóton

As características dos biofótons foram apresentadas na seção 2.1 como sendo fótons emitidos na faixa do espectro da luz visível, alcançando partes do espectro de UV e Near-IR. Antes de avançar na discussão das prováveis origens dos biofótons é importante uma breve introdução acerca dos fótons e suas origens.

Em 1900, Max Planck publica seu artigo “*On the theory of the energy distribution of the normal spectrum*”, acerca da natureza da energia radiada de um corpo negro, fato derivado do estudo de sua distribuição espectral, o que levou ao conceito de Quantum, apesar do fato de Planck inicialmente não ter certeza se o conceito era mais um artifício matemático, ou se realmente era algo com significado físico mais profundo [50].

As primeiras tentativas de se explicar a radiação de corpo negro por Wilhelm Wien (1864-1928) e John William Strutt - Lord Rayleigh (1842-1919) criou uma controvérsia, já que a fórmula empírica proposta por Wien explicava o fenômeno para as altas frequências, e a fórmula de Rayleigh para as baixas frequências, sendo que ambas eram bastante diferentes e difíceis de serem conciliadas. Planck, utilizando-se da mecânica estatística criada por Ludwig Boltzmann (1844-1906) que descreve o comportamento de sistemas constituídos de um grande número de partículas, e introduzindo a hipótese de que a energia de uma fonte de luz era quantizada, estabeleceu o que ficou conhecido como Lei de Planck para a radiação de corpo negro. Vinte e um anos

mais tarde, em 1921, Einstein consolidou o conceito de quantum com seu trabalho sobre o efeito fotoelétrico, o que o levou a ganhar o prêmio Nobel de física daquele ano. E então, em 1924, o químico americano Gilbert Newton Lewis, cunhou o termo Fóton para descrever o quantum de luz.

Os fótons pertencem a uma categoria de partículas chamadas Bósons que possuem spin inteiro; além disto, os fótons não obedecem ao princípio da exclusão de Pauli, são desprovidos de massa e carga elétrica; no entanto, carregam energia e momento, tendo polarização em relação ao seu spin, e estão sempre em movimento, se propagando sempre na velocidade da luz.

A energia do fóton, em Joules, é dada, em função da frequência, pela equação 2.3 do fóton:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (2.3)$$

Onde: $h = 6,6262 \cdot 10^{-34}$ (J.s) é a constante de Planck, ν é a frequência, c é a velocidade da luz no vácuo ($3 \cdot 10^8$ m/s) e λ é o comprimento de onda.

2.3.2 Geração de fótons

2.3.2.1 Emissão de linha

O átomo isolado é o sistema mais simples capaz de emitir ou absorver fótons. Este, ao mudar sua energia interna entre níveis discretos de energia E_i , absorve ou emite um fóton com a mesma energia da diferença entre estes níveis, como mostrado na Figura 2.11.

O átomo na condição de energia interna mínima, ou no seu estado fundamental E_f , não emite energia. A energia interna de um átomo, sendo a soma das energias cinética e potencial de seus elétrons, irá depender do campo elétrico gerado pelo núcleo deste átomo, e dos elétrons circunvizinhos, além de interações magnéticas entre elétrons, e destes com o núcleo [24].

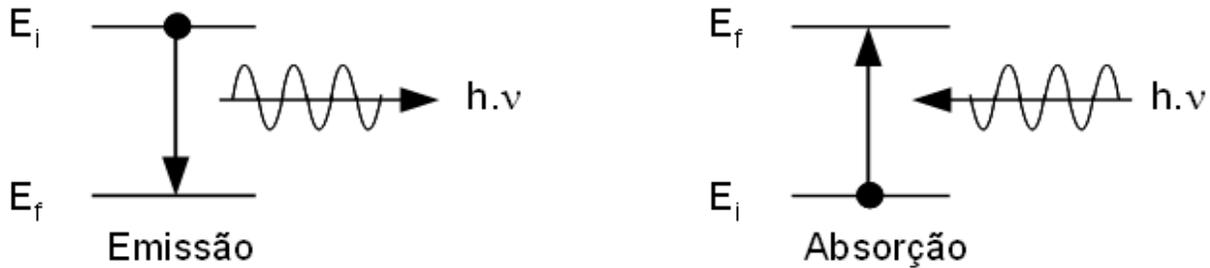


Figura 2.11 – Absorção e emissão de fótons por um átomo. Na emissão o átomo passa de um estado de maior energia E_i para o de menor energia E_f , na absorção ocorre o contrário.

2.3.2.2 Radiação térmica

A radiação térmica é o resultado da temperatura de um corpo, que emite e absorve tal radiação para/do ambiente que o circunda, tendendo ao equilíbrio térmico com este, quando então, as taxas de emissão e absorção se tornam iguais.

A matéria condensada de um corpo emite um espectro contínuo de radiação, sendo este independente do material que o compõe, dependendo diretamente da temperatura deste corpo.

A Lei de Planck, mostrada na equação 2.4, permite descrever quantitativamente a radiação eletromagnética de um corpo negro⁵ em equilíbrio térmico, relativamente à sua radiação espectral [51], ou seja, seu espectro de potência por unidade de área é dado em ($W.m^{-2}.m^{-1}$)⁶:

$$w_{\lambda}(T) = \frac{2.\pi.h.c^2}{\lambda^5(e^{\frac{h.c}{\lambda.k_B.T}} - 1)} \quad (2.4)$$

onde: $h=6,6262.10^{-34}$ (J.s) é a constante de Planck, λ é o comprimento de onda em metros, c é a velocidade da luz no vácuo (3.10^8 m/s), $k_B=1,38065.10^{-23}$ (J/K) é a constante de Boltzmann e T é a temperatura, em graus Kelvin.

Na Figura 2.12 em (a) e (b) estão mostradas, respectivamente, a função de radiação para as temperaturas de 1600, 2400 e 3200 K, e para temperaturas perto da corporal (37 °C).

⁵ Corpo negro é aquele que absorve toda luz que nele incide, ou seja, sua emissividade $\varepsilon=1$; no outro extremo os corpos transparentes ou reflexivos tem, no outro extremo os corpos transparentes ou reflexivos tem $\varepsilon=0$.

⁶ Aqui a unidade da função de radiação do corpo negro é $W.m^{-3}$, embora usualmente seja expressa em $W.cm^{-2}.\mu.m^{-1}$.

A energia total emitida por unidade de área de um corpo negro, em (W/m^2) pode ser obtida integrando-se a equação 2.4, obtendo-se, assim, a expressão conhecida como Lei de Stefan-Boltzmann:

$$W_{TOT}(T) = \int_0^{\infty} W_{\lambda}(\lambda, T) \cdot d\lambda = \frac{2 \cdot \pi^5 \cdot k_B^4 \cdot T^4}{15 \cdot h^3 \cdot c^2} = \sigma \cdot T^4 \quad (2.5)$$

onde: $\sigma = 5,6704 \cdot 10^{-8} (W \cdot m^{-2} \cdot T^4)$ é a constante de Stefan-Boltzmann.

Para corpos em que a emissividade $\varepsilon(\lambda) < 1$, ou seja, não são corpos negros, pois não absorvem completamente luz em um comprimento de onda, a potência emitida pode ser calculada como:

$$\varepsilon(\lambda) \cdot W_{\lambda}(T) \quad (2.6)$$

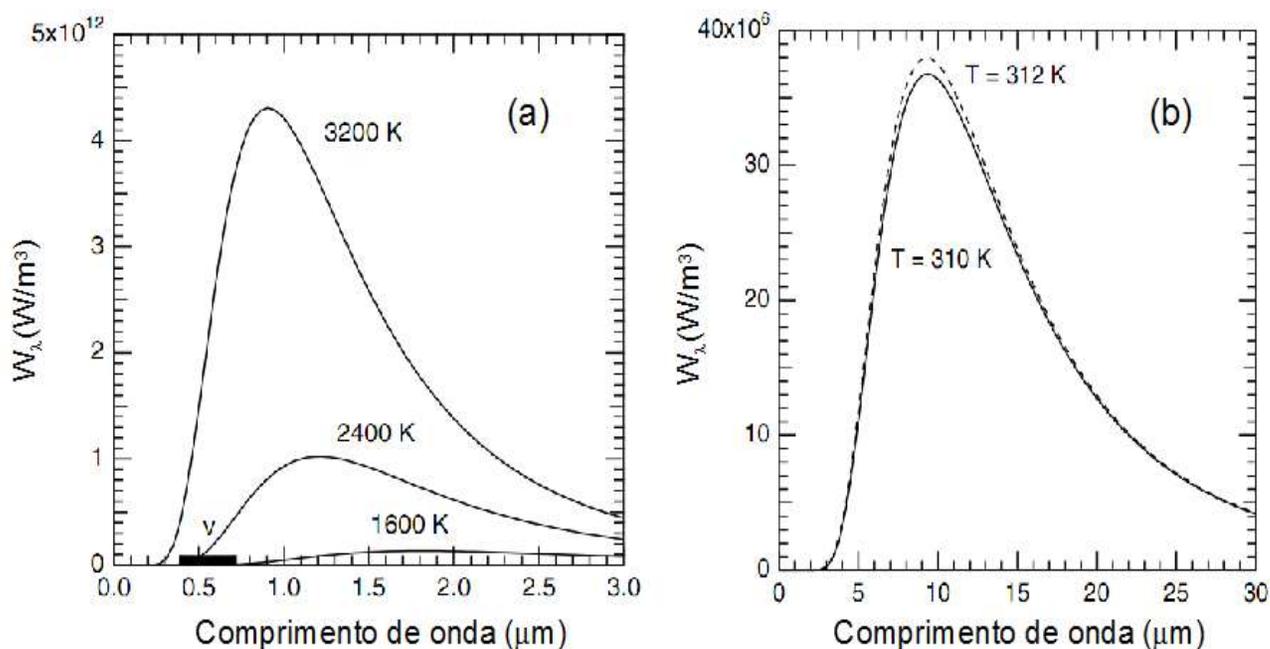


Figura 2.12 – Radiação de corpo negro para 3 temperaturas diferentes (a), o trecho marcado com V mostra o espectro visível. Em (b) o espectro de radiação para temperaturas corporais de 37 e 38 °C, adaptado de [51].

2.3.2.3 Efeito bremsstrahlung⁷

Este tipo de emissão ocorre sempre que um elétron é desviado de sua trajetória ao se aproximar do núcleo de um átomo, o qual possui carga positiva. Este elétron, ao mudar sua trajetória, tem parte de sua energia cinética transformada em energia eletromagnética, produzindo fótons na faixa do raio-X, e exibindo um espectro de emissão contínuo [50]. O efeito *bremsstrahlung* pode ser considerado o efeito oposto ao fotoelétrico, já que neste último o fóton ao ser absorvido tem sua energia e momento transferidos para o elétron.

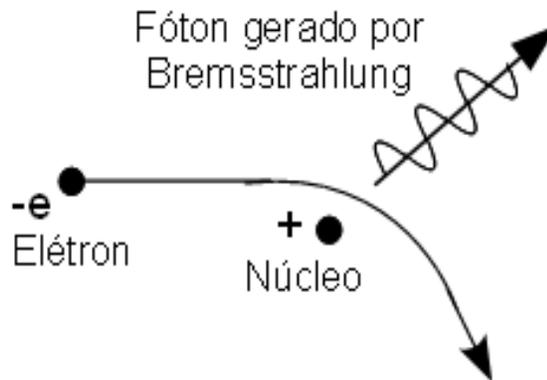


Figura 2.13 – Fóton gerado pelo efeito bremsstrahlung.

2.3.2.4 Aceleração de uma carga elétrica

Cargas elétricas quando aceleradas produzem radiação eletromagnética, seja esta carga um elétron, próton ou mesmo íons, sendo que esta emissão de fótons se deve ao princípio da conservação da energia e momentum destas cargas. A faixa de comprimentos de onda deste tipo de emissão cobre uma ampla faixa do espectro eletromagnético, desde ondas de rádio até raios cósmicos de alta energia.

⁷ Palavra de origem alemã significa: Bremsen= frear e Strahlung= radiação.

2.3.2.5 Aniquilação de pares de matéria e antimatéria

Fótons são gerados quando um elétron e um pósitron ao se aproximarem se unem e são aniquilados. A matéria desaparecendo em seu lugar surge energia radiante, e neste caso para cada par aniquilado um par de fótons é gerado, de forma a conservar o momento do sistema que inicialmente era zero, sendo que ambos os fótons terão igual momentum, mas em direções opostas.

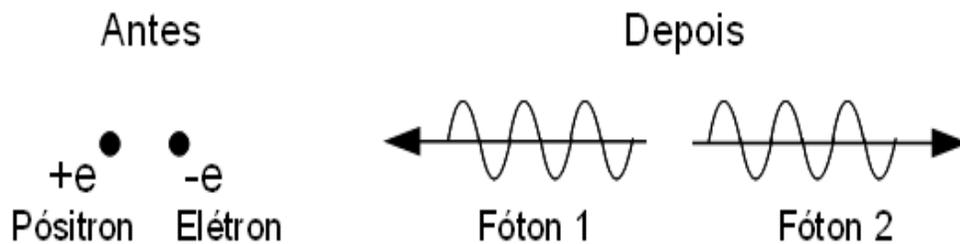


Figura 2.14 – Geração de fótons através da aniquilação de um par elétron-pósitron.

2.3.3 Caracterização de uma fonte de luz

Uma fonte de luz consiste de um elemento que emite ondas eletromagnéticas na faixa do espectro em que a retina humana é capaz de detectar, ou seja, entre 400 e 700 nm; no entanto, é usual se referir como luz a comprimentos de onda compreendidos entre 10^2 e 10^6 nm, e a região visível entre 350 e 750 nm, ou seja, uma faixa mais ampla que a da sensibilidade da retina.

2.3.3.1 Fluxo radiante e energia radiante

A intensidade luminosa como uma medida puramente física é dada pelo fluxo radiante, sendo expresso em watts (J/s), porém, do ponto de vista da sensação visual de luz, ou fotometria, esta medida é dada pelo fluxo luminoso, expresso em lúmens (lm). O fluxo radiante (ϕ_e) de uma fonte de luz, sabendo-se o número de fótons por segundo $n=N/s$, e o comprimento de onda λ , é dada multiplicando-se a equação 2.3 por N , resultando na equação 2.7 [52]:

$$\phi_e = E \cdot N = h \cdot c \cdot \frac{N}{\lambda} = 2 \cdot 10^{-16} \frac{N}{\lambda} \quad (2.7)$$

A energia radiante, em joules (J), ou *lumen.s* ($lm.s$) na fotometria, por sua vez é a integral do fluxo radiante no tempo, como mostrado na equação 2.8:

$$Q_e = \int \phi_e dt \quad (2.8)$$

2.3.3.2 Irradiância, Emitância, Intensidade Radiante e Radiância

Irradiância (E_e), em W/m^2 , ou *lux* (lx) em fotometria, também chamada de densidade de fluxo radiante, é a medida do fluxo irradiado por unidade de área em uma superfície [52], podendo ser calculada por 2.9.

$$E_e = \frac{d\phi_e}{ds} \quad (2.9)$$

Emitância (M_e), em W/m^2 , ou lm/m^2 na fotometria, é a medida do fluxo radiante irradiado por unidade de área de uma superfície, podendo ser calculada por 2.10.

$$M_e = \frac{d\phi_e}{ds} \quad (2.10)$$

Intensidade Radiante (I_e), em W/sr , ou Intensidade Luminosa, em *candela* (cd) na fotometria, é a medida do fluxo radiante irradiado por um ponto, dividido por unidade de ângulo sólido, como ilustrado na Figura 2.15 – , e calculado conforme a equação 2.11.

$$I_e = \frac{d\phi_e}{d\omega} \quad (2.11)$$

Radiância (L_e), em $W/sr.m^2$, ou Luminância, em cd/m^2 na fotometria, é a medida da intensidade radiante irradiada em uma certa direção, dividida pela área da superfície projetada ortogonalmente, conforme mostrado na Figura 2.15, podendo ser calculada por 2.12.

$$L_e = \frac{dI_e}{ds \cdot \cos\theta} \quad (2.12)$$

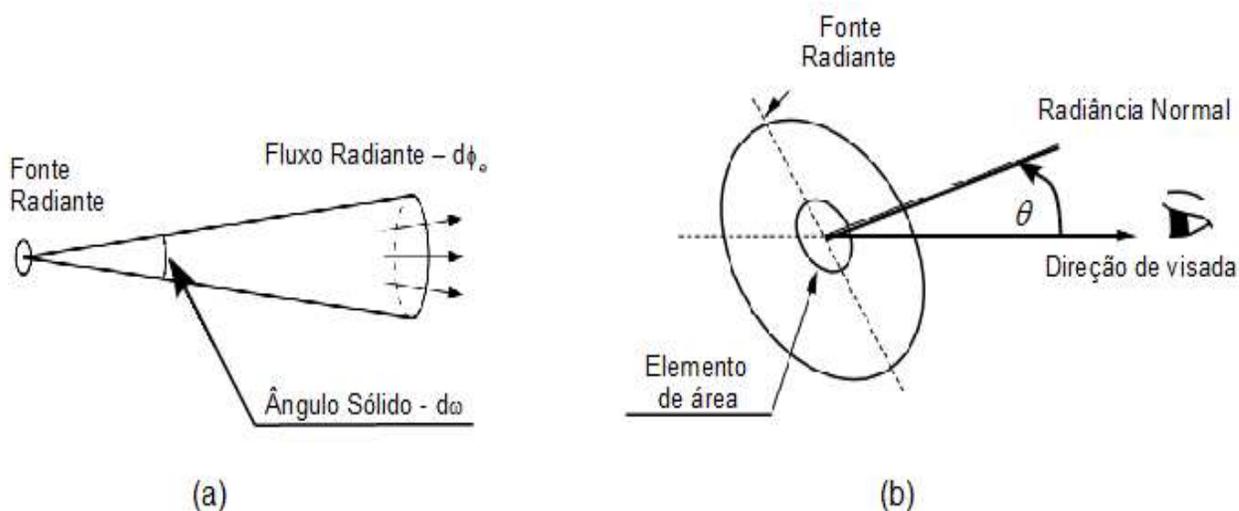


Figura 2.15 – Geometria para definição de intensidade radiante, adaptado de [52]

2.3.4 Teorias acerca da origem dos biofótons

Existem várias teorias acerca da origem das emissões de biofótons pelos seres vivos, porém o conhecimento completo de tal fenômeno ainda não foi devidamente esclarecido. No entanto, certos aspectos destas emissões já são consenso entre os pesquisadores da área, tais como as ligações que existem entre estas emissões e estruturas celulares e as reações enzimáticas e não-enzimáticas que ali ocorrem, relacionadas ao metabolismo celular [25, 53, 54].

2.3.4.1 Formação de espécies reativas de oxigênio como fonte de biofótons

Estresse oxidativo com a formação de espécies reativas de oxigênio é uma das principais fontes de UWPE. Uma comprovação de tal fato foi feita pelo grupo de pesquisa Chinês em [33] usando um sistema dotado de mecanismo de injeção de água controlado por computador, que provia hidratação inicial às sementes de arroz dentro de uma câmara escura, e, assim, efetuando a medição da quimioluminescência (CL), puderam correlacioná-la à formação de oxigênio *singlet*

(1O_2) e ao vigor destas sementes, ou equivalentemente ao seu grau de envelhecimento. Com a instrumentação mencionada e uma sonda seletiva para CL de 1O_2 (MCLA - *2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazine-3-one*) eles demonstraram que sementes armazenadas por um menor tempo produziram CL mais forte, com a formação de 1O_2 . A PMT usada foi uma Perkin Elmer MP962, com sensibilidade espectral entre 185 e 850 nm e contagem de escuro de 25 s^{-1} . O mesmo grupo de pesquisa posteriormente mediu a CL de sementes de arroz, soja e cevada a diferentes temperaturas e seus espectros de hidratação inicial, usando uma instrumentação similar [55].

2.3.4.2 DNA como fonte de biofótons

Evidências de que o DNA (sigla do inglês para Ácido Desoxirribonucleioco) é uma das principais fontes de emissão de biofótons foram apresentadas no artigo de Rattemeyer e Popp [6]. Neste trabalho, sementes de pepino em germinação foram tratadas com soluções aquosas de Brometo de Etídio (EtBr - $C_{21}H_{20}BrN_3$), um conhecido marcador de ácidos nucleicos, em concentrações entre 10^{-2} e 10 mg/L , e o EtBr sendo inserido entre pares de nucleotídios da molécula de DNA, a conformação espacial da dupla hélice do DNA foi alterada. Com o aumento da concentração de EtBr, mais inserções ocorrem, e o DNA se desenrola, ou se descondensa. Aumentos progressivos de concentração irão enrolar o DNA em sentido contrário, como pode ser visto na Figura 2.16, à esquerda. A hipótese de Rattemeyer e Popp é de que se o DNA armazena fótons em certos estados de conformação, este ao se desenrolar deveria liberar tais fótons, e de fato foi o que eles puderam constatar experimentalmente, como mostra a Figura 2.16 à direita, onde se pode ver a dependência das contagens de fótons com as diversas concentrações de EtBr, mostrando o mesmo perfil de dependência mostrado na Figura 2.16 à esquerda, comprovando, assim, a dependência da emissão de biofótons com a estrutura espacial do DNA.

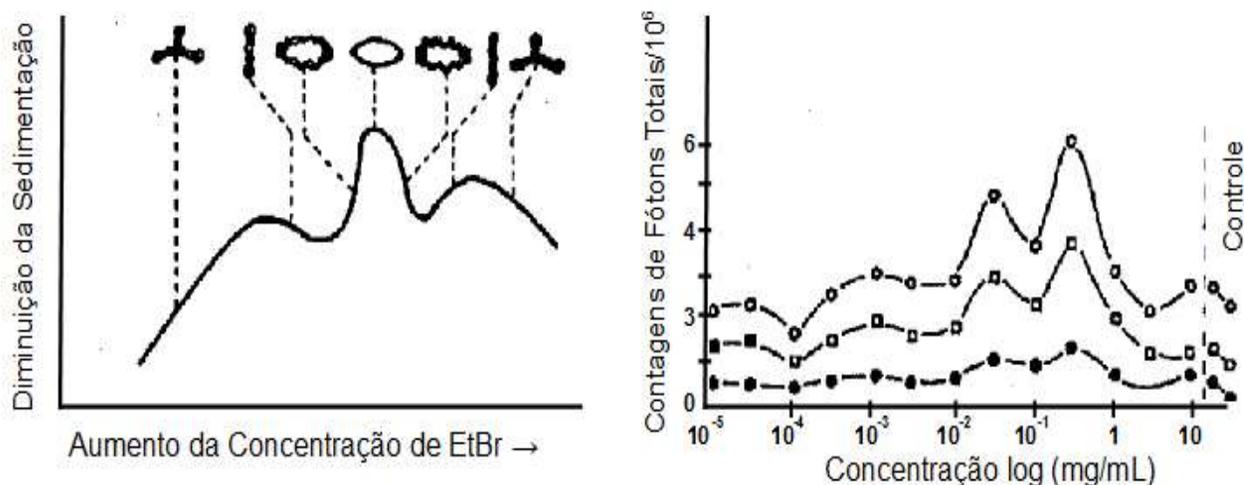


Figura 2.16 – Conformação do DNA e a relação com a intensidade de emissão de biofótons, adaptado de [6].

2.3.4.3 Mecanismos de defesa biológica como fonte de biofótons

Makino et al. [56] constataram que mecanismos de defesa, em resposta à ação dos fungos inoculados em secções de batata doce, são responsáveis pela intensificação das emissões de biofótons nas regiões afetadas. Neste trabalho eles estudaram o perfil de emissão da UWPE de secções cilíndricas de raízes de batata doce quando inoculadas por um tipo de fungo (*Fusarium oxysporum* - SK102) em várias concentrações de conídias deste fungo, e observaram o que está mostrado na Figura 2.17, onde se pode ver como o perfil de emissão de biofótons varia em função das condições de inoculação do fungo e da condição da raiz da planta, isto é, para concentrações diferentes de conídias (1, 5, 20 e 100 conídias.10⁻⁵/mL), conídias vivas/mortas e ainda, raiz viva/morta.

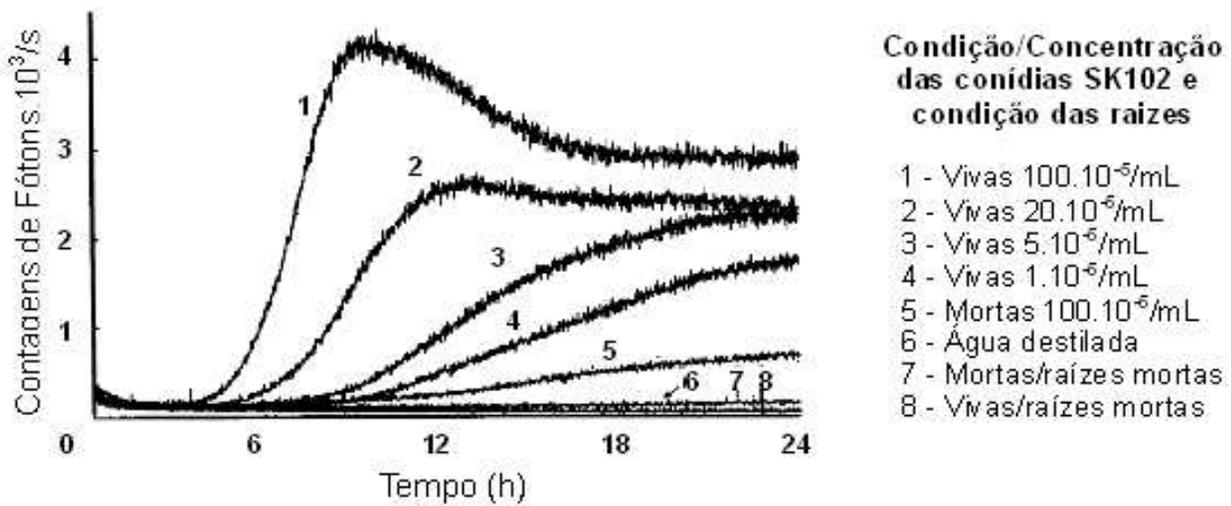


Figura 2.17 – UWPE de raízes de batata doce em várias condições de inoculação por conídias de *F. oxysporum*, adaptado de [56].

A produção de uma fitoalexina⁸ chamada Ipomeamarona em resposta à inoculação dos fungos na batata-doce, e constatada por cromatografia, respalda a hipótese do mecanismo de defesa ser uma das fontes de UWPE.

2.3.4.4 Teoria da imperfeição

Outra teoria acerca da origem dos biofótons é a chamada “Teoria da Imperfeição” que alega serem estas emissões oriundas de uma imperfeição dos eventos metabólicos acontecendo permanentemente dentro das células. Esta hipótese prevê a existência de uma probabilidade pequena, porém não nula, de que moléculas excitadas aleatoriamente ao retornarem ao equilíbrio térmico emitem uma certa quantidade de fótons quimicamente induzidos, sendo que processos oxidativos como reações com radicais seriam as fontes de tais eventos aleatórios [57]. No artigo de Popp et al. intitulado “*Physical aspects of biophotons*” [58], no entanto, essa teoria é confrontada com a teoria do campo coerente de fótons ocorrendo dentro dos tecidos, teoria postulada por Popp e outros, assim a teoria da imperfeição acabou sendo derogada, em favor desta última.

⁸ Fitoalexinas (phyton=planta, alexin=composto que repele) são substâncias produzidas em resposta ao estímulo causado por um microorganismo, provocando um mecanismo de defesa que inibe a ação desta.

2.4 INSTRUMENTAÇÃO PARA A DETECÇÃO DOS BIOFÓTONS

A detecção das emissões de biofótons apresenta alguns desafios técnicos devido ao tipo de sinal luminoso que se deseja detectar [5, 59, 60], ou seja, sinais que se caracterizam por um amplo espectro de emissão (entre 200 nm e 850 nm) e de ultra-baixa intensidade (entre 10 e 10^4 *fótons.cm⁻².s⁻¹*). Portanto, para se realizar medições de emissões de fótons tanto espontâneas quanto estimuladas, são necessários dispositivos especiais para contagem de fótons, que apresentem alta sensibilidade e baixo ruído, de forma a alcançar altas relações Sinal/Ruído, já que a maior limitação técnica para medição destes sinais está associada ao ruído adicionado a estes. Estes dispositivos devem ser capazes de operar em contagem de fótons, sendo as opções atualmente disponíveis as Válvulas Fotomultiplicadoras (do idioma inglês: *Photomultiplier Tube* - PMT), as Câmeras CCD (do idioma inglês: *Charge-Coupled Devices*) e os MCP-MTs (do idioma inglês: *Micro-Channel Plate-Photomultipliers Tubes*) [52].

A opção de menor custo e maior simplicidade de montagem recai sobre as Válvulas Fotomultiplicadoras que devem ser escolhidas com cuidado para atender às especificidades dos sinais em biofotônica, ou seja, capaz de detectar de 10 a 10^4 *fótons.cm⁻².s⁻¹*, em uma área de até 20 cm^2 . A opção de uso de Câmeras CCD e MCP redundam em um alto custo de utilização, onde se deseja obter informação da distribuição espacial das emissões.

2.4.1 A válvula fotomultiplicadora

As válvulas fotomultiplicadoras (*Photomultiplier Tube* - PMT) são ainda o meio mais comum para detecção de luz de ultra-baixa intensidade, podendo operar na contagem de fótons (*single photon counting*) e tendo ampla aplicação em espectroscopia, biotecnologia, medicina nuclear, na construção das gama câmaras, em experimentos na área da física de altas energias e aeroespacial [52].

2.4.1.1 Funcionamento da válvula fotomultiplicadora

As PMTs são essencialmente sensores de luz na forma de um tubo selado a vácuo (10^{-5} Pa) dotado de uma janela para a entrada da luz, fotocatodo, eletrodo de foco, multiplicador de elétrons (ou dinodos) e o anodo, como ilustrado pela Figura 2.18.

A luz que atravessa a janela de entrada excita os elétrons do Fotocatodo que através do efeito fotoelétrico emite elétrons, os fotoelétrons. Estes fotoelétrons são acelerados eletrostaticamente e enviados pelo eletrodo de focalização na direção de uma série de eletrodos intermediários, os Dinodos. Ao incidirem no primeiro Dinodo os fotoelétrons dão origem a elétrons secundários, que também serão acelerados eletrostaticamente em direção ao segundo Dinodo, e assim por diante, até serem coletados pelo Anodo. Ao chegar ao anodo, o fluxo de elétrons já terá sido multiplicado por várias ordens de grandeza, caracterizando, assim, o ganho (G) do dispositivo.

Para a operação da PMT é necessário uma fonte de alta tensão, normalmente entre 1 kV e 2 kV, circuito divisor de tensão para dividir a alta tensão entre os dinodos de forma ótima, blindagem contra fontes de campos elétricos e magnéticos externos, alojamento contra fontes de luz externas e circuito de detecção. O diagrama de circuitos necessários para a operação da PMT pode ser visto na Figura 2.18 (b).

A estabilidade da fonte de alta tensão é um fator crítico na operação da PMT, uma vez que o ganho desta, sendo extremamente alto, sofre com qualquer variação na tensão de alimentação. Como regra, se a estabilidade desejada para a PMT for 1 %; a estabilidade da fonte de alta tensão não deve ser inferior a 0,1 %, isto mostra a dificuldade em se especificar uma fonte de alimentação de alta tensão para a PMT. O uso de um Módulo PMT, com fonte de alta tensão integrada, oferece uma boa solução para este problema, e assim, precisa-se somente uma fonte externa de baixa tensão; em geral, estes módulos são alimentados com uma tensão contínua de +15 V, admitindo certo grau de zumbido (*ripple*).

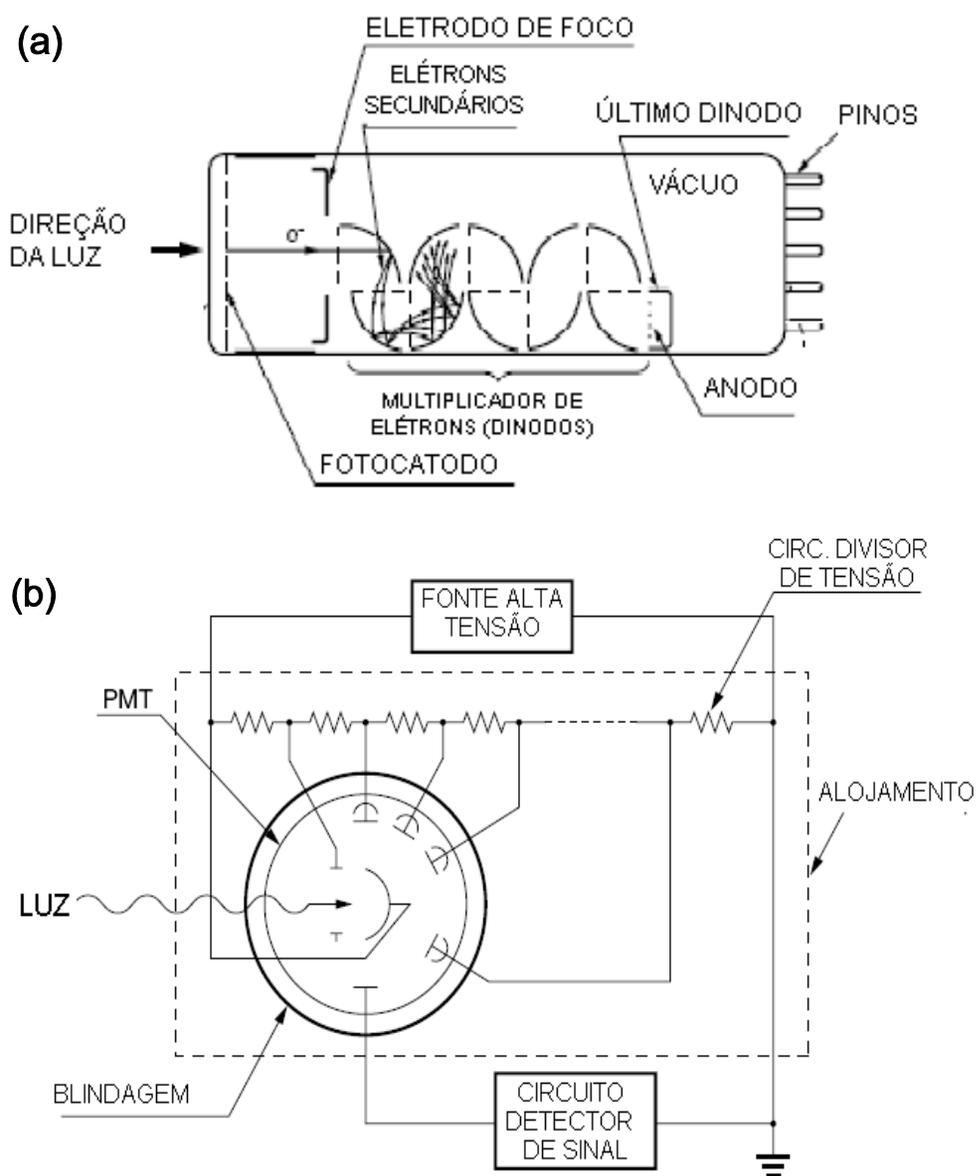


Figura 2.18 – Diagrama simplificado de uma PMT (a), e diagrama de circuitos necessários para sua operação (b), adaptado de [52]

Para aplicações onde se deseja contagem de fótons, alguns fabricantes de PMTs disponibilizam ainda, o que chamam de Cabeçotes de Contagem de Fótons (*Photon Counting Head*), onde além da válvula fotomultiplicadora e fonte de alta tensão, isto é integrado com um circuito discriminador para gerar pulsos de contagem, sendo em geral alimentados por uma única fonte de corrente contínua de +5 V, devendo ser conectado a um contador de pulsos externo.

2.4.1.2 PMT em contagem de fótons

Uma PMT estará em operação para a contagem de fótons (no idioma inglês: *Single Photon Counting - SPC*) quando não mais que dois fotoelétrons são emitidos dentro do tempo de resolução da PMT. Neste tipo de operação, os fótons incidentes no fotocátodo da PMT produzem fotoelétrons que serão multiplicados pelas emissões secundárias nos dinodos alcançando o anodo com um fator de multiplicação de 10^6 a 10^7 , ver Figura 2.19.

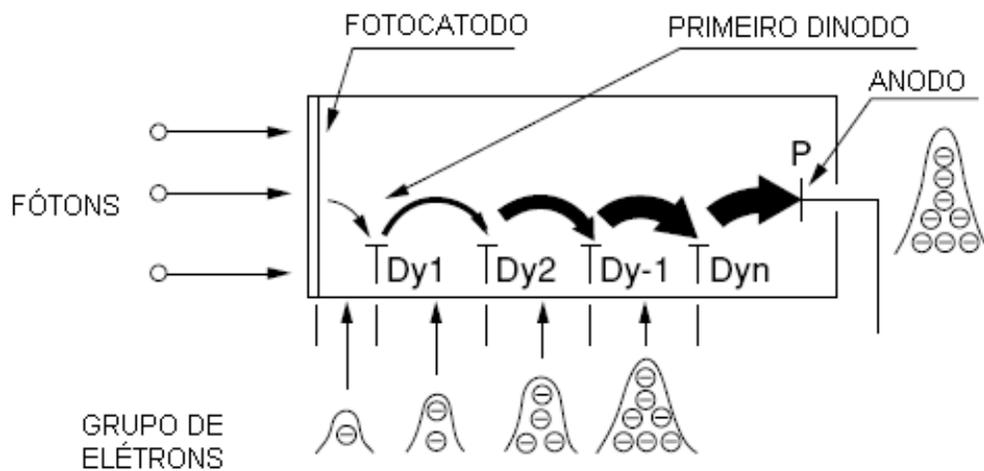


Figura 2.19 – Diagrama simplificado de uma PMT (a), e diagrama de circuitos necessários para sua operação (b), adaptado de [52].

A configuração dos circuitos necessária para a utilização da PMT no modo de contagem de fótons é mostrada na Figura 2.20. Nesta configuração, após a PMT há um amplificador para suprir o circuito discriminador com um sinal de nível apropriado para sua operação, e em seguida o circuito formatador de pulsos e por fim o circuito lógico contador que integraliza as contagens dos pulsos provenientes da válvula fotomultiplicadora a uma dada base de tempo.

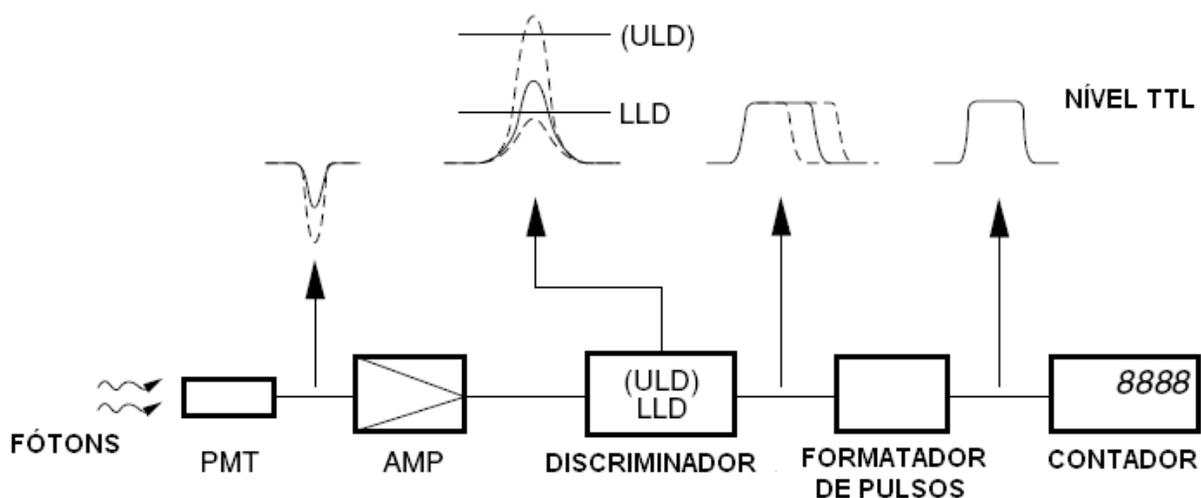


Figura 2.20 – Circuitos usados no modo contagem de fótons de uma PMT, adaptado de [52].

2.4.2 Características construtivas das PMTs

2.4.2.1 Fotocatodo

Sendo a área foto-sensitiva da PMT, o fotocatodo deve ser bem caracterizado para uma determinada aplicação, pois sua sensibilidade dependerá de vários fatores, especialmente da forma e tamanho de sua área ativa, sendo que para contagem de fótons a geometria da área ativa da válvula deverá ser do tipo diâmetro eletrostaticamente reduzido, minimizando a contagem de escuro e melhorando a relação sinal/ruído.

O tipo de composto usado na fabricação do fotocatodo influencia na resposta espectral da PMT, e o melhor tipo será aquele com máxima resposta na faixa de comprimentos de onda de interesse. Além disto, a espessura do fotocatodo é de fundamental importância, uma vez que se muito espesso seu material pode absorver fótons, e se muito fino os fótons atravessarão o fotocatodo sem colidir com elétrons.

Quanto ao processo de emissão do fotoelétron, os fotocatodos podem ser divididos em 2 tipos: reflexivos e transmissivos. Nos reflexivos o material do fotocatodo é constituído de uma placa de metal, e neste caso os fotoelétrons são emitidos na direção oposta da luz incidente. Por outro lado, nos transmissivos, o material do fotocatodo é filme fino depositado em uma placa de

vidro dotado de transparência óptica, e neste caso os fotoelétrons são emitidos na mesma direção da luz incidente.

A seguir estão listados alguns tipos de materiais usados nos fotocátodos das PMTs e suas principais características [52]:

- **Cs-I e Cs-Te:** Não respondem à luz solar, sendo usadas em detecção UV no vácuo e comprimentos de onda não superiores a 200 e 300 nm, respectivamente;
- **Sb-Cs:** Sensível de UV a visível, apropriada para aplicações onde a intensidade da luz é relativamente alta;
- **Bialkali (Sb-Rb-Cs, Sb-K-Cs):** Assim chamados por usar 2 tipos de metal alcalino. Maior sensibilidade e menor corrente de escuro se comparada ao tipo Sb-Cs. Muito usado em contagem de cintilação para medidas de radiação;
- **Bialkali para alta temperatura e baixo ruído (Sb-Na-K):** Pode operar até 175 °C (fotocátodos normais < 50 °C), porém, sensibilidade menor. À temperatura ambiente exibem baixas correntes de escuro. Muito usado na indústria do petróleo;
- **Multialkali (Sb-Ba-K-Cs):** Assim chamados por usar 3 ou mais tipos de metal alcalino. Ampla resposta espectral de UV a *Near-IR*. Usado em espectroscopia de ampla banda;
- **Ag-O-Cs:** Resposta espectral de visível a *Near-IR*; sensibilidade maior em comprimentos de onda maiores; em razão disto, usado em detecção de *Near-IR*;
- **GaAsP (Cs):** Cristal de GaAsP ativado com Césio. Não responde a UV tendo alta eficiência quântica na região visível. Resposta quase plana de 300 a 850 nm;
- **GaAs (Cs):** Cristal de GaAsP ativado com Césio. Capaz de responder de UV, a *Near-IR*;
- **InGaAs (Cs):** Similar ao GaAs (Cs), alcançando 1000 nm;
- **InP/InGaAsP (Cs) e InP/InGaAs (Cs):** Usa junção PN, podendo contar fótons em 1,7 μm e sendo necessário resfriá-lo de -60 a -80 °C.

2.4.2.2 Janela óptica da PMT

Outro fator importante é a influência da transmissão de luz na janela óptica da PMT, sendo dada grande atenção na especificação do tipo de material usado na sua fabricação, uma vez que o conteúdo espectral da luz recebida é alterado pela transmissão óptica através da janela, especialmente na faixa de UV [52].

Os principais tipos de materiais usados nas janelas ópticas são os listados a seguir:

- **Cristal de MgF_2** : tem melhor resposta na faixa da radiação UV até cerca de 150 nm;
- **Safira**: feita de cristal de Al_2O_3 possui transmitância na região UV intermediária entre Vidro UV-transmissivo e a sílica sintética, e uma resposta até 150 nm;
- **Sílica sintética**: capaz de transmitir UV até 160 nm;
- **Vidro UV-transmissivo**: capaz de transmitir UV até 185 nm;
- **Borosilicato**: é o tipo mais comumente usado, também chamado Vidro Kovar em razão de seu coeficiente de expansão térmica ser muito próximo da liga Kovar usada nos terminais dos tubos das PMTs. O comprimento de onda mínimo se situa em 300 nm.

Na Figura 2.21 estão ilustradas as transmitâncias dos vários materiais utilizados na fabricação da janela óptica das PMTs.

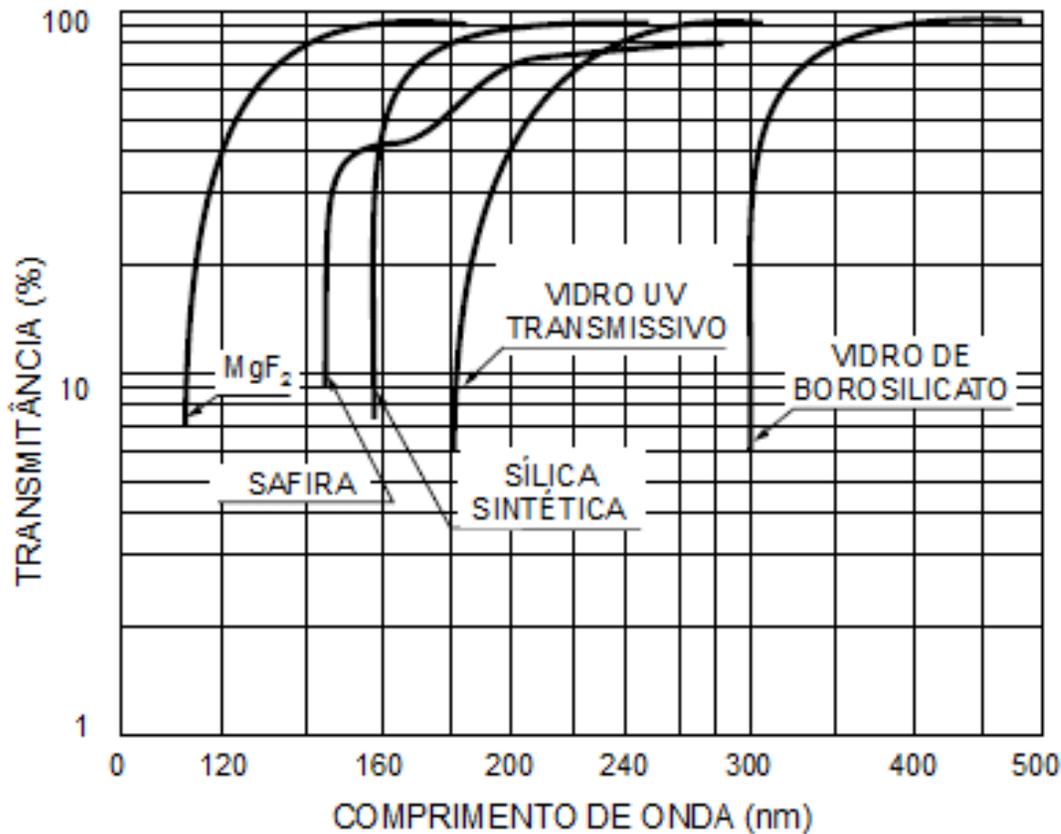


Figura 2.21 – Características de transmitância dos materiais usados nas janelas das PMTs, adaptado de [52].

2.4.2.3 Dinodos

Como já explicado, na seção 2.4.1.1, a tensão aplicada a cada dinodo pelo circuito divisor de tensão, que é da ordem de centenas a milhares de Volts, deve ser cada vez mais positiva em relação ao dinodo anterior para garantir a aceleração dos elétrons e a efetiva amplificação [52].

Os dinodos das PMTs são normalmente feitos de materiais emissores de elétrons, como: óxido de berílio (*BeO*), óxido de magnésio (*MgO*), fosfeto de gálio (*GaP*) ou fosfeto arsenato de gálio (*GaAsP*), em um substrato de níquel, aço-inox ou liga de cobre e berílio, sendo que cada dinodo produzirá de 5 a 10 elétrons secundários a partir de um elétron primário, e uma PMT típica tem de 9 a 12 estágios de dinodos.

Os vários tipos de estruturas de dinodos existentes são apresentados na Figura 2.22, a seguir.

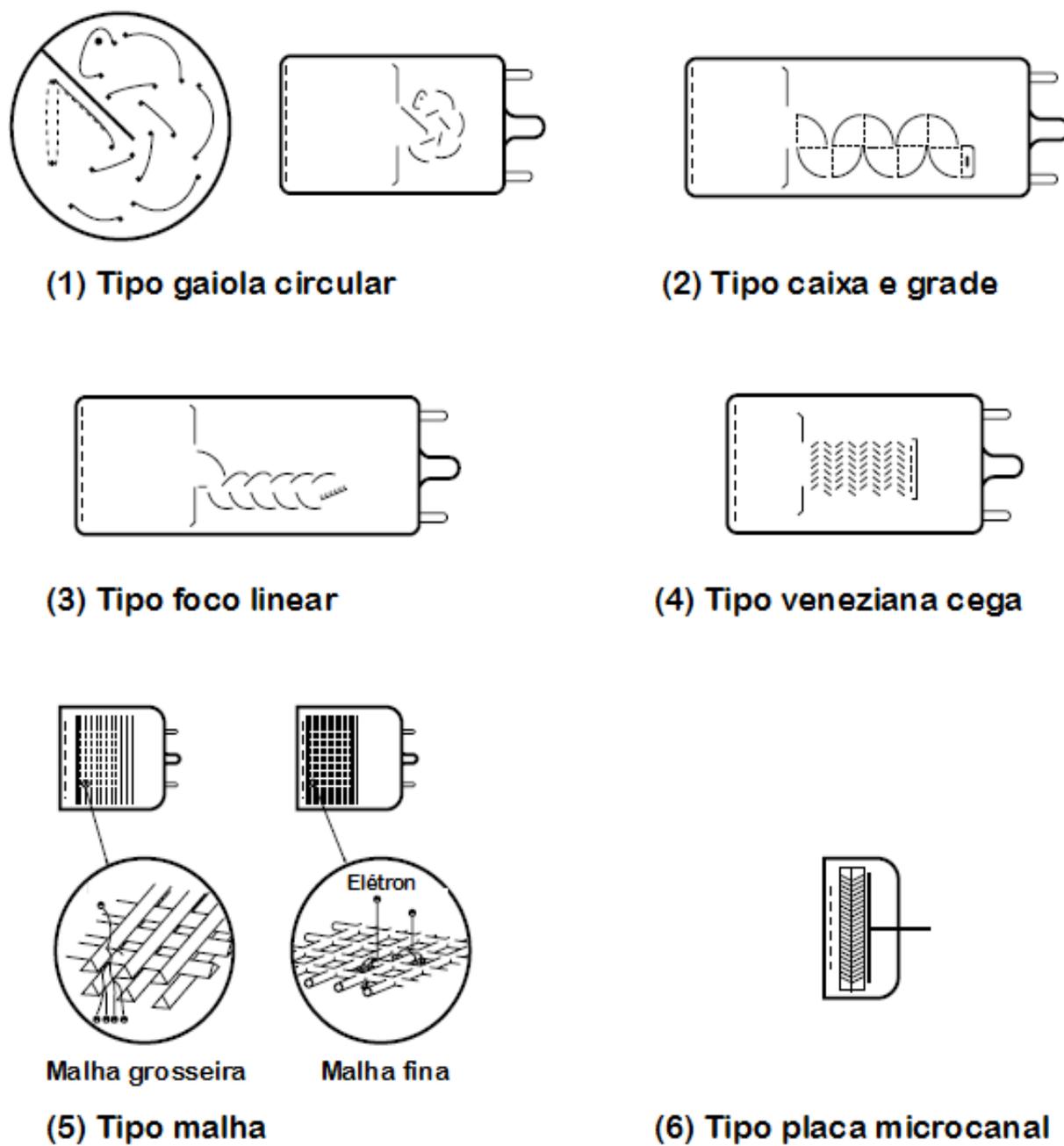


Figura 2.22 – Tipos de estruturas de multiplicadores de elétrons, adaptado de [52].

Cada uma das estruturas de dinodos da Figura 2.22, apresenta características próprias em relação ao ganho, tempo de resposta, uniformidade e eficiência, sendo que a escolha deverá ser feita em função das características desejadas, conforme breve descrição a seguir:

- **Gaiola circular (*Circular cage*)**: apresenta tempos de resposta rápidos, além da evidente vantagem de ser compacto;
- **Caixa e grade (*Box-and-grid*)**: apresenta alta eficiência de detecção e boa uniformidade, sendo largamente utilizado em *head-on* PMTs;
- **Foco linear (*Linear-focused*)**: apresenta uma resposta rápida com boa resolução temporal, e excelente linearidade de pulso;
- **Veneziana cega (*Venetian blind*)**: apropriado para PMTs com fotocatodos de maior diâmetro
- **Malha (*Mesh*)**: apresenta excelente linearidade e alta imunidade a campos magnéticos;
- **Placa microcanal (*Micro-channel plate*)**: este proporciona sensibilidade espacial e assegura ganho estável em campos magnéticos elevados, com excepcional resolução temporal.

2.4.3 Especificações técnicas das PMTs

2.4.3.1 Resposta espectral da PMT

Sendo o fotocatodo o elemento sensor que converte a energia dos fótons incidentes em fotoelétrons, a eficiência desta conversão (sensibilidade do fotocatodo) se torna dependente do comprimento de onda da luz incidente, sendo esta relação conhecida como a característica de resposta espectral do fotocatodo, sendo expressa em termos da eficiência quântica e da sensibilidade radiante, definidos logo a seguir [52].

Faixa de resposta espectral - Para a faixa de resposta espectral são definidos os limites dos comprimentos de onda de corte superior e inferior, sendo o comprimento de onda inferior determinado pelo material da janela e o comprimento de onda superior dependendo do material do fotocatodo. A faixa de comprimentos de onda entre os dois limites é definida como faixa de resposta espectral.

Eficiência quântica $QE(\%)$ ou $\eta(\lambda)$ - Os fótons incidentes no fotocátodo transferem energia aos elétrons da banda de valência deste, porém nem todos os elétrons serão emitidos como fotoelétrons, pois o mecanismo obedece a um processo probabilístico. A eficiência quântica mede a eficiência nesta conversão fotoelétrica num determinado comprimento de onda, ou seja, o percentual de fótons que é capaz de gerar elétrons, naquele comprimento de onda. Portanto, é um parâmetro fundamental de um fotomultiplicador já que dá uma noção de qual será a relação sinal/ruído, sendo de importância ainda maior quando se deseja efetuar contagem de fótons:

$$QE(\%) = \eta(\lambda) = \frac{N_E}{N_I} \cdot 100 \quad (2.13)$$

sendo: N_E é número de fotoelétrons e N_I é número de fótons incidentes.

Sensibilidade radiante $E(\lambda)$ ou S_K - A sensibilidade radiante é definida como a corrente emitida pelo fotocátodo por unidade de potência radiante da fonte em um determinado comprimento de onda, medido em (A/W). Além disto, características de resposta espectral relativas são também usadas quando a sensibilidade radiante máxima é normalizada para 100%:

$$E(\lambda) = S_K = \frac{I_K}{L_P} \cdot 100 \quad (2.13)$$

sendo: I_K é a corrente de fotocátodo e L_P é a intensidade de fluxo radiante como definido na seção 2.3.3.1.

Relação entre $E(\lambda)$ e $\eta(\lambda)$ - A relação entre Eficiência Quântica e Sensibilidade Radiante, pode ser expressa quando se observa as equações que descrevem a energia de um fóton (E) e a quantidade de fótons por segundo emitidos de uma fonte radiante. Sendo a energia do fóton $E=h.c/\lambda$, então a quantidade de fótons por segundo n_f de uma fonte radiante será dada por:

$$n_f = P \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c} \quad (2.14)$$

sendo: P é a potência radiante da fonte (J/s), $h=6,6262 \cdot 10^{-34}$ ($J \cdot s$) é a constante de Planck, λ é o comprimento de onda, $c=3 \cdot 10^8$ (m/s) é a velocidade da luz no vácuo.

Sabendo-se ainda que a corrente do fotocátodo é expressa pela equação 2.15:

$$I_K = P \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c} \cdot \eta(\lambda) \cdot e \quad (2.15)$$

sendo: $e=1,602 \cdot 10^{-19}$ (C) é a carga do elétron.

Então, por definição:

$$E(\lambda) = \frac{I_K}{P} = \frac{P \cdot \frac{\lambda}{h \cdot c} \cdot \eta(\lambda) \cdot e}{P} = \frac{\lambda \cdot \eta(\lambda) \cdot e}{h \cdot c} = \frac{\lambda \cdot \eta(\lambda)}{1,24} \quad (2.16)$$

Ou ainda, a eficiência quântica pode ser obtida da sensibilidade radiante usando-se a equação 2.17:

$$\eta(\%) = \frac{1240 \cdot S_K \cdot 100}{\lambda} \quad (2.17)$$

sendo: S_K é a sensibilidade radiante.

Sensibilidade luminosa - É comum a especificação da sensibilidade de PMTs comuns através da sua sensibilidade luminosa, que é um parâmetro mais prático de se avaliar que a resposta espectral que demanda um sistema sofisticado e caro para poder ser levantada. A sensibilidade luminosa corresponde à corrente obtida no cátodo ou ânodo dividida pelo fluxo luminoso (lúmen) de uma lâmpada de tungstênio a uma temperatura de 2856 K, sendo um lúmen a iluminação produzida por um fluxo de um lux em uma área de um metro quadrado.

2.4.3.2 Eficiência de captação e eficiência de detecção

A eficiência de captação (*Collection Efficiency* - α) corresponde à relação entre o número de elétrons que chegam na área efetiva do primeiro dinodo pelo número de fotoelétrons emitidos, ou seja, é a medida da probabilidade de captação destes fotoelétrons na área efetiva do primeiro dinodo (onde efetivamente ocorre multiplicação) sendo normalmente um valor entre 60 a 90%. Embora nos demais dinodos também existam elétrons secundários que não atingem a área efetiva destes dinodos, o efeito destes é menor, ou quase nulo, em comparação com o primeiro dinodo [52].

A eficiência de detecção (*Detection Efficiency* - DE) é a razão entre o sinal detectado e o sinal de entrada de uma PMT, e para contagem de fótons é expressa como o produto da eficiência quântica do fotocátodo pela eficiência de captação, como na equação 2.18.

$$DE = \frac{N_d}{N_p} = \eta \cdot \alpha \quad (2.18)$$

sendo: N_d é o valor contagem, N_p é o número de fótons incidentes, η é a eficiência quântica e α é a eficiência de captação.

2.4.3.3 Ganho da PMT

O ganho de uma válvula fotomultiplicadora será função do número de dinodos que esta possui, e das tensões aplicadas aos eletrodos intermediários, ou seja, entre os dinodos. Valores típicos de ganho estão na faixa de 103 a 108 dependendo do número de dinodos e da tensão aplicada aos inter-eletrodos [52].

O ganho (G) de uma PMT pode ser calculado pela seguinte expressão 2.19, a seguir:

$$G = \frac{I_A}{I_K} = \alpha \cdot G_1 \cdot G_2 \dots G_n \quad (2.19)$$

sendo: G_1, G_2, G_n são os ganhos em cada dinodo, I_A e I_K são as correntes de anodo e fotocatodo e α é a eficiência de captação.

2.4.3.4 Corrente de escuro

Mesmo na ausência de luz incidente no fotocatodo, uma corrente de saída será obtida no anodo, a Corrente de Escuro, sendo esta corrente produzida por diversas fontes, tais como [52]:

- Elétrons termicamente emitidos pelo catodo e pelos dinodos;
- Ruído gerado por raios cósmicos, isótopos radioativos do invólucro de vidro e raios gama naturais do ambiente;
- Cintilação do invólucro de vidro e suportes dos eletrodos quando elétrons secundários são desviados para estas partes produzindo pulso de corrente de escuro;
- Emissão de elétrons por ação de campos elevados gerados por tensões excessivas aplicadas à PMT;
- Correntes de fuga entre anodo e outros eletrodos e/ou pinos da PMT;
- Correntes de ionização de gases residuais.

A parcela da corrente de escuro gerada por efeito térmico pode ser minimizada submetendo a PMT a resfriamento, as demais fontes já são mais difíceis de serem minimizadas. Além disso, a corrente de escuro aumenta com o aumento da tensão de alimentação. Uma PMT com alta sensibilidade em uma ampla faixa de comprimentos de onda, em geral tende a produzir uma maior contagem de escuro e recomenda-se refrigeração no caso desta faixa de comprimentos de onda ir além de 700 nm.

A medida de corrente de escuro especificada pelos fabricantes em geral são obtidas após a PMT ser mantida por 30 minutos no escuro. Após 30 minutos, as medidas de corrente de escuro serão ainda melhores.

2.4.3.5 Relação Sinal/Ruído

A relação sinal/ruído (no idioma inglês: *Signal to Noise Ratio* - *SNR*) de uma PMT é a relação entre o sinal de saída devido ao sinal luminoso de entrada e o sinal de saída da corrente de escuro [52]. No modo contagem de fótons, a SNR da PMT é melhor que na sua operação analógica, uma vez que, as flutuações nos tamanhos dos pulsos que ocorrem durante o processo de multiplicação desaparecem em razão da presença do circuito de discriminação, como mostrado na Figura 2.20.

A relação sinal/ruído de uma PMT, funcionando no modo contagem de fótons, pode ser calculada pela equação 2.20, a seguir [52]:

$$SNR = \frac{N_S \cdot \sqrt{T}}{\sqrt{N_S + 2(N_B + N_D)}} \quad (2.20)$$

sendo: N_S , N_B e N_D são as contagens por segundo da luz incidente, do ambiente e da corrente de escuro, respectivamente, e T é o período de medição, em segundos.

Na equação 2.20 N_S é obtido subtraindo-se $N_B + N_D$ do total de contagens.

Para se obter a melhor SNR possível, 3 fatores principais devem ser observados: (1) usar uma PMT com a maior eficiência quântica possível na faixa espectral a ser medida; (2) ter a luz incidente a ser medida guiada em direção ao fotocátodo com mínima perda e ótima configuração para detecção da luz; (3) ter a largura de banda a mais estreita possível.

2.4.3.6 Linearidade, uniformidade e estabilidade

As PMTs apresentam boa linearidade na corrente de anodo em uma ampla faixa de níveis de luz incidente, ou seja, possuem uma ampla faixa dinâmica. No entanto, se a luz incidente é muito intensa, a saída começa a se desviar da curva de linearidade ideal, o que é provocado principalmente por características de linearidade do anodo, mas também pelas características de linearidade do fotocátodo se este operar a uma baixa tensão de alimentação e corrente elevada. As

características de linearidade do fotocatodo e do anodo são dependentes somente do valor de corrente, se a tensão de alimentação for mantida constante, sendo independente do comprimento de onda da luz incidente [52].

A uniformidade do fotocatodo é a medida da variação do sinal de saída em relação à posição do fotocatodo. A uniformidade do anodo pode ser interpretada como o produto da uniformidade do fotocatodo pela uniformidade do multiplicador de elétrons [52].

A estabilidade de uma PMT é a medida da variação do sinal de saída em relação ao tempo de operação, podendo ser designada como desvio (*drift*) que se caracteriza por ocorrer em curtos períodos de tempo, ao longo da vida útil, que ocorre por tempos consideravelmente maiores de 1000 a 10.000 horas. Outro fator de instabilidade se refere à fadiga que a PMT é submetida pela fonte de alimentação e pela temperatura ambiente. Quando a medida que se deseja realizar deve ter estabilidade de alguns poucos pontos percentuais, recomenda-se um prévio envelhecimento de algumas horas até dezenas de horas ou, ainda, esquentar a PMT por cerca de 30 a 60 minutos para reduzir o desvio [52].

3 PROJETO E TESTES DO SISTEMA

3.1 ARQUITETURA DO SISTEMA

A arquitetura do sistema da câmara escura, mostrando os principais elementos mecânicos, eletrônicos e fotônicos, pode ser visto na Figura 3.1.

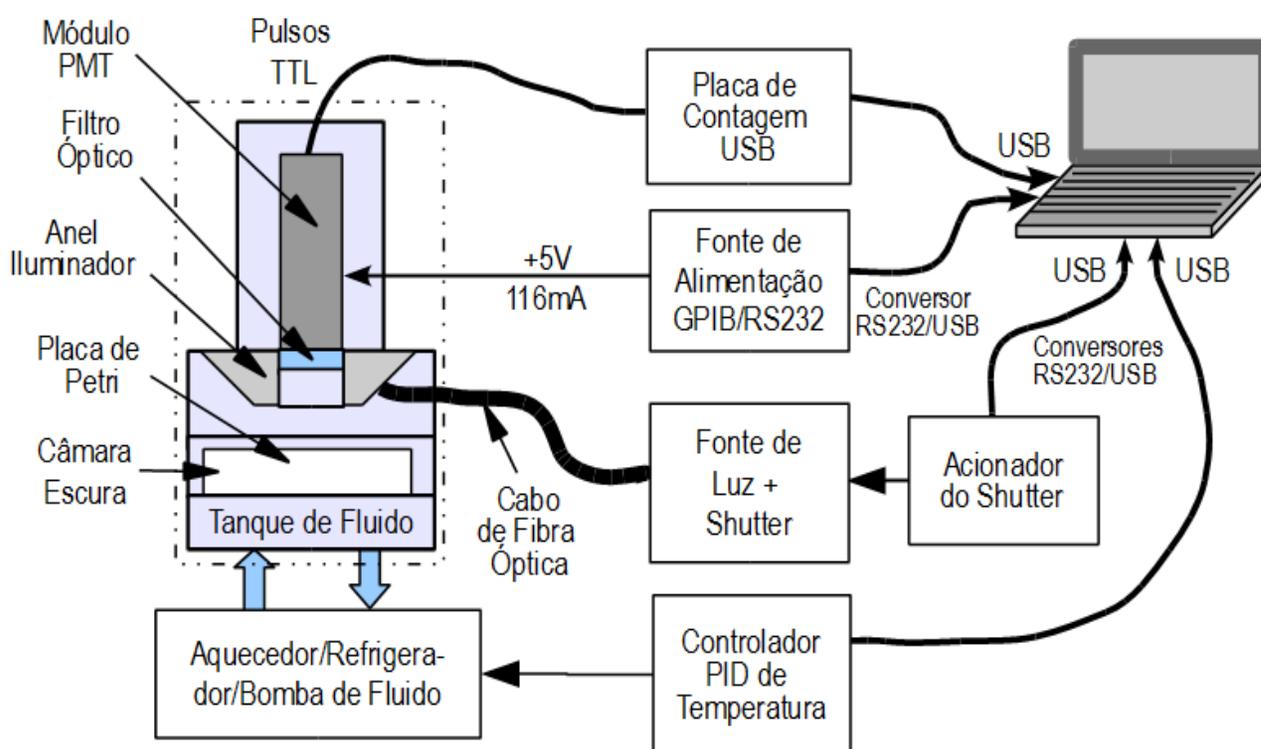


Figura 3.1 – Diagrama em blocos esquemático do sistema da câmara escura.

A Figura 3.2, a seguir, mostra a foto do sistema físico real contendo os blocos que constituem o diagrama da Figura 3.1, exceto a placa de contagem e o microcomputador.

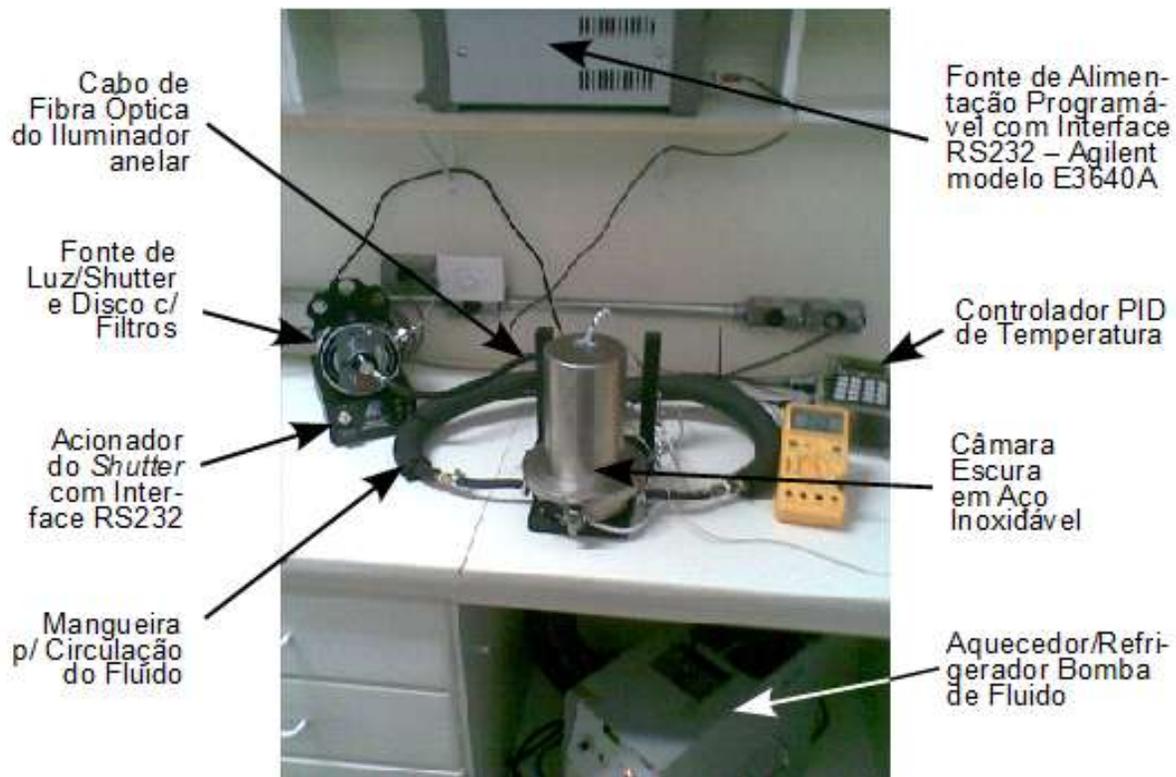


Figura 3.2 – Foto mostrando o sistema real completo, montado na bancada do laboratório, exceto a placa de contagem e o microcomputador.

3.1.1 Projeto da parte mecânica da câmara escura

O projeto das peças da câmara escura, e suas dimensões estão mostrados na Figura 3.3. Fotos da câmara estão nas Figuras 3.4 e Figuras 3.5. As peças foram confeccionadas em aço inoxidável e acomodam a placa de Petri com a amostra biológica sob experimentação na sua parte inferior, o anel iluminador é fixado na parte superior, cerca de 2 cm acima desta placa de Petri. O módulo PMT é fixado na parte superior em uma câmara fechada. Observa-se na Figura 3.3 que a câmara mede 227 mm de altura e 165 mm de diâmetro na sua base.

Na parte inferior da câmara, além do espaço para acomodar uma placa de Petri de até 10 cm de diâmetro, há um reservatório de fluido, logo abaixo da superfície onde a placa repousará. O fluido é mantido sob temperatura controlada, e circulando através de um sistema de controle de temperatura, como descrito na seção 3.1.2.4.

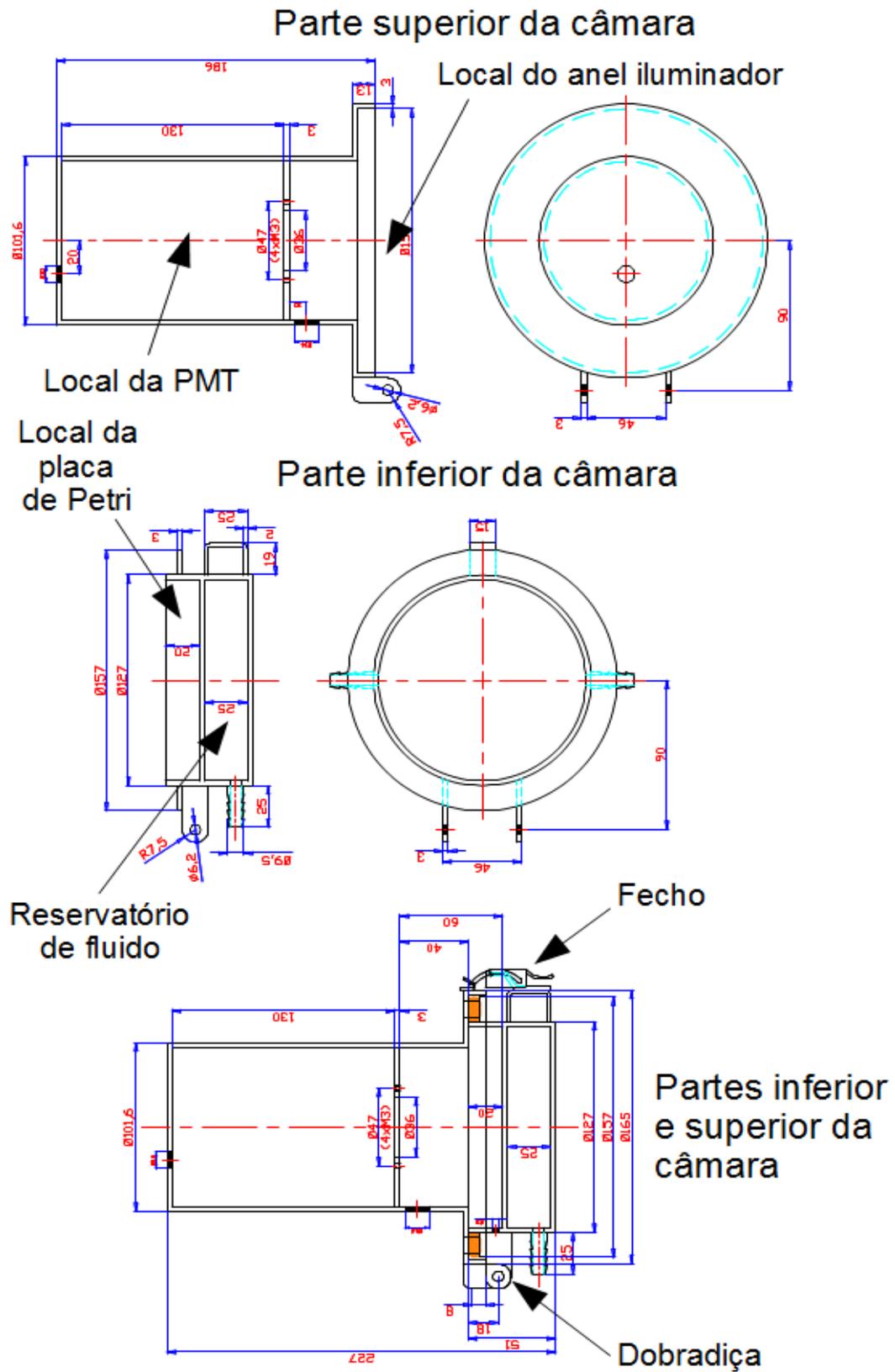


Figura 3.3 – Projeto da câmara escura em AutoCAD.

Na Figura 3.3, do desenho da câmara, estão apontadas as localizações físicas do módulo PMT, anel iluminador, placa de Petri e o reservatório para o fluido de controle de temperatura da placa de Petri, e nas Figuras 3.4 e 3.5 estas localizações podem ser vistas nas fotos das peças das partes inferior e superior da câmara. Nestas peças foram providas furações para as fixações e passagens para a conexão elétrica do módulo PMT, cabo de fibra óptica do anel iluminador, e para a admissão e saída do fluido do reservatório de fluido.

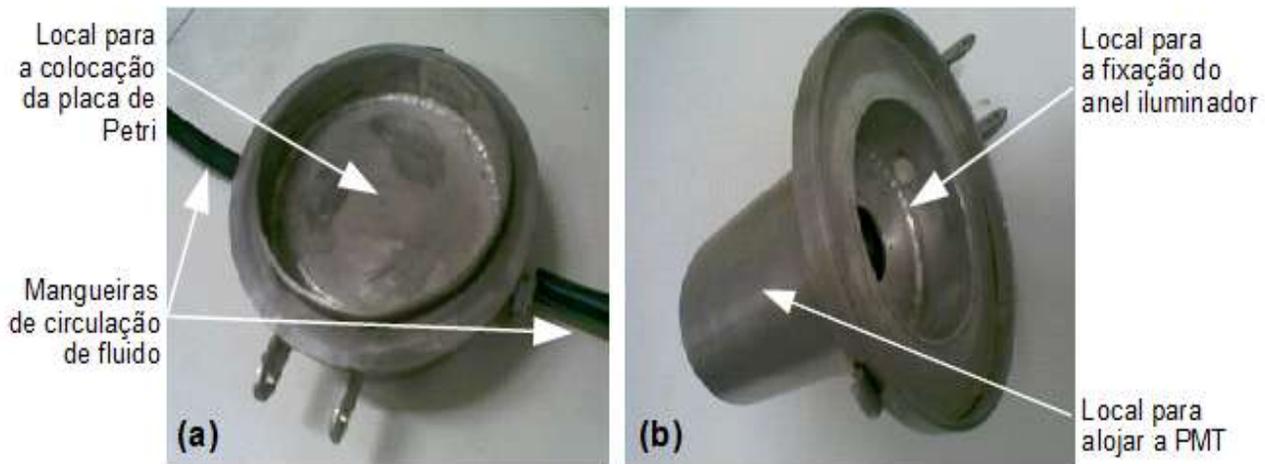


Figura 3.4 – Fotos das partes inferior (a) e superior (b) da câmara, ainda em fase de construção. Em (a) estão mostradas, ainda, as mangueiras de entrada e saída de fluido na câmara de fluido; e em (b) estão mostradas as localizações de fixação do anel iluminador e de alojamento da PMT.

Cuidado especial foi tomado na vedação das partes superior e inferior da câmara que, quando fechada, deve garantir que nenhuma luz seja capaz de entrar no seu interior. Para tanto, um anel de borracha de vedação foi colado na borda da parte inferior da câmara. Quando a câmara é fechada a parte superior exerce pressão sobre a borracha de vedação, e desta forma garante que não haja qualquer passagem de luz do exterior. Para garantir a integridade da válvula fotomultiplicadora contra a sua ativação inadvertida quando a câmara estiver aberta, um interruptor do tipo normalmente aberto foi colocado de modo que somente quando esta estiver fechada é possível o acionamento da PMT através do programa de controle feito em LabVIEW. A Figura 3.5, a seguir, mostra em (a) o anel de borracha de vedação na borda da parte inferior da câmara e o *push-button* com a câmara aberta (contato desligado), e em (b) esta fechada (contato ligado).

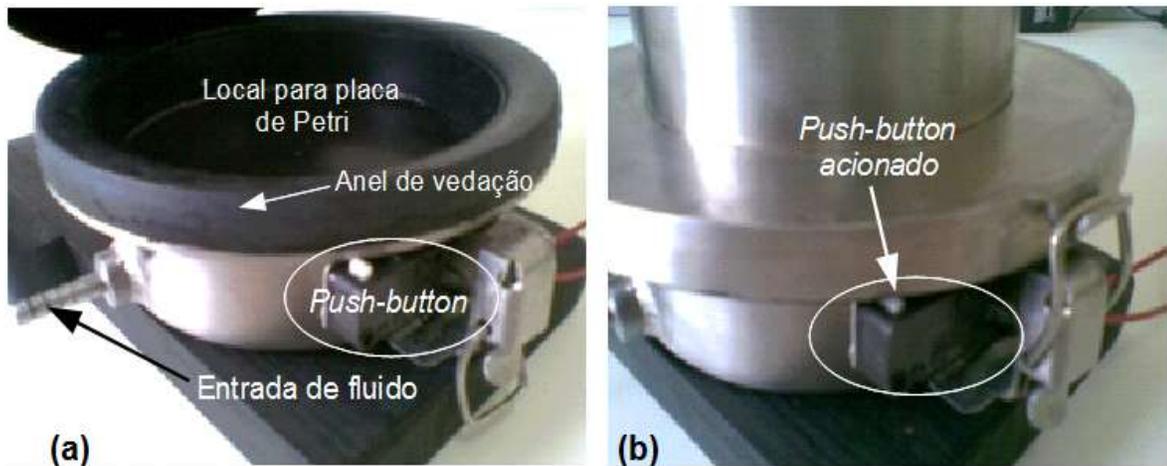


Figura 3.5 – Detalhes do mecanismo de proteção da câmara. Em (a) a câmara está aberta, mostrando o local onde a placa de Petri é colocada, a presença do anel de vedação, a entrada de fluido, e o *push-button*. Em (b) a câmara fechada e o *push-button* acionado.

3.1.2 Projeto eletrônico e fotônico

Os dispositivos que constituem o sistema eletrônico de detecção e contagem de fótons, mostrados no diagrama em blocos da Figura 3.1, serão descritos a seguir. Basicamente, o sistema eletrônico da câmara escura é constituído do módulo PMT, placa de contagem de pulsos USB, dispositivo iluminador anelar da amostra, *shutter* para a fonte de luz do iluminador, controlador de temperatura da amostra e fonte de alimentação programável controlada via RS232, sendo cada um destes subsistemas descritos a seguir.

3.1.2.1 Módulo PMT

O Módulo PMT da empresa japonesa Hamamatsu, modelo H7360, cuja foto é mostrada na Figura 3.6, incorpora uma válvula fotomultiplicadora, sensível ao espectro da luz visível e circuitos eletrônicos associados como fonte de alta tensão e condicionador de pulsos. Este módulo, portanto, detecta e condiciona os pulsos de contagem que serão entregues à placa de contagem com um mínimo de circuitos eletrônicos, sendo necessária apenas uma fonte de tensão contínua de +5 V. Esta tensão é fornecida por uma fonte de alimentação programável de fabricação da

Agilent Technologies, modelo E3640A, sendo controlada pelo programa de controle em LabVIEW.



Figura 3.6 – Detalhes do mecanismo de proteção da câmara. Em (a) a câmara está aberta, mostrando o local onde a placa de Petri é colocada, a presença do anel de vedação, a entrada de fluido, e o *push-button*. Em (b) a câmara fechada e o *push-button* acionado.

O módulo H7360 é fabricado em 3 versões, com sufixos 01, 02 e 03; todas as 3 versões podem operar de 5 a 40 °C, e suas PMTs têm um diâmetro da área efetiva do fotocátodo de 22 mm. A Tabela 3.1, a seguir, sumariza as diferenças entre as 3 versões do módulo H7360.

Tabela 3.1 – Diferenças entre as versões do módulo H7360.

Modelo/Especificação	H7360-01	H7360-02	H7360-03
Resposta Espectral (nm)	300 a 650	300 a 650	300 a 850
Pico Sensibilidade (nm)	375	420	420
Ruído de Escuro Típico (cont./s)	15	60	5.000

A Figura 3.7, a seguir, mostra o diagrama em blocos da estrutura interna do módulo H7360, e na Figura 3.8, estão mostradas as características de sensibilidade de contagem em função do comprimento de onda, e do ruído de escuro em função da temperatura para toda a série H7360. Como pode ser visto nesta figura, a versão H7360-01 é a que apresenta menor ruído de escuro, e a versão H7360-02 é a de maior eficiência de detecção, sendo que as duas foram utilizadas na implementação das 2 câmaras escuras montadas.

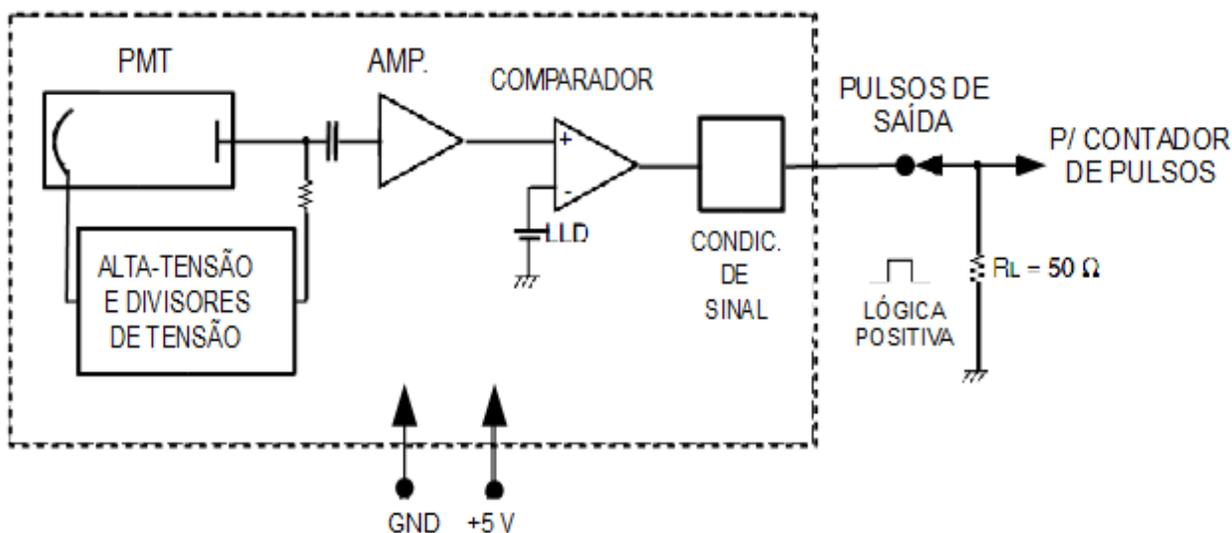


Figura 3.7 – Diagrama em blocos do módulo PMT da Hamamatsu modelo H7360, adaptado de [62].

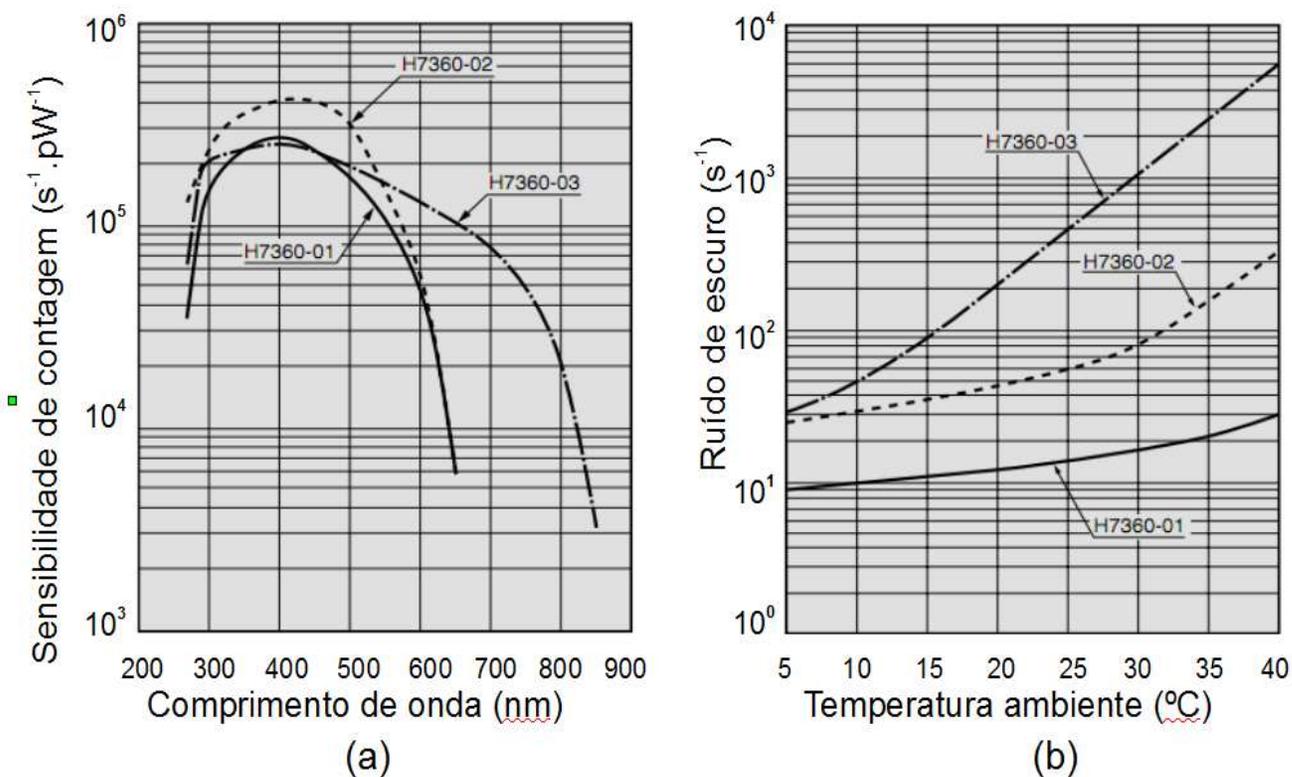


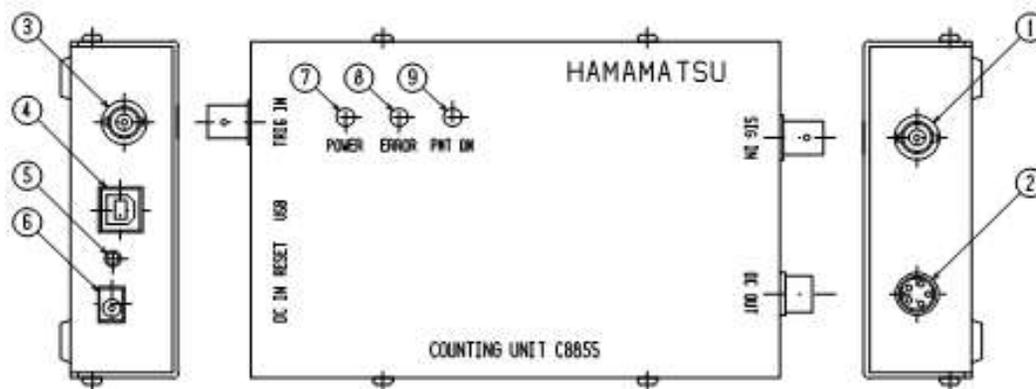
Figura 3.8 – Gráficos da sensibilidade de contagem (a) e ruído de escuro (b) da PMT H7360, adaptado de [62].

3.1.2.2 Placa USB de contagem de fótons

A Placa de Contagem de pulsos usada no sistema aqui descrito é de fabricação da empresa Hamamatsu Corp., modelo C8855, cuja foto e desenhos das vistas superior e laterais indicando seus conectores e indicadores, podem ser vistos na Figura 3.9.

Esta placa possui interface de comunicação USB para a transferência de dados com um PC, sendo capaz de proporcionar 17 intervalos de integração de contagem diferentes, de 50 microsegundos a 10 segundos.

Conforme o diagrama em blocos da placa de contagem, Figura 3.10, esta placa é microcontrolada, possuindo memória tipo FIFO (*first-in first-out*) alimentada por dois contadores (A e B). Isso permite que a contagem dos pulsos provenientes do condicionador de pulsos na entrada de sinal possa ocorrer sem qualquer tempo morto.



- 1- Entrada dos Pulsos
- 2- Saída +5Vcc
- 3- Entrada Trigger
- 4- Conector USB
- 5- Botão de Reset
- 6- Entrada +5Vcc
- 7- Indicador Power On
- 8- Indicador Erro
- 9- Indicador Power Out



Figura 3.9 – Foto e desenhos das vistas superior e laterais da placa de contagem de pulsos C8855, mostrando seus conectores e LEDs indicadores, adaptado de [63].

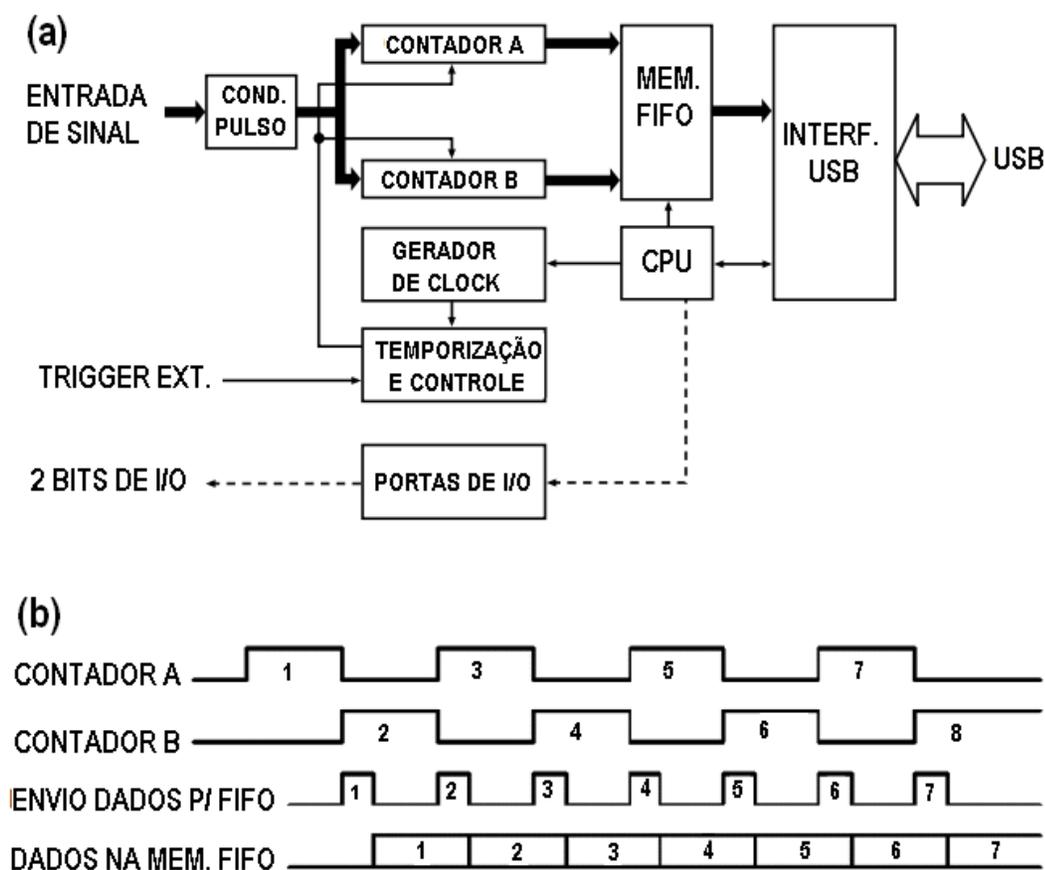


Figura 3.10 – Diagrama em blocos da placa de contagem de fótons C8855 da Hamamatsu (a), temporização da dupla contagem (b), adaptado de [63].

A Figura 3.10 (b) mostra como funciona o esquema de dupla contagem desta placa, quando um contador termina uma contagem no intervalo de tempo especificado no painel frontal do programa de controle em LabVIEW, o outro contador imediatamente inicia a contagem subsequente. Isso possibilita que o dado de contagem do canal que concluiu a contagem possa ser transferido através do barramento USB para o PC, enquanto uma nova contagem está ocorrendo [63].

O microcontrolador da placa de contagem C8855 se comunica via USB com o aplicativo de controle no PC de modo a transmitir os dados de contagem, e selecionar as várias funções da placa tais como: origem do sinal de *trigger* (pode ser interno ou externo); ativação dos 2 pinos de entrada e saída (I/O) de uso geral padrão TTL; ativação da saída de tensão DC; dentre outras funções.

3.1.2.3 Subsistema de iluminação

O subsistema de iluminação é destinado aos experimentos de detecção de Luminescência Retardada (DL) é composto de uma fonte de luz halógena que possibilita três níveis de iluminação diferentes, e ainda é dotado de um disco seletor de filtros ópticos opcionais, dispositivo iluminador anelar, consistindo de um guia de luz de fibra óptica com um anel iluminador na saída da luz, *shutter* óptico fabricado pela empresa Uniblitz - modelo VS25S2T0, e, por fim, o acionador do *shutter* óptico, também da empresa Uniblitz - modelo VMM-D1. O iluminador anelar escolhido para o projeto é fabricado pela Edmund Optics, modelo cujo desenho esquemático está mostrado na Figura 3.11.

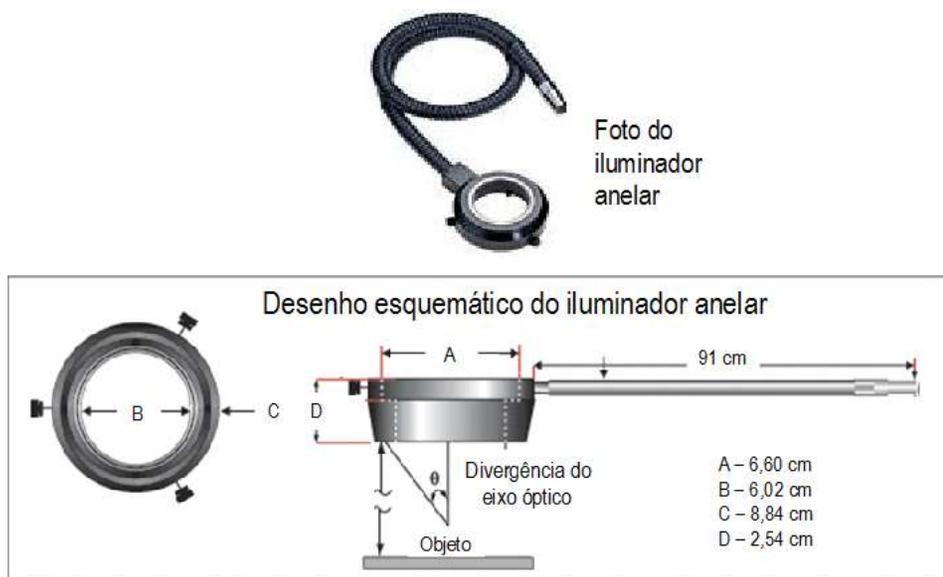


Figura 3.11 – Iluminador anelar com cabo de fibra óptica usado na câmara, adaptado de Edmund Optics.

Uma foto da montagem do iluminador com o *shutter* óptico acoplado a ele, e estes montados acima do acionador do *shutter* está mostrado na Figura 3.12 (a). Os painéis, frontal e traseiro do acionador VMM-D1 estão mostrados na Figura 3.12 (b), acima e abaixo, respectivamente. O anel iluminador de 6,6 cm de diâmetro está fixado a cerca de 20 mm acima da placa de Petri no interior da câmara escura, de modo a proporcionar uma iluminação uniforme sobre esta, como mostrado no diagrama em blocos apresentado na Figura 3.1.

A iluminação no interior da câmara deve ser completamente extinta antes que o módulo PMT possa ser acionado, o que é garantido pelo programa de controle em LabVIEW. Isto ocorre através do uso do *shutter* óptico acoplado à saída da fonte de luz, e controlado pelo acionador do *shutter*. Este acionador é conectado através de uma interface RS232 com um PC, que através do programa de controle em LabVIEW, aciona e desaciona o *shutter* óptico, acoplando e desacoplando a luz ao guia de fibra óptica do iluminador anelar.

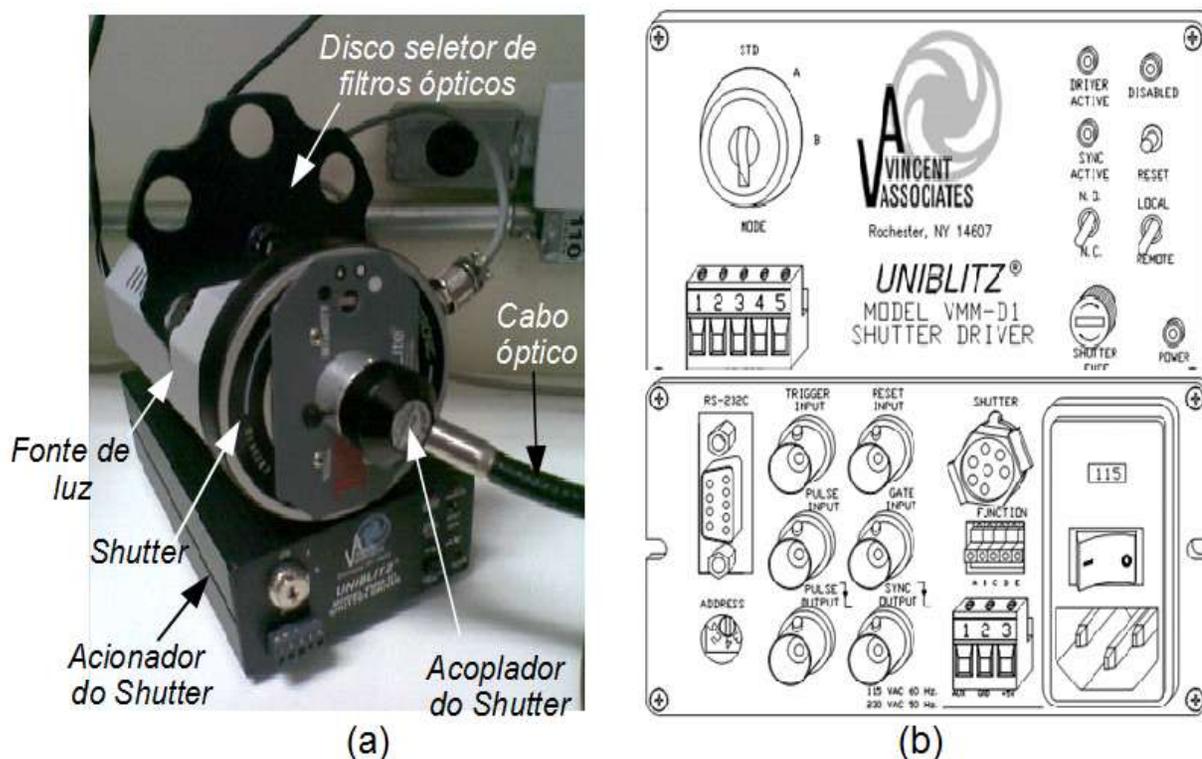


Figura 3.12 –Foto da fonte de luz e *shutter* montado acima do acionador (a). Em (b) diagramas dos painéis frontal (acima) e traseiro (abaixo) do acionador do *shutter*.

3.1.2.4 Controlador PID de temperatura

O controlador PID de temperatura, cujo projeto e implementação foi resultado de um trabalho de conclusão de curso em Tecnologia de Telecomunicações da Faculdade de Tecnologia da Unicamp, em Limeira [64], seguiu as especificações do programa de controle desenvolvido em LabVIEW para o sistema da câmara escura. Este controlador PID de temperatura mantém cons-

tante, em um dado valor de controle, a temperatura do fluido circulante que atravessa o reservatório de fluido, na parte inferior da câmara, conforme mostrado anteriormente na Figura 3.3. A temperatura do fluido estando mantida constante, e estando em circulação sob a superfície onde a placa de Petri com a amostra biológica repousa, manterá a temperatura da amostra biológica controlada.

O controlador PID de temperatura, que atua em conjunto com um controlador de temperatura comercial da marca Julabo, modelo F240, é capaz de controlar a temperatura no interior da câmara entre -10 °C e 50 °C ($\pm 1\text{ °C}$). O controlador comercial Julabo, é constituído de um aquecedor/refrigerador/bomba de fluido, e irá bombear o fluido na temperatura desejada, através do reservatório de fluido mostrado nas Figuras 3.1, 3.3 e 3.4. Além disto, uma resistência adicional foi montada no controlador Julabo F240 de modo a estender a faixa de atuação do controlador Julabo, além, de alcançar um controle mais eficaz através do controlador PID. Uma foto do controlador PID de temperatura está mostrado na Figura 3.13. Nesta pode-se ver a interface com o usuário constituída de um teclado de membrana e um mostrador de cristal líquido alfanumérico.



(a)



(b)

Figura 3.13 – Fotos do aquecedor/refrigerador/bomba marca Julabo (a) e do controlador de temperatura (b).

O circuito eletrônico do controlador PID de temperatura está baseado em um sistema microcontrolado de 8 bits, e *driver* de potência baseado em TRIAC controlado por ângulo de fase, acionando uma resistência dentro do controlador Julabo para aquecimento de um fluido circulante no reservatório situado na base da câmara logo abaixo do local para a placa de Petri.

A comunicação do controlador de temperatura com o PC utiliza a porta serial padrão RS232, sendo esta escolhida por estar presente na maioria dos microcontroladores comerciais de 8 bits, e ser de fácil programação e utilização, ainda com a possibilidade de se usar um conversor de RS232 para USB, caso o PC não possua a interface RS232. O sensor de temperatura instalado no interior da câmara escura é o circuito integrado LM35, o qual é interfaceado com o conversor analógico/digital do microcontrolador. O LM35 fornece uma tensão de saída linearmente proporcional à temperatura em graus Celsius, fornecendo 10 mV/ °C. O sinal do sensor recebido pelo microcontrolador fecha a malha de controle do algoritmo PID, chegando ao menor erro possível em relação ao valor da temperatura desejada. No programa de controle em LabVIEW, mostrado na Figura 3.14, estão apresentados o valor da temperatura desejada e o valor real informado pelo sensor de temperatura, além do canal serial utilizado na comunicação com o controlador PID.

3.1.3 Projeto do programa de controle em LabVIEW

O programa de controle, feito em ambiente LabVIEW, implementa um instrumento virtual (VI), com um painel frontal, como o mostrado na Figura 3.14.

Nesta Figura 3.14 está apresentado o traçado do resultado de um experimento executado para avaliar a evolução das contagens de fótons durante o crescimento de uma colônia de *E. coli* por um período de 24 horas.

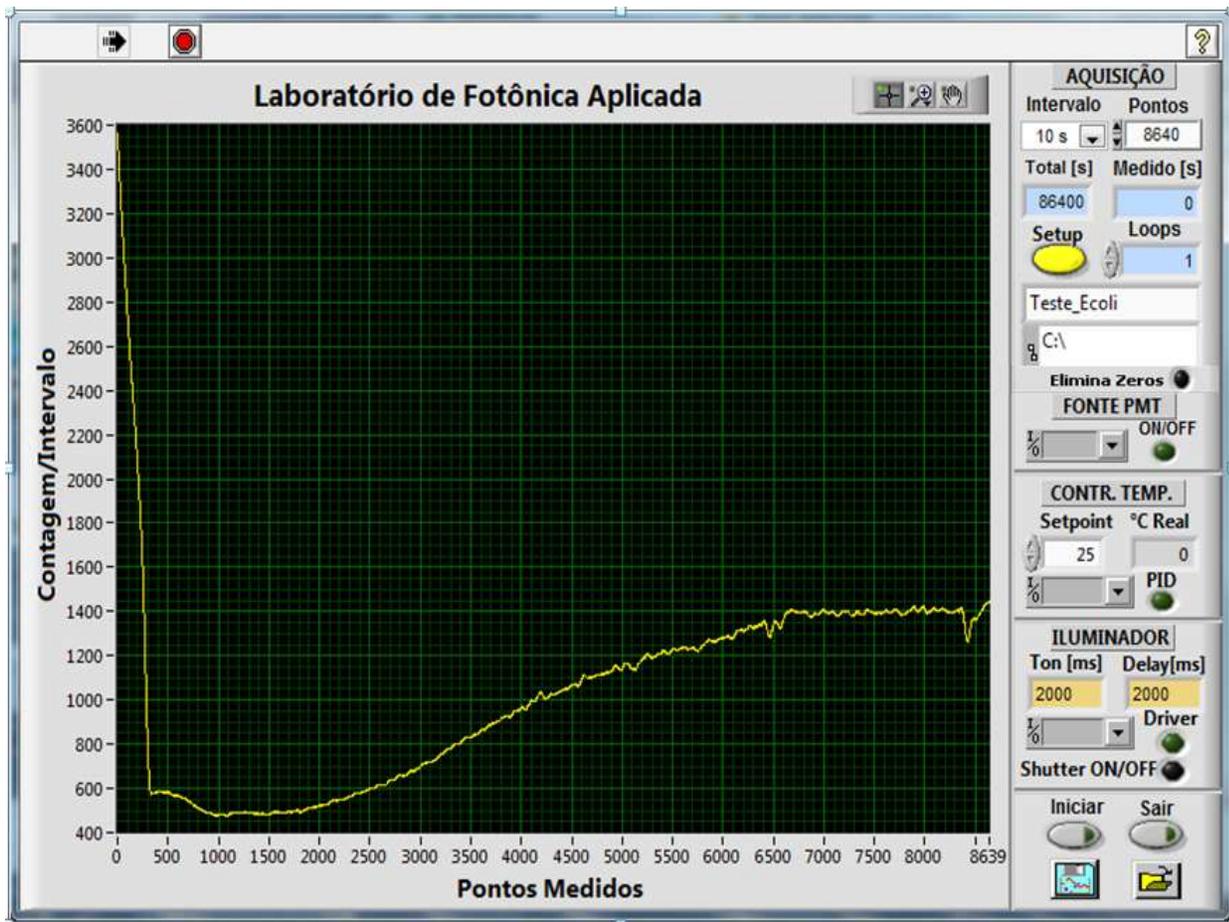


Figura 3.14 – Painel frontal do instrumento virtual feito em linguagem LabVIEW.

3.1.3.1 Descrição da interface com o usuário

A seguir são descritos os controles e indicadores do painel frontal do VI mostrados na Figura 3.14, os quais constituem a interface com o usuário do programa de controle:

- **Controle *Intervalo*:** seleção pelo usuário do intervalo de tempo para a totalização das contagens de fótons. A cada intervalo de contagem a placa de contagem totaliza uma contagem gerando um dado na memória;
- **Controle *Pontos*:** possibilita a entrada pelo usuário do número N total de pontos de contagem de fótons de um *loop* de contagem;

- **Controle *Loops*:** possibilita a seleção pelo usuário do número de vezes que a medição dos N pontos se repetirá, sendo que a cada repetição o arquivo de dados é salvo automaticamente;
- **Indicador *Total [s]*:** indica o tempo total de medição de um experimento em função do intervalo de contagem, do número de pontos totais e do número de *loops* ou repetições;
- **Indicador *Medido [s]*:** indica o tempo de medição transcorrido desde o início da aquisição;
- **Controle *Setup*:** possibilita a seleção pelo usuário de opções de funcionamento do instrumento virtual, como será visto mais adiante;
- **Campos *Descrição e Diretório*:** possibilita a seleção pelo usuário de um nome a ser atribuído ao arquivo de dados salvo automaticamente de forma incremental a cada *loop*, nome este seguido da data de início da aquisição, exemplo: *medida-1406-19h26.txt*. Abaixo do campo *Descrição* aparece o campo *Diretório*, onde está mostrado o local no disco rígido onde o arquivo de dados será salvo;
- **Controle *Elimina Zeros*:** permite selecionar a opção de eliminar as contagens zeradas, que podem ocorrer quando o intervalo de contagem é muito curto;
- **Controles *ON/OFF e I/O*:** permite testar o acionamento da fonte de alimentação da PMT através da interface serial RS232 usada, esta selecionada pelo controle *I/O* ao lado deste;
- **Controle *Setpoint*:** permite selecionar o *Setpoint* de temperatura para o controlador de temperatura *PID*. Abaixo do controle *Setpoint* há o controle *I/O* de seleção da porta serial a ser usada pelo controlador de temperatura;
- **Indicador *°C Real*:** mostra a temperatura da câmara escura recebida do controlador *PID*;
- **Controles *PID e I/O*:** permite habilitar/desabilitar o controlador de temperatura *PID* através da interface serial RS232 selecionada pelo controle *I/O* ao lado deste;
- **Controle *Ton [ms]*:** permite selecionar o tempo, em milisegundos, de iluminação da amostra biológica no interior da câmara escura. Corresponde ao tempo que o acionador do *shutter* o mantém aberto para a passagem de luz da fonte de luz até o anel iluminador, via cabo de fibra óptica. No campo abaixo de *Ton* está o controle de seleção da porta de comunicação serial que controlará o acionador do *shutter*;
- **Controle *Delay [ms]*:** permite acionar o tempo, em milisegundos, que transcorrerá desde o fechamento do *shutter* pelo acionador do *shutter* até que seja iniciada a contagem de fó-

tons. Abaixo do botão *Delay* está o botão *Driver* que habilita/desabilita o funcionamento do acionador do *shutter*, e abaixo deste o indicador *Shutter ON/OFF* indica a ativação do *shutter*;

- **Controles *Driver* e *I/O*:** permite habilitar/desabilitar o acionador do *shutter* através da interface serial RS232 selecionada pelo controle *I/O* ao lado deste;
- **Controles *Iniciar*, *Sair*, *Abrir* e *Salvar*:** respectivamente, inicia a aquisição de dados, encerra o programa, abre e salva arquivo de dados.

3.1.3.2 Estrutura do programa de controle

O programa feito em ambiente LabVIEW que implementa o instrumento virtual foi estruturado usando-se uma máquina de estados, sendo que um dos estados utiliza eventos para monitorar os controles do painel frontal, tornando a programação mais eficiente e de fácil manutenção.

A máquina de estados que implementa a lógica do instrumento virtual é constituída dos estados descritos a seguir, sendo que para uma melhor compreensão do funcionamento do programa de controle, todos os diagramas em blocos em linguagem LabVIEW, devidamente comentados, podem ser consultados no Apêndice A.

- **Estado *Inic*** - neste estado inicializações gerais do programa são feitas como: definições dos valores iniciais dos controles do painel frontal da VI e valores associados aos intervalos de contagem usados pelo firmware da placa de contagem na programação de sua operação. Alguns dos controles são inicializados lendo-se um arquivo de configuração que salva os valores utilizados na última operação do programa pelo usuário, tais como: intervalo de contagem e número de pontos. Neste estado *Inic* a placa de contagem USB C8855 é inicializada. Além disto, a tecla *Iniciar* se torna visível, e a *Finalizar* oculta, e as teclas *Setup* e o campo *Descrição* se tornam piscantes (esquerda inferior) para alertar a necessidade da interferência do usuário. Por fim, a fonte de alimentação e o acionador do *shutter* óptico são desativados via interface serial RS232. Ao final a máquina de estados leva ao estado *Event*;

- **Estado *Event*** - neste estado, uma estrutura de eventos fica na espera de um evento associado a um dos controles do painel frontal; desta forma, estes controles ficam mais facilmente tratados pelo programa. Para cada evento específico, associado a cada controle, um tratamento específico é dado, como descrito a seguir:
 - **Eventos *Loops/Pontos/Intervalo***: basicamente, o que é executado neste evento é o cálculo do tempo total de aquisição em função dos dados de entrada dos controles: *Pontos*, *Intervalo* e *Loops*, sendo estes dados salvos no arquivo de inicialização *Inicializa.ini*, o qual é lido ao se iniciar o programa, carregando estes valores nos respectivos controles;
 - **Evento *Setup***: quando a tecla *Setup* é pressionada, o programa entra numa estrutura que, através de caixas de diálogo, permitem ao usuário selecionar o diretório de destino do arquivo de dados, selecionar a eliminação, ou não, de contagens nulas, e habilitar/desabilitar o uso do iluminador e do controlador de temperatura;
 - **Evento *ON/OFF***: configura a interface RS232, e envia comandos de configuração para a fonte de alimentação Agilent de modo a operar com +5 V em 116 mA na alimentação do módulo PMT;
 - **Evento *PID/Driver***: *PID* permite o acionamento do controlador de temperatura via interface RS232, enviando o valor do *Setpoint* de temperatura, e lendo o valor da temperatura real do sensor LM35. *Driver* permite o controle do acionador do *shutter* via interface RS232, enviando os comandos para abrir e fechar o *shutter* de forma temporizada;
 - **Evento *Descrição***: permite ao usuário entrar uma palavra que descreve o arquivo de dados que será salvo com um nome composto pela descrição seguido do dia, mês, hora e minuto corrente, por exemplo: *medida-1206-15h53.txt*.
 - **Evento *Load***: executa a carga de um arquivo de dados pré-existente na tela. Este arquivo de texto, na forma de 2 colunas, sendo a primeira dos tempos e a segunda do valor das foto-contagens, permite ao programa o cálculo do valor do intervalo de contagem, e do total de pontos da aquisição, sendo estes dados também carregados nos controles respectivos do painel frontal do VI;

- **Evento *Save*:** permite ao usuário salvar o arquivo de dados com um nome por este digitado na caixa de diálogo que se abre. O arquivo será formatado de acordo com o explicado no item anterior *Load*, descrito acima;
- **Evento *Iniciar*:** prepara a aquisição de dados de contagem, com base nas informações dos controles *Intervalo*, *Pontos*, *Loops* e *Descrição*, além de outras variáveis de controle da aquisição. Aparecerá uma caixa de diálogo de confirmação ou não do início da aquisição, se “*sim*” o evento leva ao estado *Start* da máquina de estados, e a aquisição tem início, se “*não*” volta a varrer a estrutura de eventos;
- **Evento *Sair*:** apresenta uma caixa de diálogo na qual o usuário opta por encerrar ou não o programa, se “*sim*” leva ao estado *Stop* da máquina de estados onde o programa é encerrado, se “*não*” volta a varrer a estrutura de eventos.
- **Estado *Start*:** neste estado a aquisição de dados tem início. Como uma primeira etapa, todos os controles do painel frontal são desabilitados exceto o controle *Finalizar*. Em seguida, caso o *shutter* tenha sido selecionado para uso, o programa executa o bloco que envia comandos para o acionador do *shutter*, de modo a fazê-lo abrir por um período *Ton*, e então fechá-lo depois de esperar um período *Delay* para o acionamento da fonte da PMT, que inicia a aquisição de dados pela placa de contagem USB. A cada número de pontos adquiridos, dado pelo controle *Pontos*, o arquivo de dados é salvo de forma incremental, e a variável de contagem associada a *Loops* é incrementada. Ao final da aquisição do total de pontos (*Pontos vezes Loops*) esta é encerrada, a fonte do módulo PMT desligada, e o programa levado ao estado *Event* novamente;
- **Estado *End*:** estado de encerramento do programa levado pelo evento *Sair*.

3.1.3.3 Acesso ao hardware da placa de contagem

O *device driver* da placa USB de contagem de pulsos C8855, fornecido pelo seu fabricante (Hamamatsu Corp.), devidamente instalado no computador hospedeiro, torna possível ao programa de controle em LabVIEW acessar os dispositivos de *hardware* desta placa através da bi-

biblioteca de vínculo dinâmico *C8855api.dll*, responsável pela interface entre a aplicação e o *hardware*. Esta biblioteca, também fornecida pelo fabricante da placa, traz sete funções de biblioteca, cujos nomes e funções estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Funções da biblioteca *C8855api* para acesso ao *hardware* da placa USB de contagem pelo programa de controle.

Função	Descrição
<i>C8855_Open</i>	Reinicializa o <i>driver</i> , abre o recurso
<i>C8855_Close</i>	Fecha o <i>driver</i> , libera recursos
<i>C8855_Reset</i>	Reinicializa a placa de contagem
<i>C8855_CountStart</i>	Inicia processo de contagem
<i>C8855_CountStop</i>	Finaliza processo de contagem
<i>C8855_Setup</i>	Configura os parâmetros de contagem
<i>C8855_ReadData</i>	Leitura do valor de contagem

3.2 SISTEMA ELETRÔNICO ALTERNATIVO

Como uma alternativa de baixo custo aos componentes de hardware descritos na seção 3.1.2, relativos ao projeto eletrônico, uma placa microcontrolada foi desenvolvida de modo a substituir a placa de contagem *C8855* e o acionador do *shutter*, além de oferecer o controle de acionamento da alimentação do módulo PMT e a leitura de um sensor de temperatura LM35; tal placa pode ser vista na forma de um diagrama em blocos na Figura 3.15.

A placa alternativa foi desenvolvida tendo como base um microcontrolador da família AVR RISC de 8 bits, modelo ATmega328, funcionando com *clock* de 16 MHz, e tendo como interface de comunicação com o PC a porta USB ou porta serial padrão RS232, tal como mostrado na foto da Figura 3.16. A possibilidade de se agregar recursos futuros, por se tratar de uma solução não proprietária, é um grande diferencial deste sistema microcontrolado, sem mencionar o custo de implementação que representa uma mínima fração do custo dos componentes de *hardware* descritos na seção 3.1.2.

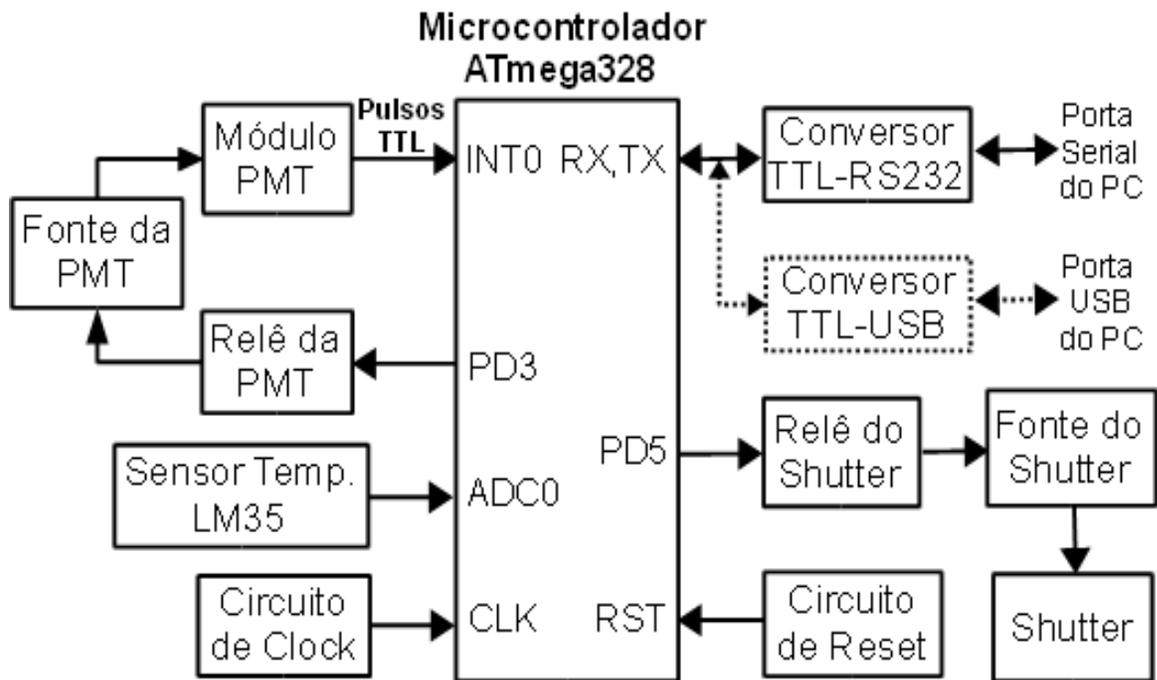


Figura 3.15 – Diagrama em blocos da solução microcontrolada para a placa de contagem e o controle de iluminação.

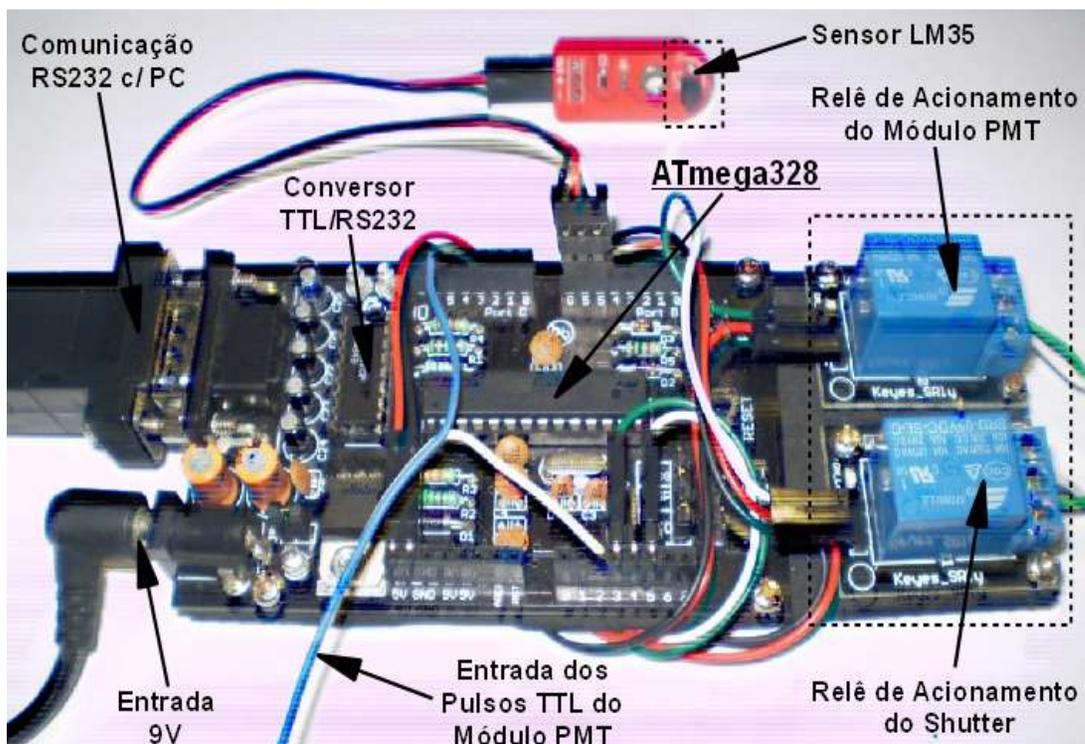


Figura 3.16 – Foto do sistema alternativo microcontrolado.

Ao ser iniciada uma aquisição de dados de contagem de fótons pelo programa de controle no PC, a cada pulso de contagem proveniente do módulo PMT corresponderá ao atendimento de uma interrupção externa do ATmega328, interrupção esta programada para ser ativada na borda de descida. Na rotina de atendimento de interrupção, uma variável de contagem é incrementada, e a totalização desta contagem fica condicionada ao término da contagem de tempo associada a um temporizador/contador programado para gerar o tempo de integralização, o qual é ajustado no programa de controle do instrumento virtual em LabVIEW. Este programa de controle recebe os dados de contagem totalizados, assim como envia dados de programação do temporizador/contador para o microcontrolador, via comunicação serial do PC conectada ao canal serial do microcontrolador ATmega328.

O custo de implementação do sistema alternativo microcontrolado integrado com base em uma placa de desenvolvimento Arduino Uno e demais módulos de relê e sensor LM35 disponíveis para esta placa é de cerca de R\$ 200,00 contra um custo de cerca de R\$ 9.000,00 da placa C8855 da Hamamatsu.

O código fonte do *firmware* deste sistema microcontrolado, com os devidos comentários, pode ser encontrado no Apêndice B.

3.2.1 Programa de controle do sistema alternativo

O instrumento virtual que implementa o programa de controle para o sistema alternativo microcontrolado, também feito em linguagem G, ou LabVIEW, tem um painel frontal como o mostrado na Figura 3.17.

A descrição completa do programa de controle do sistema alternativo, em linguagem G, na forma de seus diagramas em blocos, devidamente comentados, pode ser encontrada no Apêndice D.

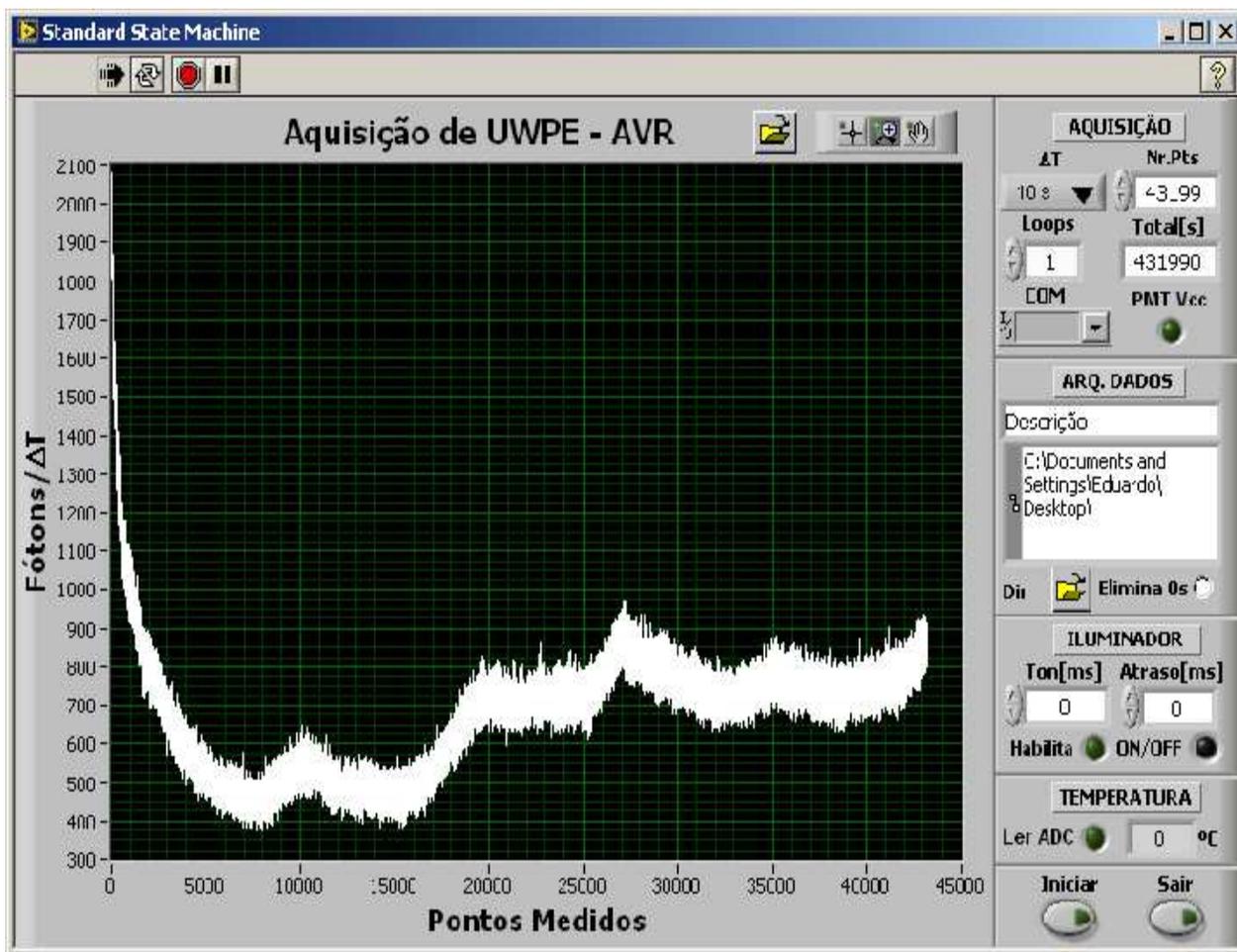


Figura 3.17 – VI do sistema microcontrolado alternativo..

3.2.1.1 Descrição da interface com o usuário do sistema alternativo

A seguir estão descritos apenas os controles e indicadores do painel frontal do VI do sistema alternativo que diferem do sistema descrito em 3.1.3:

- **Controle *DT***: seleção pelo usuário do intervalo de tempo para a totalização das contagens de fótons. As opções de seleção de intervalos de contagem são as seguintes: 10 ms, 20 ms, 50 ms, 100 ms, 200 ms, 500 ms, 1 s, 2 s, 5 s e 10 s;
- **Controle *Nr.Ptos***: possibilita a entrada, pelo usuário, do número total de pontos de contagem de fótons de um *loop* de contagem;

- **Controle *Habilita*:** possibilita habilitar o iluminador para experimentos de luminescência retardada;
- **Controle *Ler ADC*:** possibilita a apresentação do valor de temperatura medida pelo sensor LM35 associado a um dos pinos de entrada de conversor analógico/digital do ATmega328.

3.3 AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO DA CÂMARA ESCURA

O desempenho da câmara escura projetada e implementada foi levantado em termos do ruído de escuro para diversas temperaturas de operação, e ainda do levantamento de parâmetros de luminescência retardada, efetuado para diversas condições de teste, como explicado mais adiante.

Além dos testes mencionados acima, um teste comparativo de germinação com sementes de trigo e com microorganismos avaliou o ganho em termos de SNR em relação a dados obtidos a partir de um modelo de câmara implementada anteriormente, em 2005.

3.3.1 Testes de ruído de escuro em função da temperatura

O primeiro teste de desempenho realizado teve como objetivo levantar as características do ruído de escuro do sistema em função da temperatura. Como mencionado na seção 2.4.3.4, o ruído de escuro são as contagens de fótons provenientes de fatores construtivos da PMT, que não podem ser eliminados, e fatores ambientais, tais como: radiação térmica, raios cósmicos, isótopos radioativos de materiais próximos e raios gama naturais.

Os testes de ruído de escuro foram feitos para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50 °C, em duas séries diferentes, uma delas constituída de 5 medidas para cada temperatura com duração de 1,0 hora e tempo de integração de 1,0 segundo, totalizando 25 medições de 1,0 hora, e uma outra série constituída de 3 medidas para cada temperatura, com duração de 24 horas e tempo de integração de 10 segundos, totalizando 15 medições de 24 horas.

Os resultados destas duas séries de testes estão mostrados na Figura 3.18, na forma de histogramas.

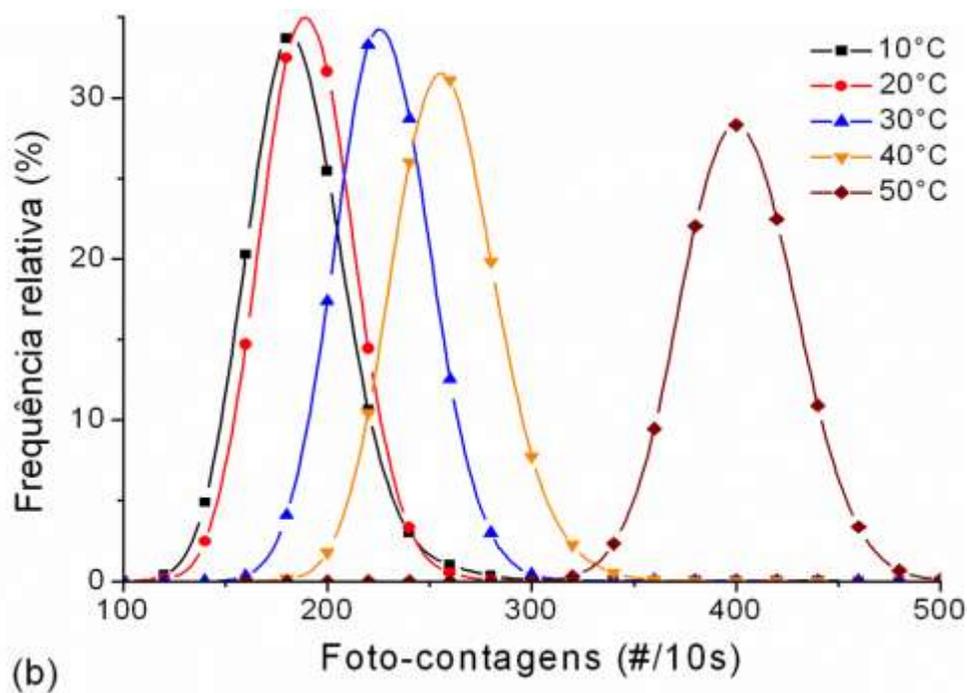
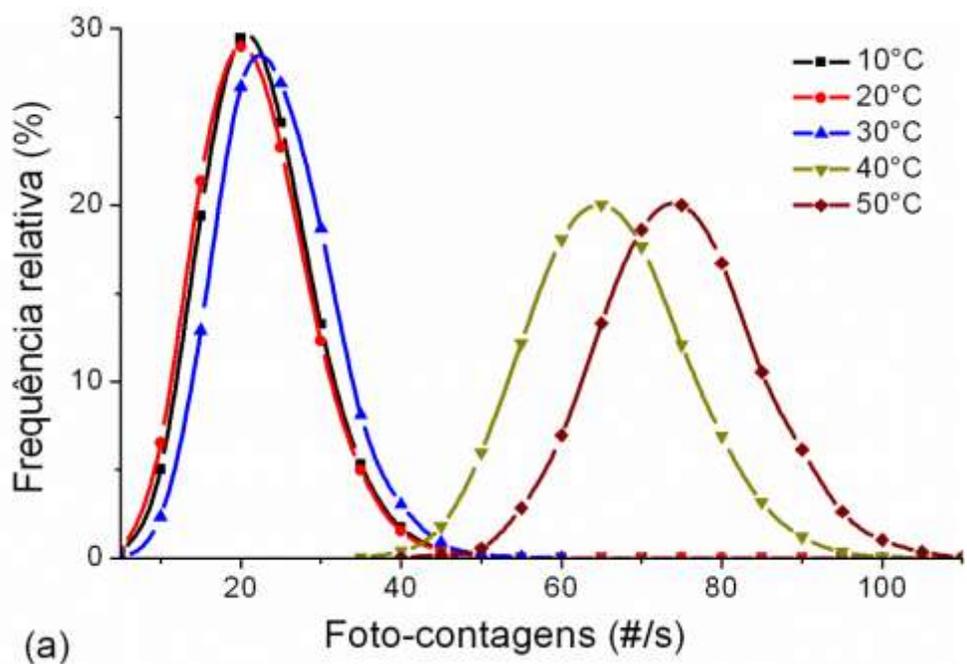


Figura 3.18 – Histogramas dos testes de desempenho do ruído de escuro da câmara escura para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50°C e para intervalos de contagem de 1,0 (a) e 10 segundos (b).

Na Tabela 3.3, a seguir, estão apresentadas as estatísticas médias para cada série de testes de desempenho do ruído, ou seja, testes de 1,0 h de duração com intervalo de contagem de 1,0 s; e testes de 24 h de duração com intervalo de contagem de 10 s.

Tabela 3.3 – Estatísticas dos testes de desempenho do ruído de escuro da câmara escura para as temperaturas de 10, 20, 30, 40 e 50°C com durações de 1 h e 24 h.

Médias das Estatísticas	Testes de 1,0 h e contagens a cada 1,0 s					Testes de 24 h e contagens a cada 10 s				
	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
Média	19,42	18,88	21,44	18,88	21,44	183,80	190,45	227,46	257,92	401,21
Desvio padrão	7,30	7,30	6,93	7,30	6,93	24,35	23,39	23,67	23,92	27,33
Valor mínimo	2,4	1,4	3	1,4	3	110	105	147,67	179,67	303,67
Valor máximo	146,8	123,2	53,2	123,2	53,2	554,33	581,33	591	377,33	569,67

3.3.2 Testes de luminescência retardada

Outro teste realizado para se verificar o desempenho da câmara foi o levantamento das características das emissões de luminescência retardada para diversas condições de teste.

As condições de teste de luminescência retardada escolhidas são aquelas que se apresentam em alguns dos testes rotineiramente realizados com amostras biológicas, ou seja:

- Câmara vazia, avaliando-se a luminescência retardada produzida apenas pelo material utilizado na confecção da câmara;
- Presença de uma placa de Petri de 10 ou 6 cm de diâmetro no seu interior, com e sem adição de água destilada, como usado em testes de germinação de sementes;
- Presença de uma placa de Petri de 10 ou 6 cm de diâmetro no seu interior, com e sem adição de uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), como usado em testes de germinação de sementes sob estresse químico.

Além disto, os testes foram feitos para 4 condições de iluminação diferentes, usando-se potência de iluminação máxima (175,6 lx), e mínima (54,0 lx), e tempos de excitação de 2 e 10 segundos, proveniente de uma fonte de luz halógena, como descrito na seção 3.1.2.3.

A Figura 3.19, em (a) e (b), mostram o resultado do teste de luminescência retardada para duas condições de potência de iluminação: máxima e mínima, respectivamente.

A Figura 3.20 (a) apresenta os picos de contagem em número de contagens/50ms, calculado como a média aritmética de 5 medições sucessivas. Por fim, na Figura 3.20 (b) são apresentados os valores das contagens finais após 90 segundos do início dos testes.

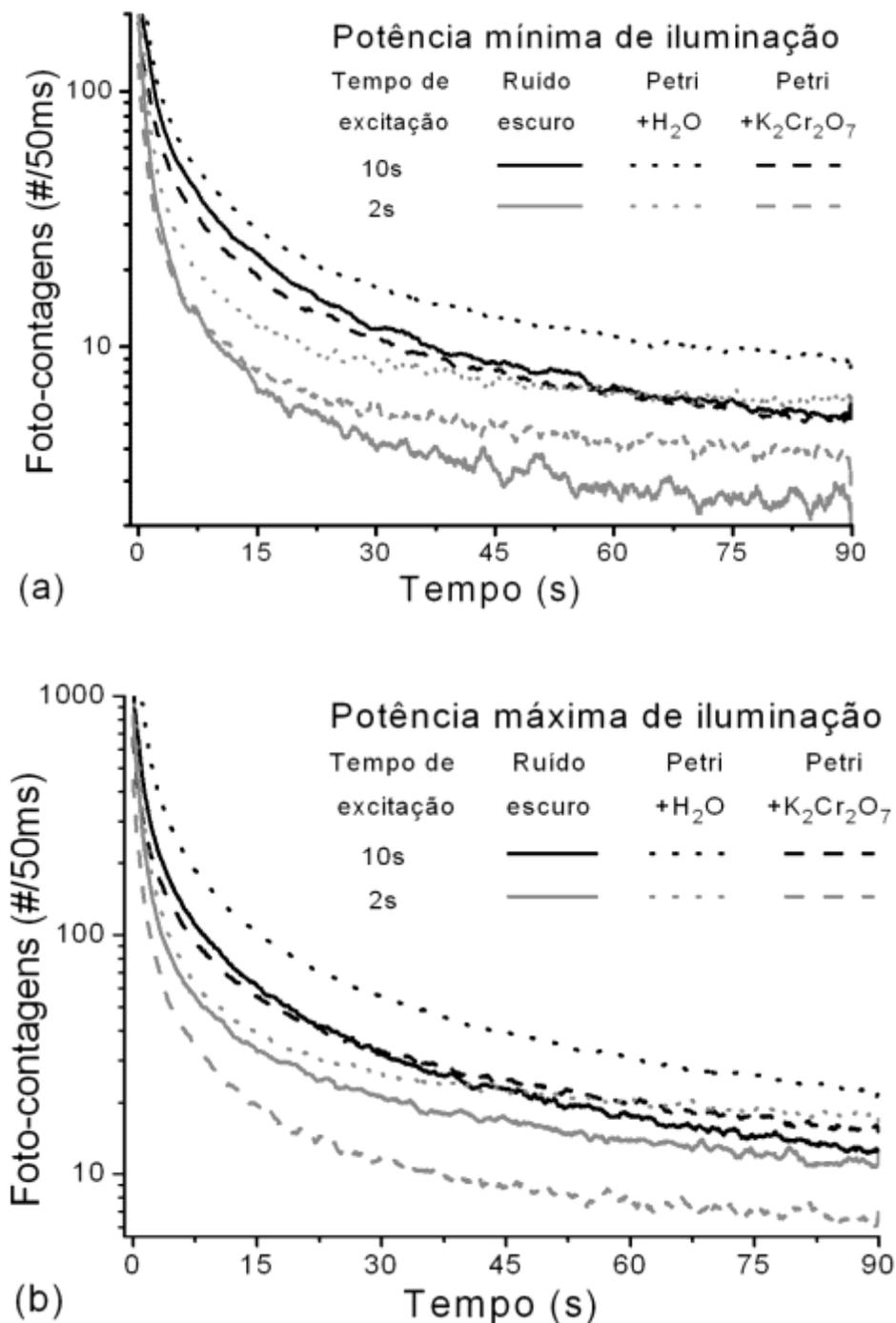


Figura 3.19 – Luminescência retardada da câmara medida para diversas condições de teste. Em (a) para iluminação com 54 lx, e em (b) com 175,6 lx.

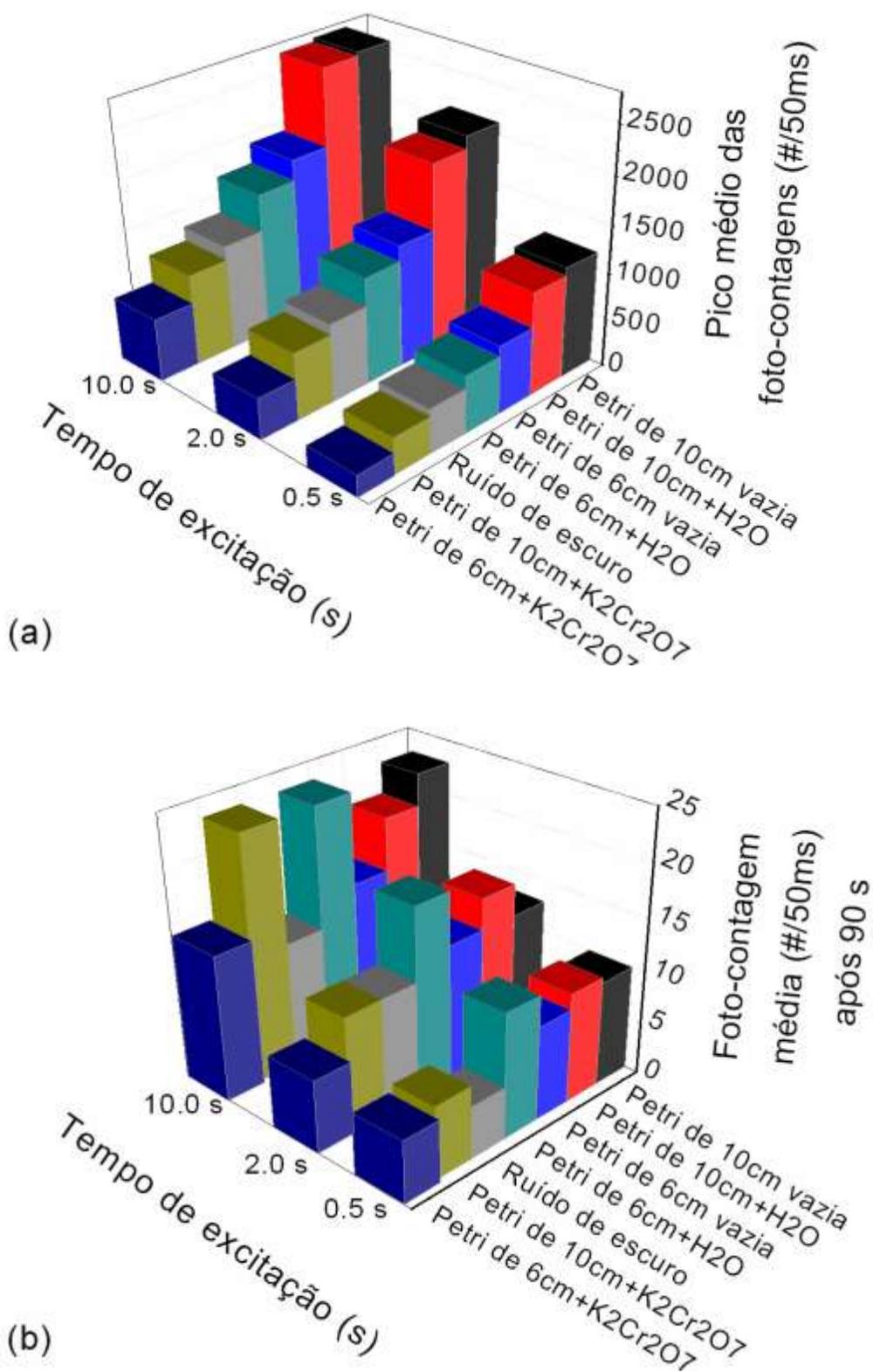


Figura 3.20 – Picos iniciais e contagens finais após 90 s das DLs da Figura 3.19 para as diversas condições de teste (a). Em (b) valores finais das contagens após 90 segundos do início dos testes.

O conhecimento prévio destas características de luminescência retardada, apresentadas nas Figuras 3.19 e 3.20, e levantadas para estas diversas condições de testes, nos possibilita uma avaliação mais apurada dos resultados dos testes com amostras biológicas em placas de Petri contendo somente água, ou uma solução estressante. Pode-se, através destas características, saber como uma determinada substância presente ou adicionada ao teste se comportará do ponto de vista da absorção e re-emissão de luz.

3.3.3 Testes comparativos de germinação

Com o objetivo de validar a câmara escura desenvolvida, comparou-se as medidas da intensidade do sinal de UWPE realizadas com outra câmara escura projetada e construída em 2005 pelo grupo do LaFA/UNICAMP/Limeira. Nos testes comparativos foram utilizadas duas amostras de 50 sementes de trigo em fase de germinação. As amostras foram colocadas em duas placas de Petri, as quais foram forradas com 5 filtros de papel embebidas em 3 ml de água destilada. As placas de Petri com as amostras permaneceram por 72 horas dentro da câmara de medição. Em ambas as câmaras a temperatura das amostras foi mantida em 20 °C.

Ambos os experimentos foram conduzidos sob temperatura controlada em 20 °C nas dependências do LaFA/Unicamp/Limeira.

Os resultados destes testes comparativos são mostrados na Figura 3.21. Observa-se um ganho de cerca de 60% do sinal do sistema implementado em relação ao sistema implementado em 2005 [65], isso se tomamos como referência os vales nos sinais de contagem por volta da 24^a h, os quais ocorrem em ambos os sinais de contagens.

Além dos testes comparativos com 50 sementes de trigo, outro resultado com 25 sementes ao invés de 50 também está apresentado nesta Figura 3.21.

A principal razão do ganho adicional de sensibilidade se deve ao tamanho menor da câmara escura implementada, reduzindo o ruído de escuro por apresentar superfícies de emissão menores, se comparada àquela de 2005 – sistema LaFA, além da distância menor entre a área sensível da PMT e a placa de Petri, de cerca de 5 vezes menor.

Observar que o período inicial de 12 horas é marcado a presença de um decaimento no padrão de emissão, é devido a luminescência retardada, uma vez que alguma iluminação, mesmo

que de baixa intensidade, é necessária para o manuseio da amostra ao colocá-la na câmara de medição.

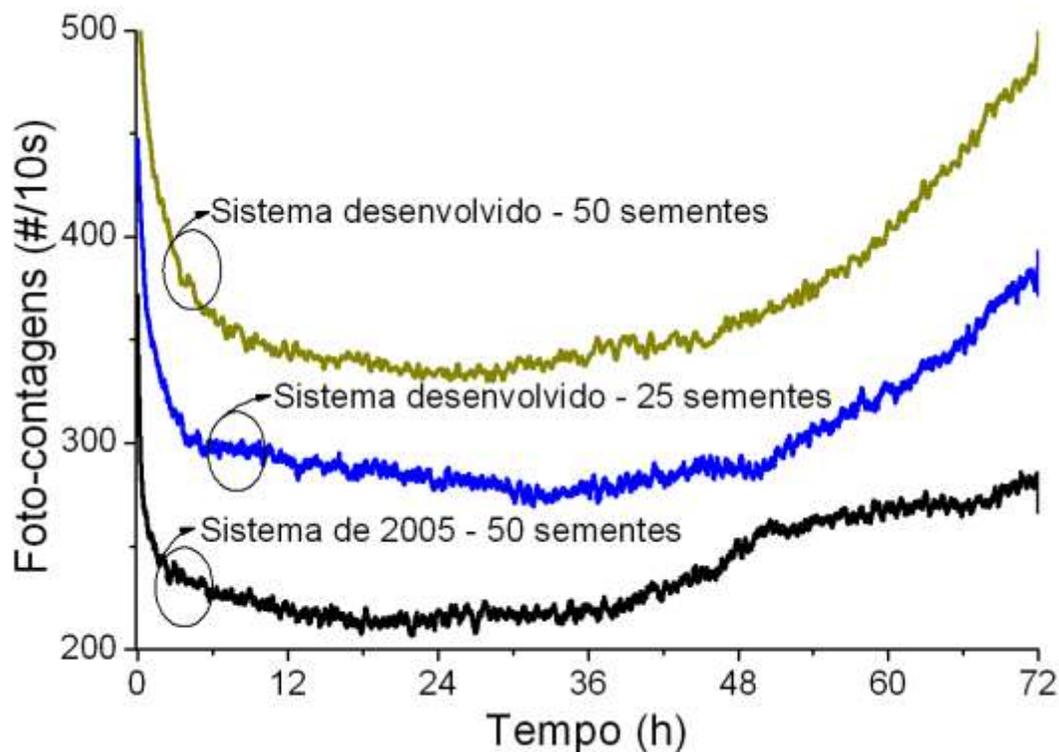


Figura 3.21 – Teste comparativo de germinação.

3.3.4 Testes de germinação simultâneos

Os resultados de dois testes de germinação simultâneos de 24 horas, com sementes de trigo em duas câmaras de medição de UWPE similares (PMT01 e PMT02), implementadas como descrito neste capítulo, estão mostrados na Figura 3.22.

As medições mostradas na Figura 3.22 se iniciaram após as sementes permanecerem dentro de uma câmara de germinação por 24 horas em placas de Petri com filtros de papel embebidos em 2 ml de água destilada como substrato e sob temperatura controlada em 20 °C. Ao serem transferidas da câmara de germinação para as câmaras de medições de UWPE, evitou-se que fossem expostas à luz.

Observa-se, na Figura 3.22, que ambas as amostras no interior das duas câmaras tem padrões de emissão que se seguem mutuamente, o que pode ser justificado por estarem em condições ambientais similares. Os gráficos das medições de UWPE para a PMT02 apresentam valores de contagens superiores ao da PMT01 em razão do módulo PMT que equipa a câmara PMT02 (H7360-02) ter um ganho maior que o módulo PMT da câmara PMT01 (H7360-01), embora esta última apresente um menor ruído de escuro, como também está mostrado nos traçados inferiores desta figura.

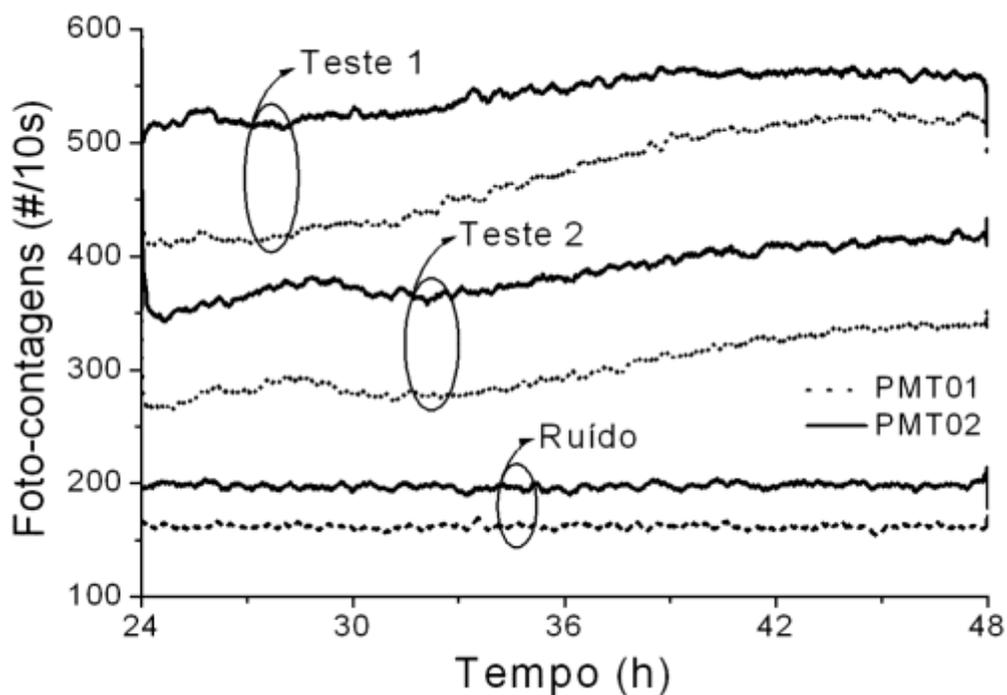


Figura 3.22 – Testes simultâneos de germinação em duas câmaras de medição de UWPE idênticas.

3.3.5 Testes comparativos com microorganismos

Na Figura 3.23 são apresentados os resultados obtidos na contagem da UWPE em amostras de coliformes e *Escherichia coli*, ambas em fase de crescimento no interior da câmara escura. As contagens foram realizadas com o sistema LaFA e com o sistema desenvolvido, de modo a se poder comparar o desempenho das medições obtidas. Como eram esperados, os resultados destes experimentos também evidenciaram uma melhora considerável na SNR.

Uma série constituída de 4 testes foi preparada, em 3 destes testes usou-se *Escherichia coli*, e em um deles e esgoto doméstico. Os testes foram feitos de acordo com o método padrão para exame de água e águas residuais da Associação Americana de Saúde Pública [66]. Os resultados foram analisados e comparados a resultados similares de testes feitos usando a câmara de medição de 2005.

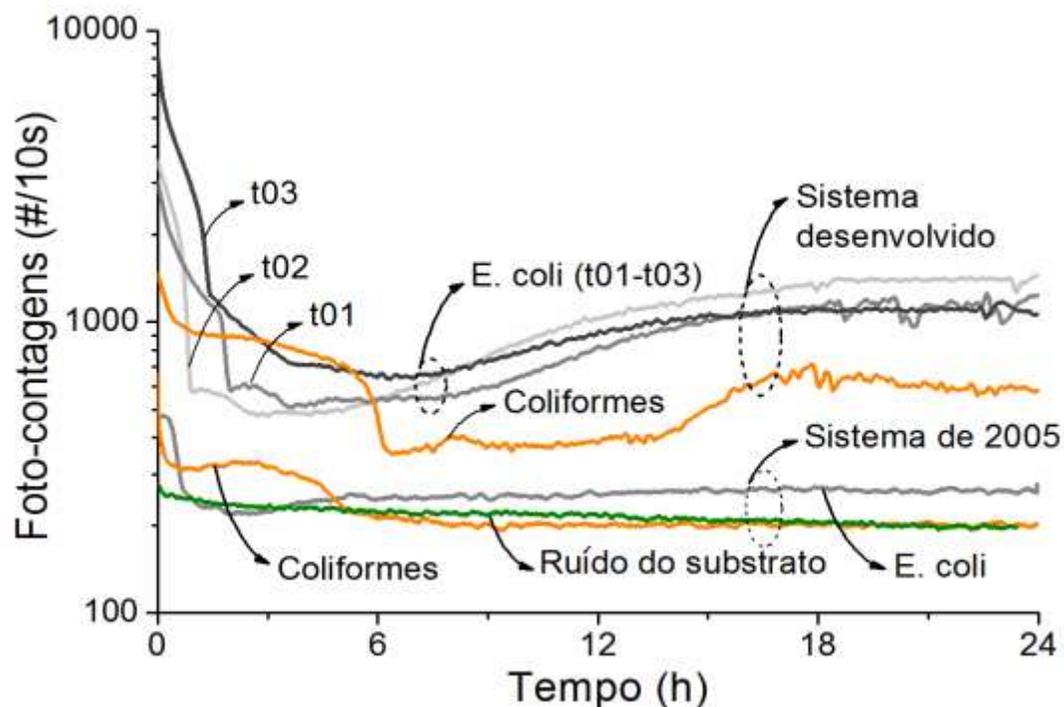


Figura 3.23 – UWPEs de *E. coli* e coliformes crescendo dentro da câmara escura por 24 horas.

As amostras de *E. coli* foram fornecidas pela Fundação Tropical (Campinas/SP) na forma de cepas padronizadas (ATCC 25.922) e as amostras de efluente sanitário foram obtidas na estação de tratamento de esgoto localizada no Campo Experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade de Campinas, tendo sido todas elas preservadas a 0 °C até o momento do início da incubação. As cepas de bactérias cresceram em temperatura controlada de 37 °C por um período de 24 horas em meio EC com MUG (4-methylumbiferil-β-glicuronídeo), o qual é usado para detecção fluorogênica de bactérias do grupo coliforme e *Escherichia coli* tendo seu pH ajustado para 7,0 e contendo Triptona (20,0 g/l), Lactose (5,0 g/l), Sal Biliar (1,5 g/l), Di-potássio fosfato (4,0 g/l), Mono-potássio fosfato (1,5 g/l), Cloreto de Sódio (5,0 g/l) e 4-metilumbeliferil-

β -D-glicuronídeo (0,05 g/l). Para a diluição a cepa foi colocada dentro de peptona bacteriológica contendo: nitrogênio total (14%), amino nitrogênio (2,6%) e cloreto de sódio (1,6%). Após se proceder a esterilização da câmara escura, com álcool 70%, a amostra sob estudo foi colocada no interior desta, onde esta permaneceu por 24 horas sob temperatura controlada em $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo as contagens de fótons feitas com um intervalo de integração de 10 segundos.

4 ENSAIOS BIOFOTÔNICOS APLICADOS EM CONTROLE AMBIENTAL

4.1 MOTIVAÇÃO

A atividade humana é responsável pela geração de uma quantidade enorme de resíduos todos os dias, em especial nas grandes metrópoles. Associado a isto, existe o problema da preservação dos recursos hídricos contra contaminação por estes mesmos resíduos. São dois sérios problemas que requerem ações urgentes das autoridades sanitárias, especialmente em localidades que ainda não dispõem de uma destinação apropriada e ambientalmente correta para estes resíduos [67].

Um destino possível para tais resíduos está na utilização destes como fertilizantes na agricultura. Entretanto, a eficácia de tal procedimento deve ser cuidadosamente estudada de modo a se ter confiança sobre possíveis efeitos tóxicos pela presença de ameaças químicas. Se estes sedimentos pudessem ser usados eficazmente como fonte de fertilizantes na agricultura resolveria dois problemas fundamentais: destinação adequada dos resíduos de tratamento de esgoto e aumento na produção de alimentos.

Diante deste quadro, torna-se desejável que se tenha uma ferramenta de análise rápida do processamento de esgoto e tratamento de água, de modo a possibilitar rápidas decisões no gerenciamento das políticas públicas nestas áreas. Neste sentido, o uso da abordagem da biofotônica parece ser bastante apropriado, como será demonstrado neste capítulo.

4.2 UWPE E DL DE SEMENTES COMO INDICADOR BIOLÓGICO

Na seção 2.2.3 mostrou-se, através do trabalho de Zeiger, que se pode avaliar a vitalidade de amostras de semente através da análise de sua UWPE. Na seção 2.2.1 mostrou-se como as UWPEs de sementes de grama diferem quando estas são submetidas a estresse físico por esmagamento, resfriamento e aquecimento. E na seção 2.2.2 foram explorados resultados da avaliação de DLs de algas submetidas à estresse químico. Em todos estes, e outros tantos trabalhos, fica evidente que as medições de biofótons de amostras biológicas sofrem alterações nos padrões des-

tas emissões quando em situação de estresse físico ou químico, sendo possível aplicá-las como indicador biológico para tais condições.

Nesta seção serão apresentados os resultados das medições das UWPEs e de DLs de sementes de trigo em germinação, quando submetidas à ação de estresse químico.

4.3 UWPE DE SEMENTES SOB ESTRESSE QUÍMICO

Através do uso do sistema de medição de UWPE desenvolvido, e tendo como amostras biológicas sementes de trigo em germinação, experimentos foram executados para se avaliar a aplicabilidade da análise dos distúrbios nos padrões destas emissões quando as amostras são submetidas a estresse químico. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Fotônica Aplicada - LaFA, da Faculdade de Tecnologia - FT da Unicamp, localizada em Limeira/SP. Outras dependências da FT/Unicamp, como o Laboratório Físico-Químico e de Microbiologia, foram também utilizados para atender necessidades específicas, como no caso da preparação de amostras químicas e microbiológicas.

As soluções estressantes preparadas para os experimentos foram: Fluoreto de Sódio (NaF) e Mercúrio (Hg), em concentrações correspondentes às concentrações efetivas EC_{50} e EC_{100} , encontradas através de testes de sensibilidade como descrito a seguir.

4.3.1 Testes de sensibilidade

Os testes de sensibilidade feitos com sementes de trigo em germinação de modo a se identificar as concentrações efetivas EC_{50} e EC_{100} das soluções químicas de fluoreto de sódio (NaF) e mercúrio (Hg). As concentrações EC_{50} e EC_{100} são aquelas que levam à germinação de 50 e 0% das sementes, respectivamente, e para determiná-las, foram feitos testes de sensibilidade, seguindo as normas para testes de químicos - *Guidelines for testing chemicals* [68] da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organisation for Economic Co-operation and Development* - OECD).

Os testes de sensibilidade foram executados na forma de varreduras com soluções preparadas em 5 concentrações em progressão na base 2, aplicadas em duplicata a 10 amostras de se-

mente de trigo com 25 sementes cada, arranjadas em 6 placas de Petri com 5 filtros de papel embebidos em 3 mL de água destilada, manipuladas em ambiente higienizado, e mantidas em germinação dentro de uma câmara de germinação do tipo BOD⁹, por 5 dias. Ao final deste período a taxa de germinação foi levantada, e caso as concentrações efetivas EC₅₀ e EC₁₀₀ não fossem encontradas, uma nova varredura era feita com concentrações maiores ou menores, dependendo do resultado dos testes anteriores.

Os resultados encontrados para as concentrações efetivas EC₅₀ e EC₁₀₀ para as soluções de fluoreto de sódio (NaF) e mercúrio (Hg) estão mostrados na Tabela 4.1 a seguir.

Tabela 4.1 – Concentrações efetivas EC₅₀ e EC₁₀₀ para as soluções de NaF e Hg encontradas nos testes de sensibilidade.

Substância/Concentração	EC ₅₀	EC ₁₀₀
Fluoreto de Sódio (NaF)	50 mM	100 mM
Mercúrio (Hg)	0,8 mM	1,0 mM

4.3.2 Procedimento experimental

A seguir um roteiro dos procedimentos experimentais dos testes de germinação com estresse químico é apresentado.

- **Preparação das soluções** - Soluções estressantes foram preparadas a partir de soluções padrões, tendo como base testes de sensibilidade previamente feitos para se descobrir as concentrações efetivas EC₁₀₀ e EC₅₀, ou seja, aquelas que provocam taxas de germinação de 0% e 50%. Posteriormente, o pH destas soluções foram corrigidos para próximo de 7, por ser o pH neutro, correspondendo ao pH da água destilada.
- **Germinação das sementes** - Sementes de trigo (*Triticum aestivum*) de um lote bem caracterizado quanto à idade e origem, foram selecionadas e agrupadas em 6 amostras com 25 sementes cada, tendo sido a massa de cada amostra medida em balança de precisão. A manipulação destas amostras se deu em ambiente higienizado, e fazendo-se uso de luvas

⁹ Sigla no idioma Inglês para *Biochemical Oxygen Demand* ou Demanda Bioquímica de Oxigênio.

de látex para evitar contaminação por microorganismos. As amostras foram então, cuidadosamente arranjadas no interior de 6 placas de Petri de 6 cm, sobre 5 filtros de papel previamente esterilizados em autoclave, e embebidos em 3 ml de água destilada. Após a montagem destas 6 placas, elas foram rotuladas para identificação posterior e levadas a uma câmara de germinação do tipo BOD para germinar no escuro, sob controle de umidade e temperatura constante de 20 °C por um período inicial de 72 horas. Após este período, 2 das 6 placas de Petri foram retiradas da câmara BOD, em condição de pouca iluminação, uma delas recebendo 2 ml de água, aquela rotulada como “Controle 1”, e a outra 2 ml de solução estressante, rotulada “Estresse 1”, e então levadas ao interior das câmaras de medição de UWPE. Das 4 placas que permaneceram na câmara de germinação, 2 delas receberam 2 ml de solução estressante, rotuladas como “Estresse 2 e 3”, e duas receberam 2 ml de água destilada, rotuladas como “Controle 2 e 3”, germinando por mais 24 horas.

- **Medições da UWPE** - Dois sistemas de medição idênticos (PMT01 e PMT02), exceto pela diferença de ganho, como explicado na seção 3.3.4, e implementados segundo as descrições feitas no Capítulo 3, usando a placa de contagem USB C8855, foram usados de forma simultânea para a medição das UWPEs da placa contendo a amostra de controle e da placa contendo a amostra sob estresse. Após se proceder à esterilização das duas câmaras com álcool 70%, as duas placas de Petri retiradas da câmara de germinação, em condição de pouca iluminação, foram colocadas no interior das câmaras PMT01 e PMT02, após uma delas, rotulada como “Controle 1” receber outros 2 ml de água destilada, e a outra rotulada como “Estresse 1” receber mais 2 mL de solução estressante, respectivamente. Depois de serem fechadas e os parâmetros de aquisição ajustados no programa de controle em LabVIEW para uma duração do teste de 24 horas e contagens integralizadas a cada 10 segundos, inicia-se as contagens de UWPE nas duas câmaras simultaneamente. Além disso, a sala onde as câmaras foram instaladas sendo climatizada, a temperatura dos ensaios permaneceu constante em cerca de 20 °C.
- **Varição do teste** - Em uma variação do procedimento acima, as medições nas 2 câmaras têm início no 1º dia de germinação, simultaneamente à germinação das 4 outras amostras dentro da câmara de germinação, e por um período de inicial de 72 h. No início do 4º dia, as câmaras são abertas em condição de pouca iluminação, o agente estressante aplicado na amostra da PMT02 e água destilada aplicada na amostra da PMT01, e então fechadas para

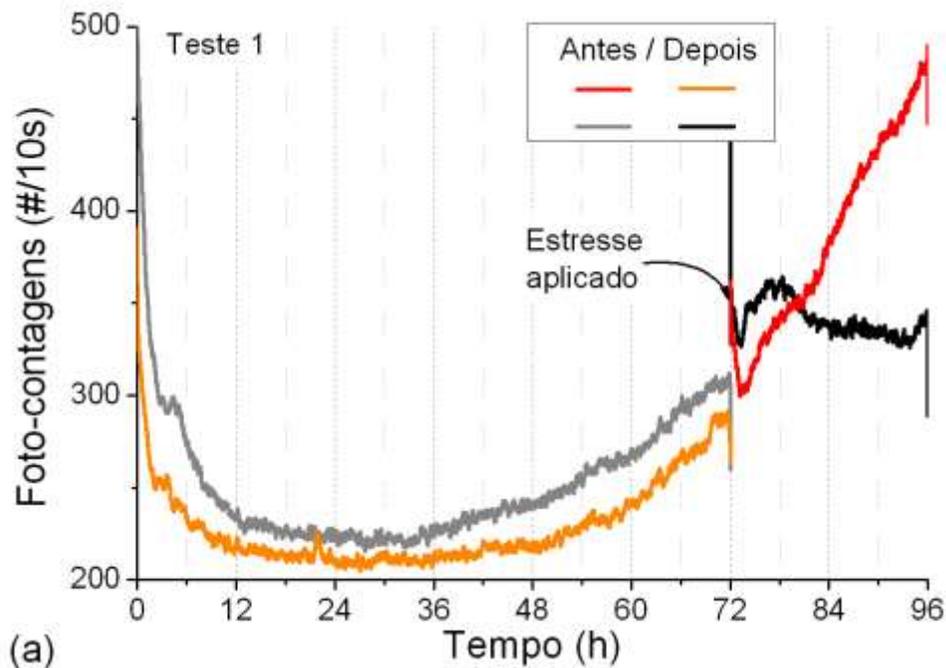
que a aquisição continue por mais 24 h. O mesmo ocorrendo com as placas na câmara de germinação, ou seja, 2 delas recebem 2 ml de solução estressante e duas recebem 2 ml de água destilada, germinando por mais 24 horas.

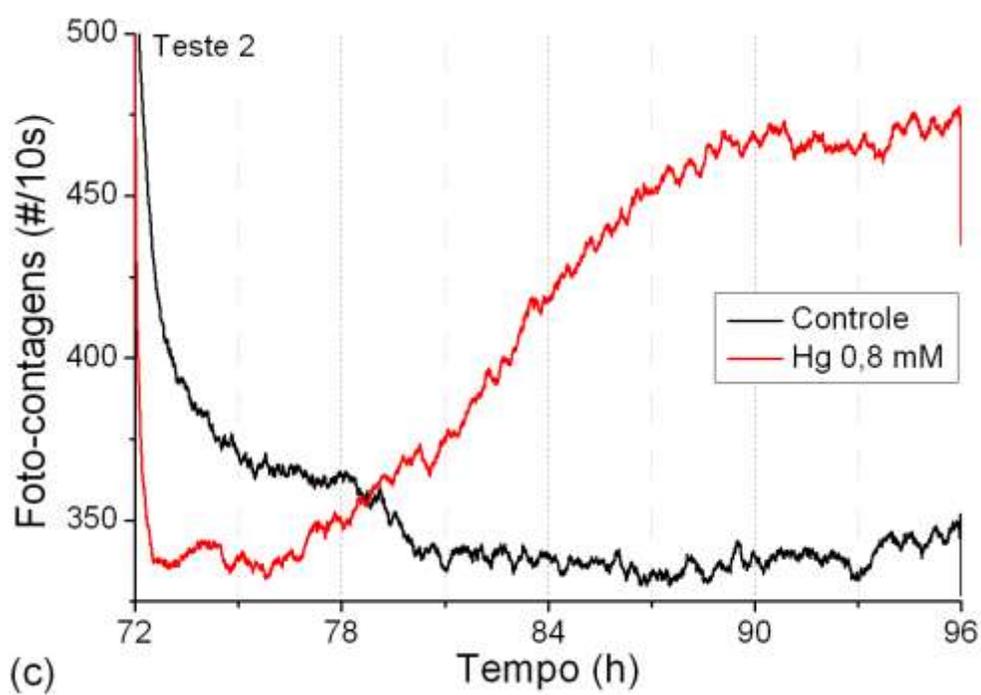
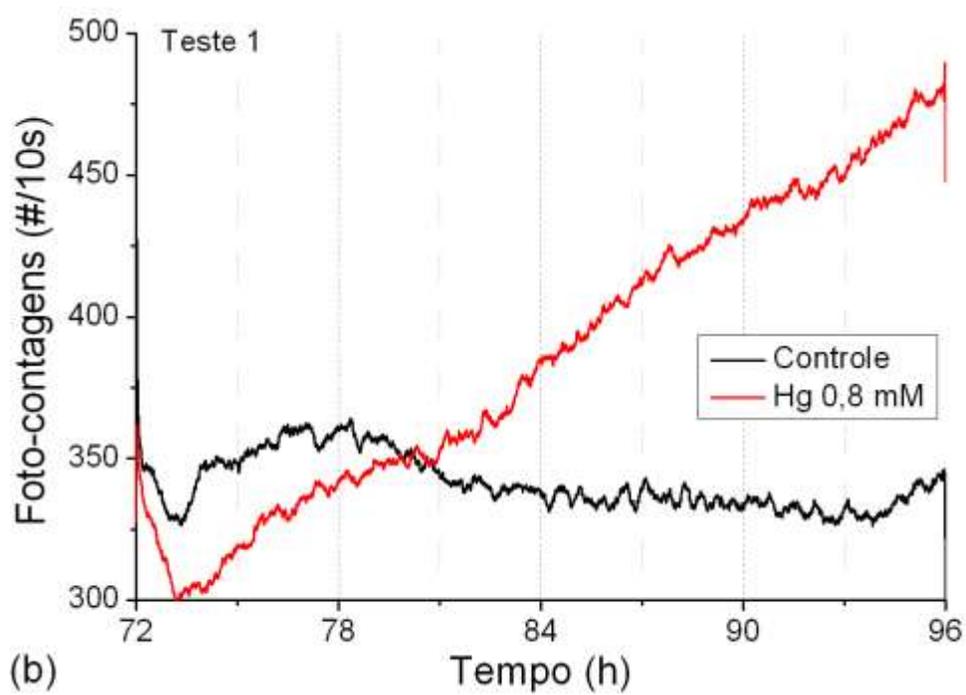
- **Medição dos resultados das germinações** - Após o término do período de 96 horas dos testes, as 6 amostras de 25 sementes que estiveram germinando, adquiriram biomassa, estas foram então novamente pesadas, e os comprimentos das raízes medidos.
- **Processamento dos dados** - Os dados das medições das biomassas e de foto-contagem (UWPE) foram processados através do programa de tratamento de dados *OriginPro* versão 8, da empresa *OriginLab Corp.* Todos os gráficos da evolução temporal das UWPEs foram alisados através da média local dos 100 valores de foto-contagem adjacentes, mascarando assim as variações aleatórias do ruído de escuro que são agregados aos sinais de biofótons.
- **Diferenças nos ganhos das PMTs** - Embora as duas câmaras PMT01 e PMT02 sejam idênticas, e equipadas com módulos PMTs do mesmo modelo (H7360), a eficiência de detecção do módulo da câmara PMT02 (H7360-02) sendo maior que o da PMT01 (H7360-01), leva os valores de contagem da PMT02 serem sempre maiores que o da PMT01, para as mesmas condições de teste, embora este último apresente menor ruído de escuro. Tal fato foi corrigido no tratamento dos dados pelo programa *OriginPro* aplicando-se um fator de correção aos dados oriundos da PMT02. Este fator de correção foi obtido calculando-se a média dos dados gerados pela razão entre os valores de foto-contagens obtidas das medições do ruído de escuro das PMT02 e PMT01. Esta razão entre os dados de fotocontagem de ruído foi calculada ponto a ponto, e o valor médio desta razão resultou em 1,20.
- **Sequência de testes** – Ao término de cada teste de uma série, o teste seguinte é colocado para medição na câmara de medição de UWPE. Para que esse seqüenciamento fosse possível, houve a necessidade de um planejamento de montagem das placas de Petri com as amostras de modo que os inícios de germinação destas amostras.

4.3.3 Resultados dos testes de germinação sob estresse por Hg

4.3.3.1 UWPE dos testes com Hg 0,8 mM (EC_{50})

Nesta série de 3 testes, o estresse químico por Hg em concentração de 0,8 mM, correspondente à EC_{50} , foi aplicado no 4º dia de germinação, quando tiveram início as medições de UWPE com duração de 24 h e período de integralização das contagens em 10 s, exceto para o teste 1, onde a medição de UWPE se iniciou a partir do 1º dia de germinação, como mostrado na Figura 4.1. Observar a presença do decaimento inicial da UWPE, decaimento este devido à luminescência retardada (DL), como discutido na seção 3.3.3. Observar ainda, que esta DL estará sempre presente em todos os testes de germinação feitos, tanto para as soluções estressantes de Hg como de NaF.





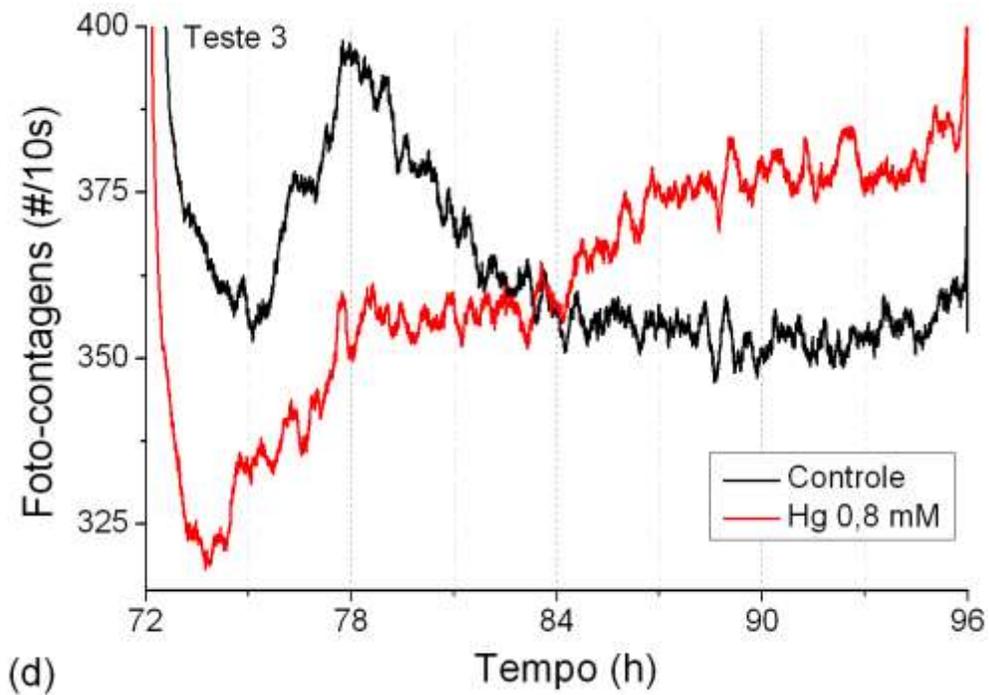
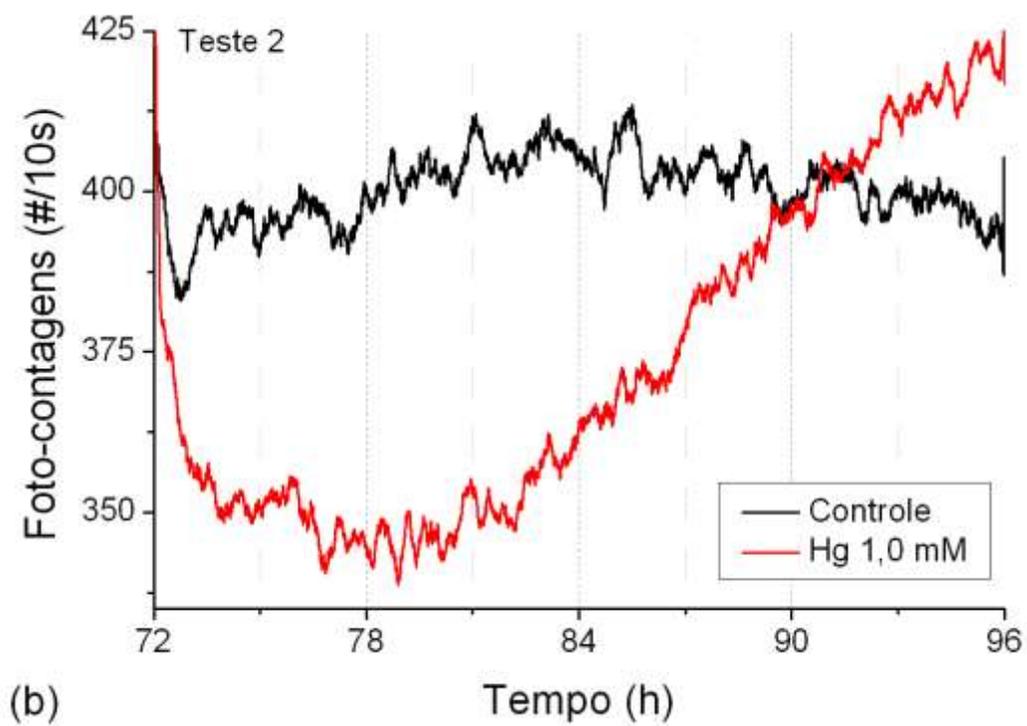
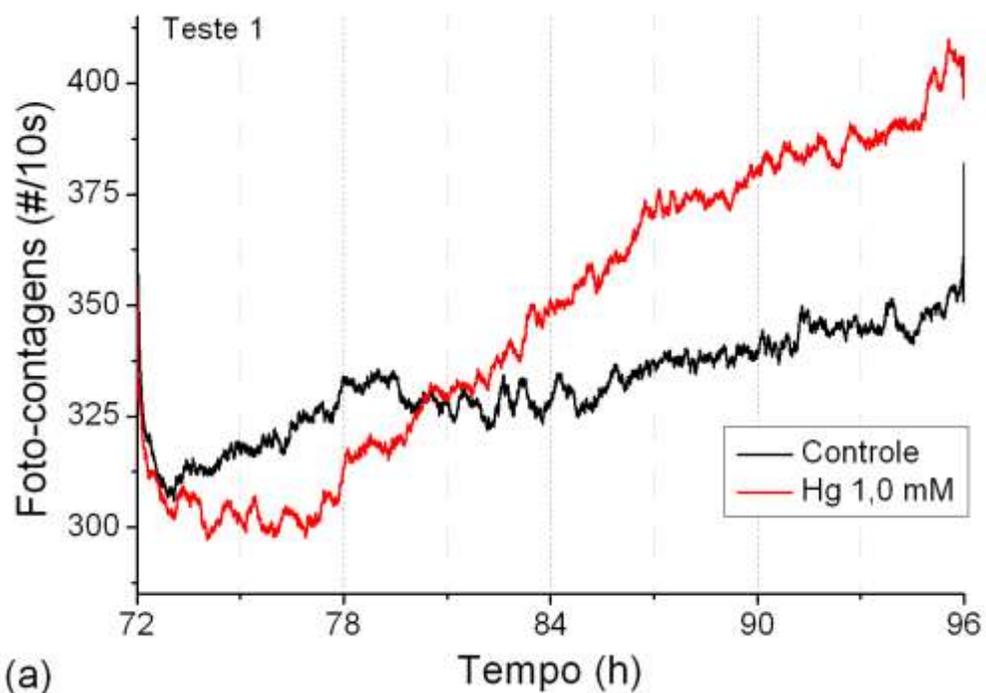


Figura 4.1 – Testes de germinação com estresse por Hg 0,8 mM, correspondendo à EC_{50} . Em (a) teste 1 com medição a partir do 1º dia de germinação - 96 h, onde em (b) está mostrado apenas as 24 h finais deste teste. Em (c) e (d), testes 2 e 3 onde a UWPE foi medida somente as 24 h finais do período de 96 h de germinação.

4.3.3.2 UWPE dos testes com Hg 1,0 mM (EC_{100})

Nesta série de 3 testes, o estresse químico por Hg em concentração de 1,0 mM, correspondente à EC_{100} , foi aplicado no 4º dia de germinação, as medições de UWPE efetuadas com duração de 24 h e período de integralização das contagens em 10 s, como na Figura 4.2.



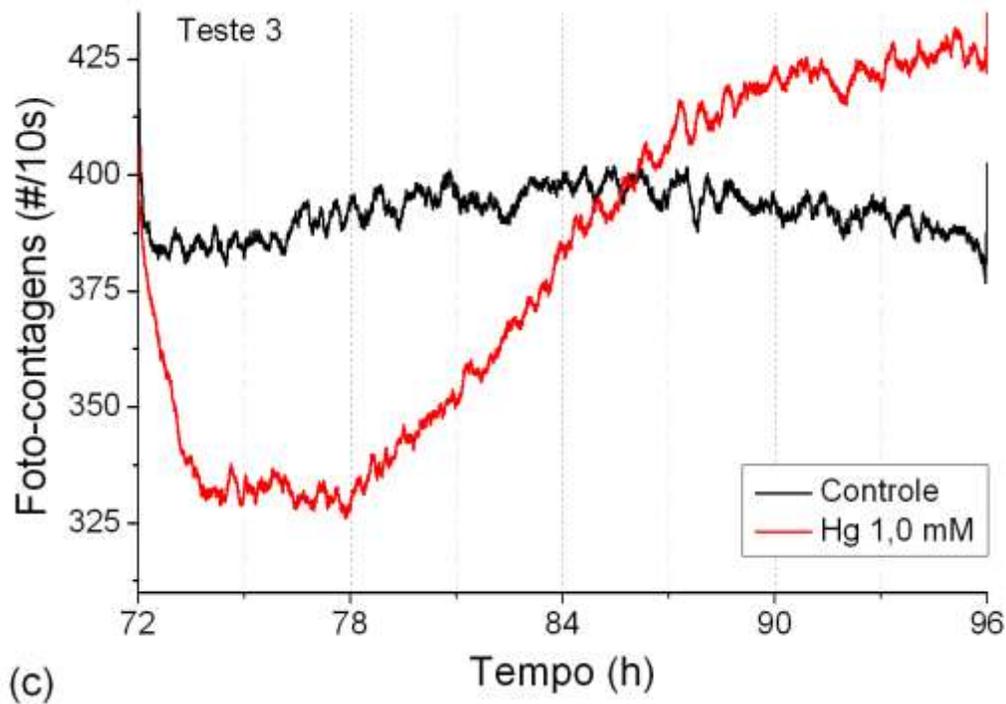
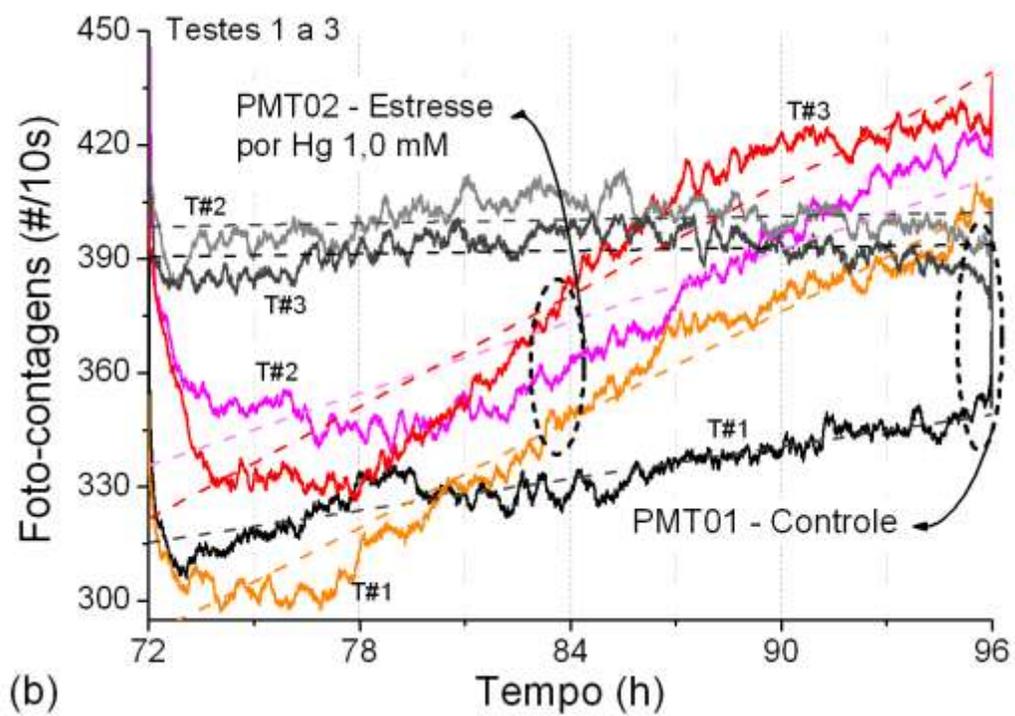
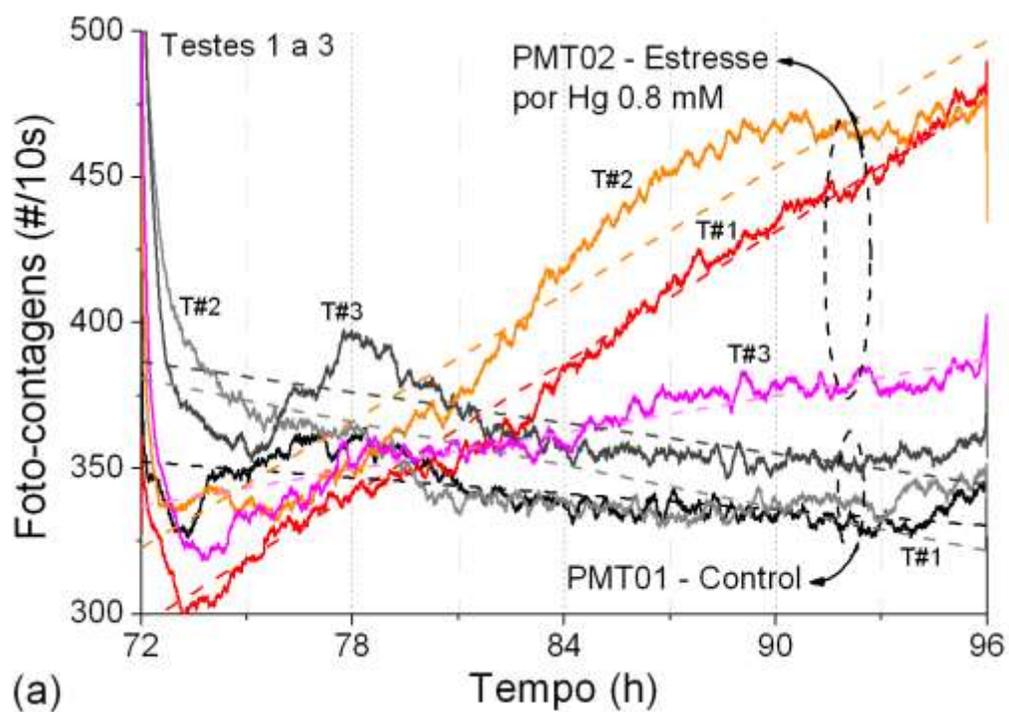


Figura 4.2 – Testes de germinação com estresse por Hg 1,0 mM, correspondendo à EC_{100} . Somente foi medida a UWPE das 24 h finais das 96 h de germinação.

4.3.3.3 Tratamento dos dados de UWPE dos testes com Hg

O processamento dos dados de foto-contagem das duas séries de 3 testes, tendo como agente estressante Hg em concentração de 0,8 mM e 1,0 mM, correspondente à EC_{50} e EC_{100} , feito através da aproximação linear dos perfis de emissão das UWPE, está mostrado na Figura 4.3 (a) e (b). Na figura 4.3 (c) os coeficientes angulares das aproximações lineares dos perfis de emissão das UWPE das amostras de controle e estressadas por soluções de Hg nas concentrações EC_{50} e EC_{100} , quando correlacionadas aos ganhos percentuais de biomassa e soma total dos alongamentos das raízes, se mostram agrupadas, mostrando claramente os efeitos depressivos do agente estressante sobre a emergência das radículas.



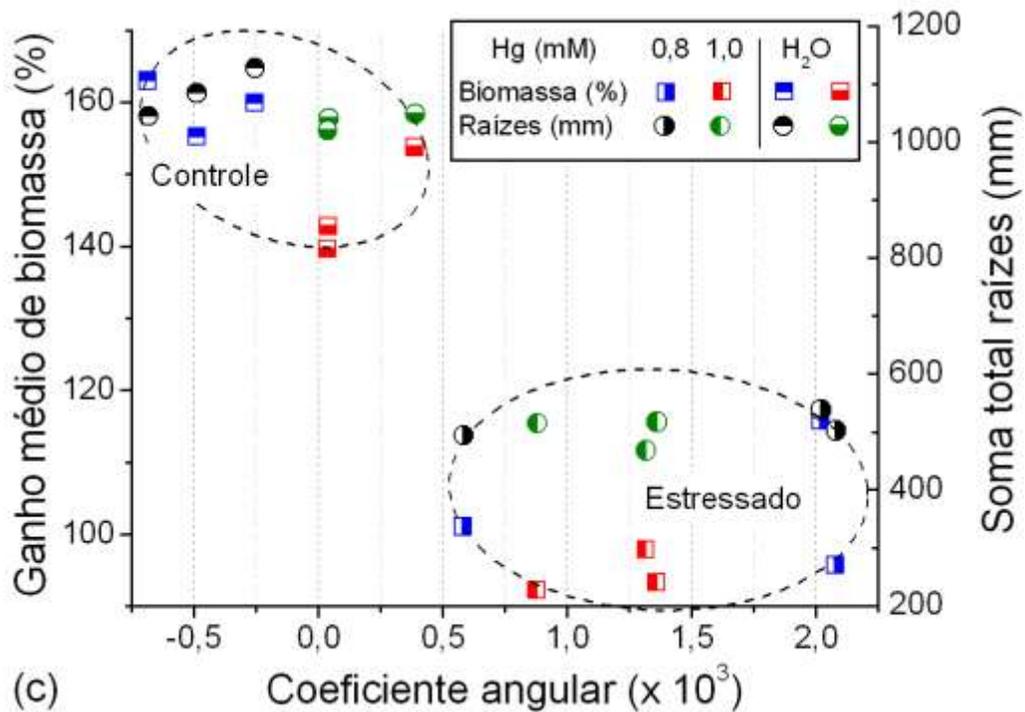


Figura 4.3 – Aproximações lineares dos perfis de emissão de UWPE dos testes de germinação com estresse por Hg EC₅₀ (a) e EC₁₀₀ (b). Em (c) correlação entre os coeficientes angulares destas aproximações com os ganhos de biomassa e soma total dos alongamentos das raízes.

4.3.3.4 Foto das placas controle e estresse para Hg a 1,0 mM

Na Figura 4.4, fotos das placas com as amostras de sementes de trigo em germinação após 96 h, à esquerda, a placa com a amostra de controle, e à direita, a amostra que sofreu a ação da solução de Hg a 1,0 mM.



Figura 4.4 – Fotos mostrando as placas de Petri com as amostras controle (esquerda) e sob estresse por Hg a 1,0 mM (direita).

4.3.3.5 Discussão dos testes de estresse por Hg

O teste 1 da série usando a solução de Hg - EC_{50} , sendo um teste de 1º dia, mostra em seu período inicial, ou seja, sem a aplicação de estresse químico na amostra, Figura 4.1 (a), um grande sincronismo entre o perfil de emissão de UWPE das amostras nas 2 câmaras até a 72ª hora, isso em resposta a fatores ambientais comuns. Após a aplicação do estresse químico na amostra presente na da câmara escura PMT02, pode-se notar que as emissões de UWPE das 2 amostras divergem entre si, evidenciado o efeito do agente estressante na amostra sob estresse.

Na Figura 4.2, para os testes com Hg - EC_{100} , comparativamente aos gráficos mostrados na Figura 4.1, para a solução Hg em concentração EC_{50} , as mudanças nos padrões de emissão das UWPE das amostras de controle, em relação às amostras sob estresse químico, se mostraram bastante similares, o que reflete serem as soluções de mercúrio capazes de produzir grandes distúrbios nas emissões de UWPE.

As Figuras 4.3 (a) e (b) mostram os padrões de emissão da UWPE para os testes de germinação por estresse por solução de mercúrio nas concentrações EC_{50} e EC_{100} , respectivamente, e o rápido crescimento nas emissões das amostras sob estresse (PMT02), se comparadas às amostras de controle (PMT01). Este fato reflete a forte ação da solução estressante sobre as sementes em germinação, porém, o mecanismo bioquímico associado a tal aumento nas emissões não pôde ser verificado, por estar fora do escopo deste trabalho de tese. No entanto, os efeitos da solução estressante por si só, mesmo sem o conhecimento de sua causa, se constituem em uma possibilidade de aplicação do método biofotônico na detecção de contaminantes, usando as emissões de biofótons das sementes de trigo como indicador biológico. A observação destes padrões, na forma de um gráfico apresentando os coeficientes angulares das aproximações lineares das trajetórias dos perfis de emissão, correlacionados com os parâmetros de germinação (ganho de biomassa e alongamento das raízes), como na Figura 4.3 (c), possibilita uma visão direta da ação estressante das soluções de Hg sobre a germinação das sementes.

4.3.4 Resultados dos testes de germinação sob estresse por NaF

4.3.4.1 UWPE dos testes com NaF 50 mM (EC_{50})

Foram realizadas duas séries de testes de germinação com estresse químico por NaF, em concentração de 50 mM, correspondente à EC_{50} , uma delas sendo uma série preliminar com 3 testes, e a outra uma série completa constituída de 10 testes. O estresse químico foi sempre aplicado no 4º dia de germinação (a partir da 72ª h até a 96ª h) quando tiveram início as medições de UWPE com duração de 24 h, exceto para o teste 1 onde a medição de UWPE se iniciou a partir do 1º dia de germinação. O período de integralização das contagens de fótons se deu em 10 s.

As medições de UWPE dos 3 testes da série preliminar podem ser vistas na Figura 4.5.

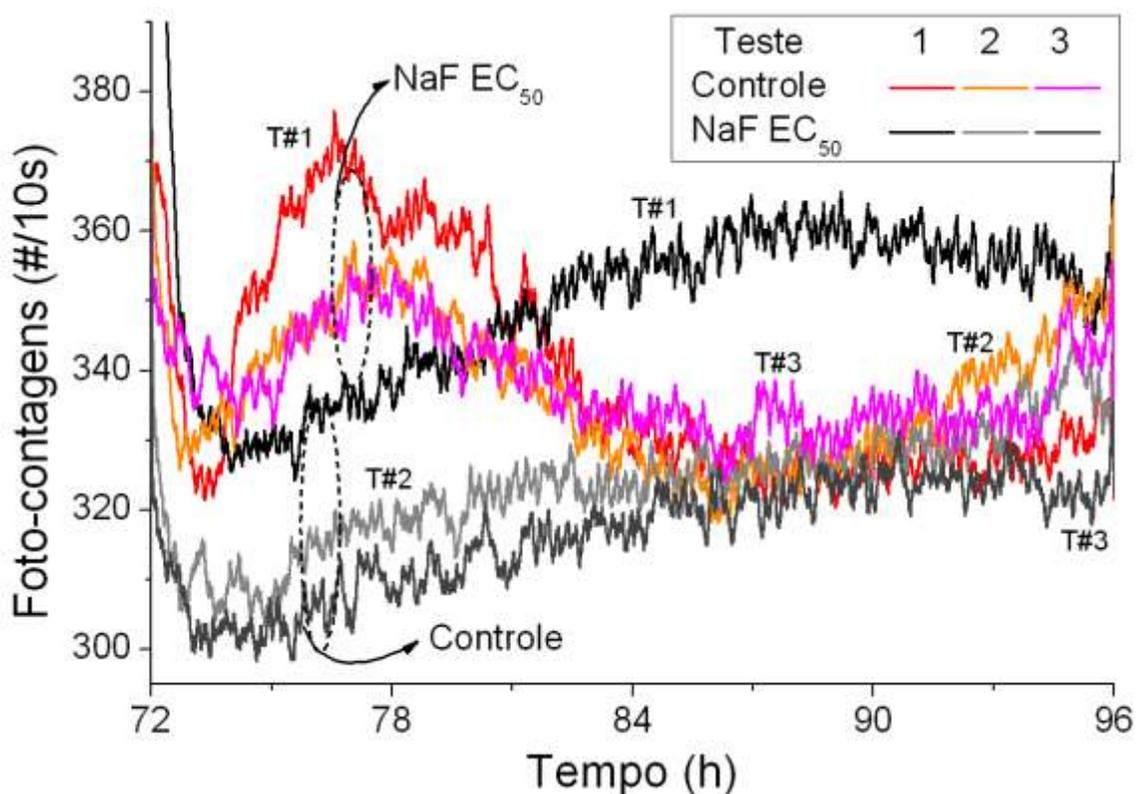
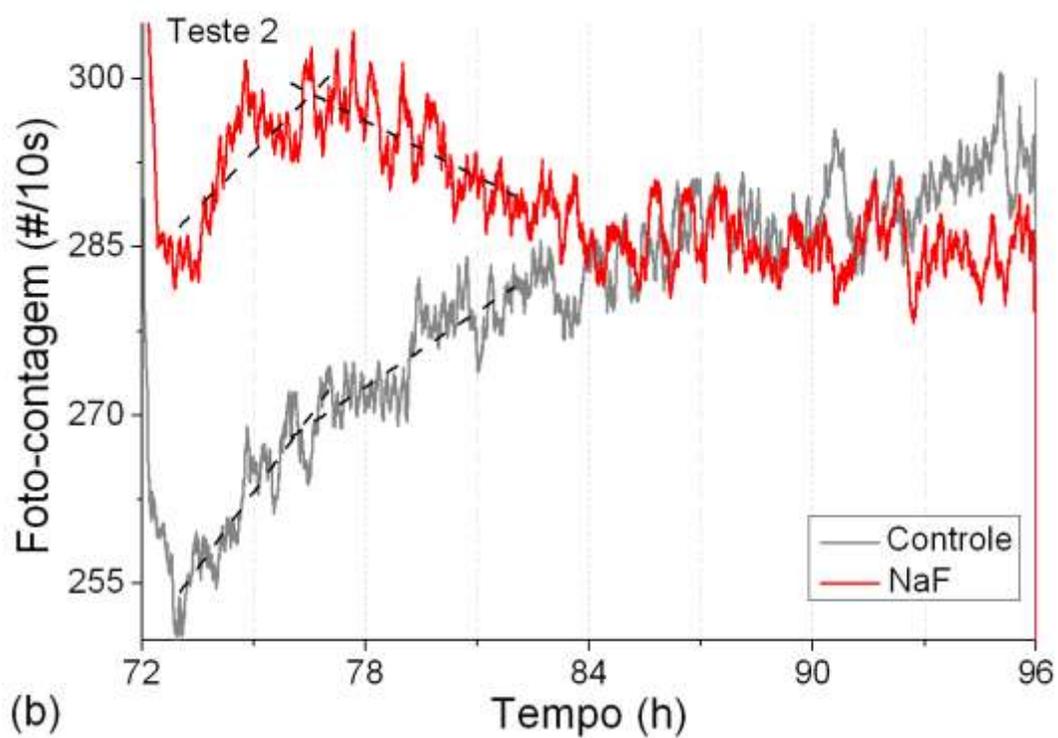
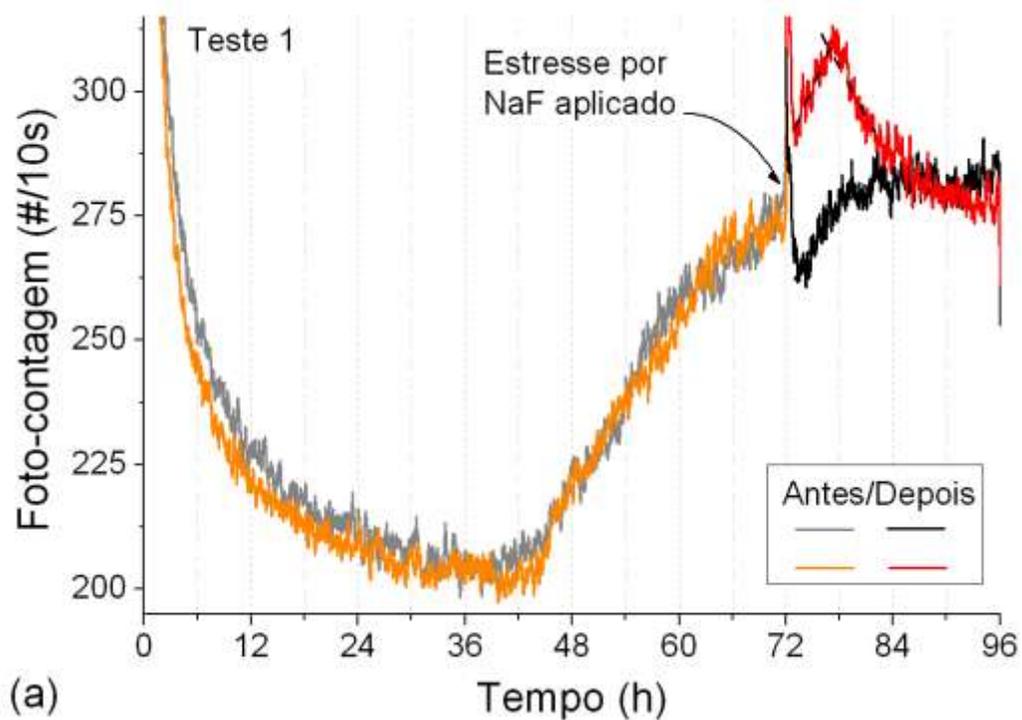


Figura 4.5 – Testes preliminares com sementes de trigo estressadas por NaF 50 mM – EC_{50} .

Na Figura 4.6, resultados dos 4 primeiros testes da série completa com NaF 50 mM.



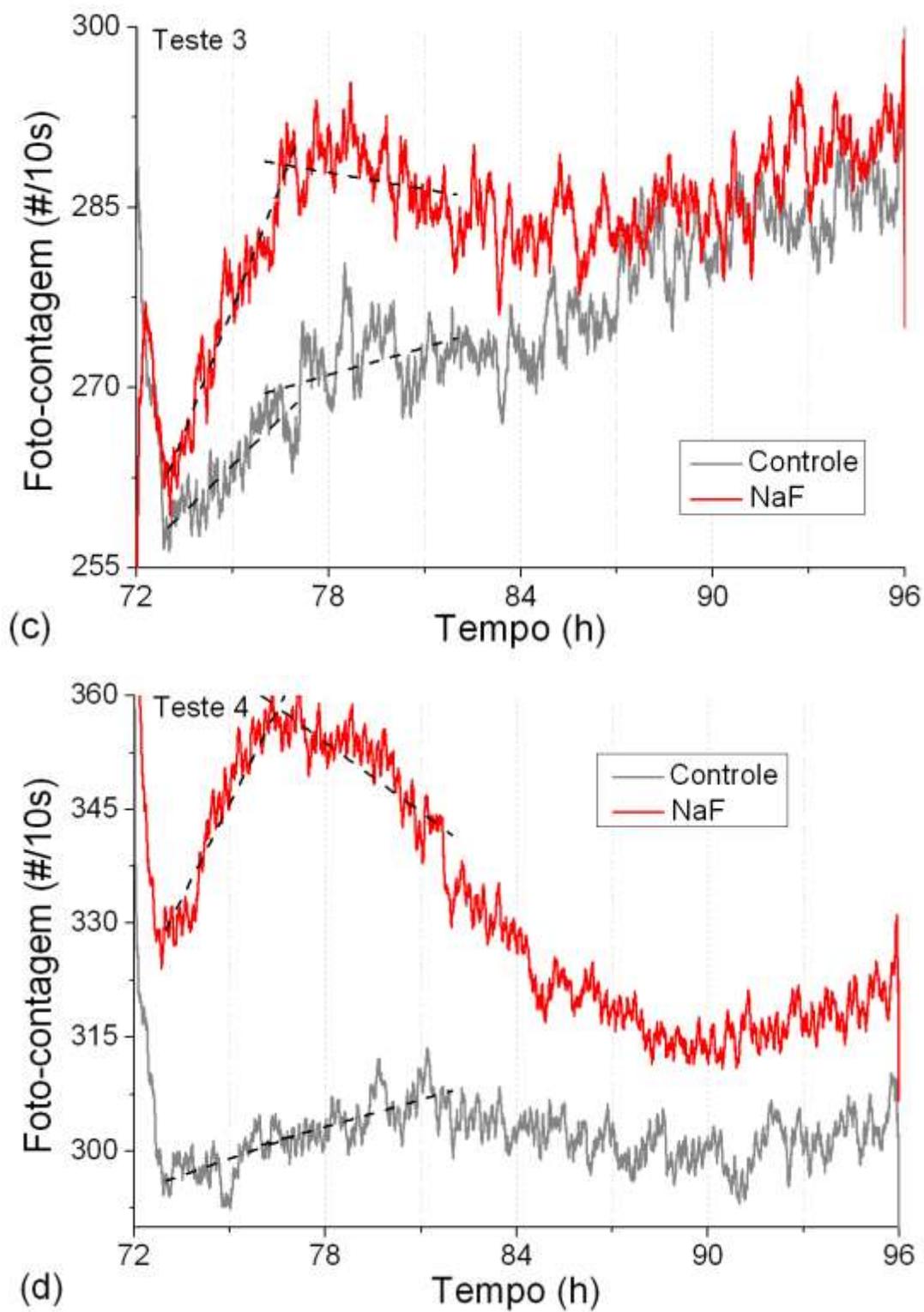
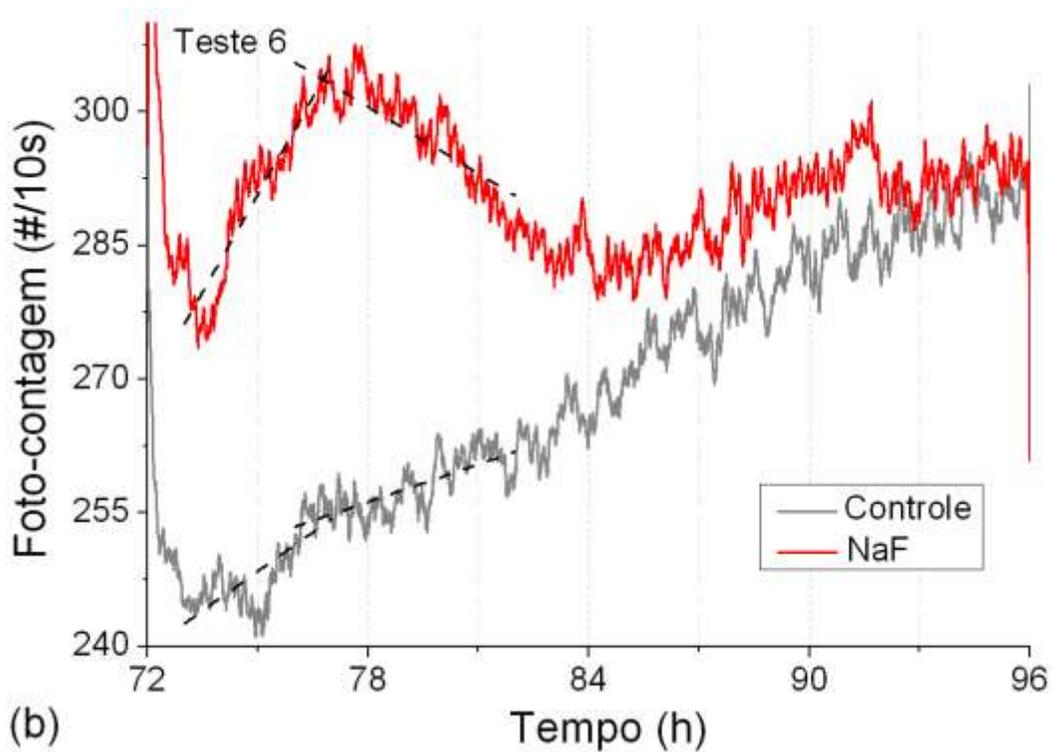
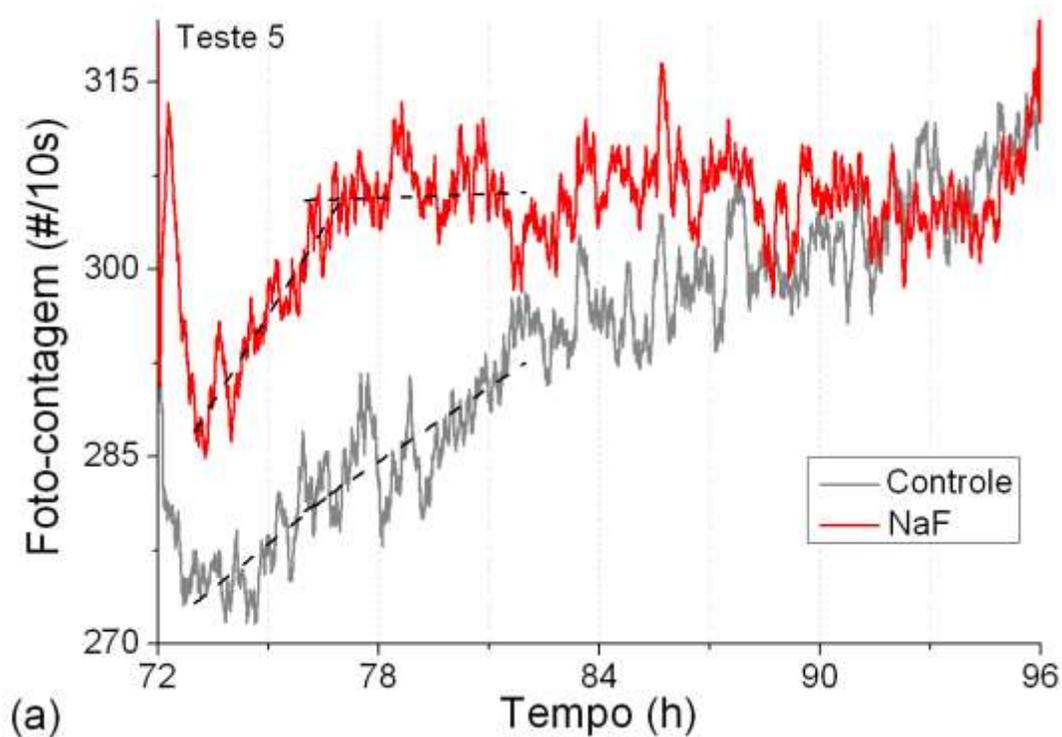
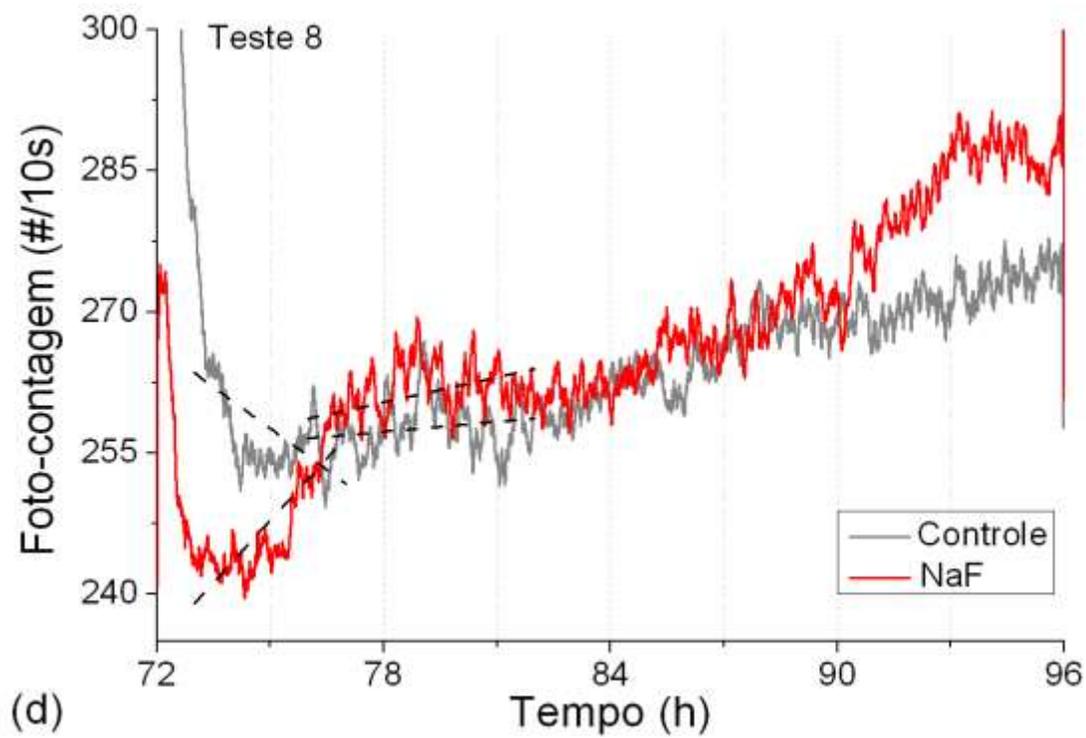
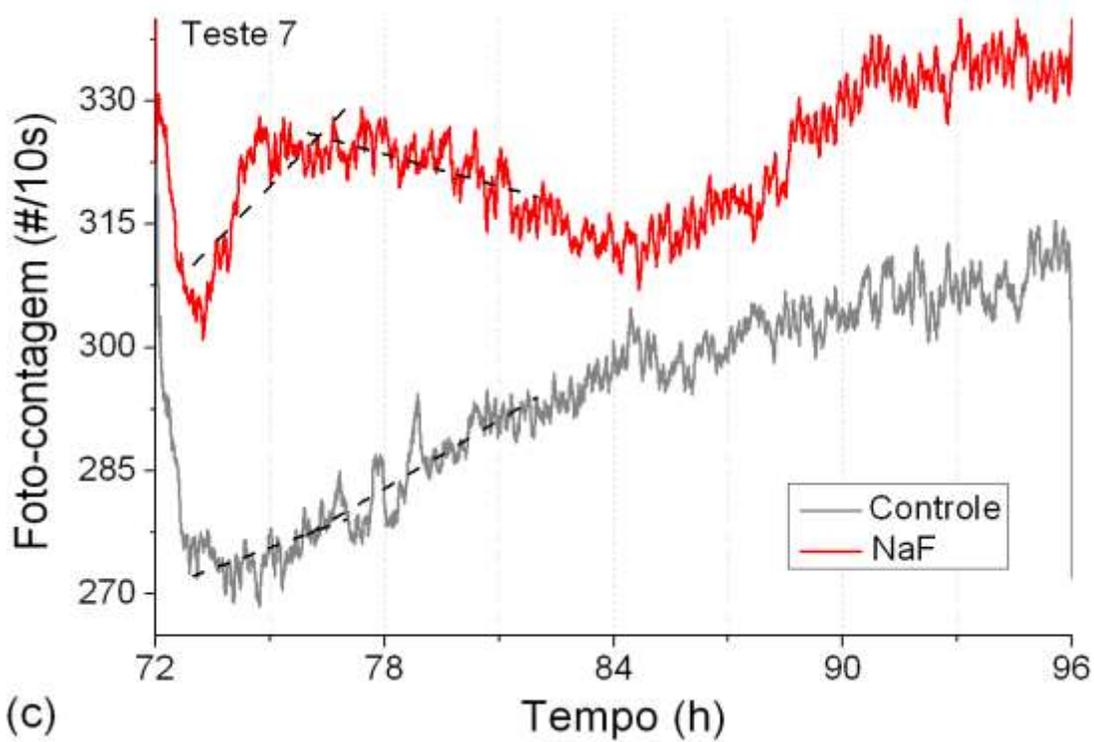


Figura 4.6 – Testes 1 a 4, (a) a (d), da série completa de testes de germinação de sementes de trigo estressadas por NaF 50 mM - EC₅₀ no 4º dia.

Na Figura 4.7, resultados dos 6 últimos testes da série completa com NaF 50 mM.





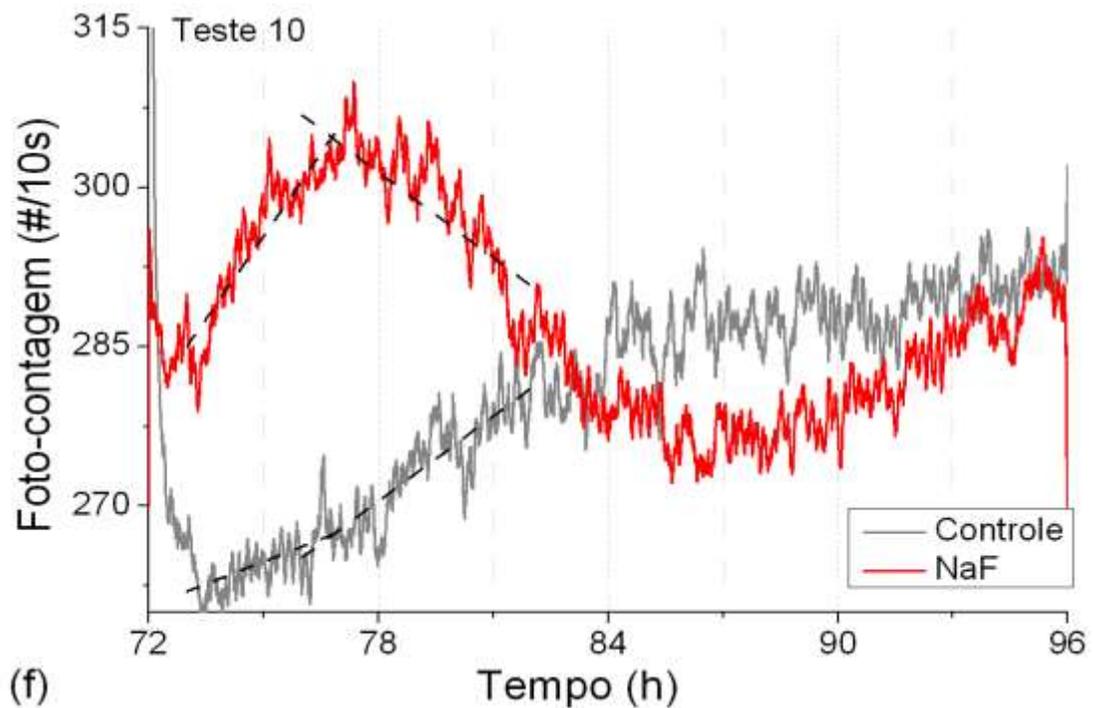
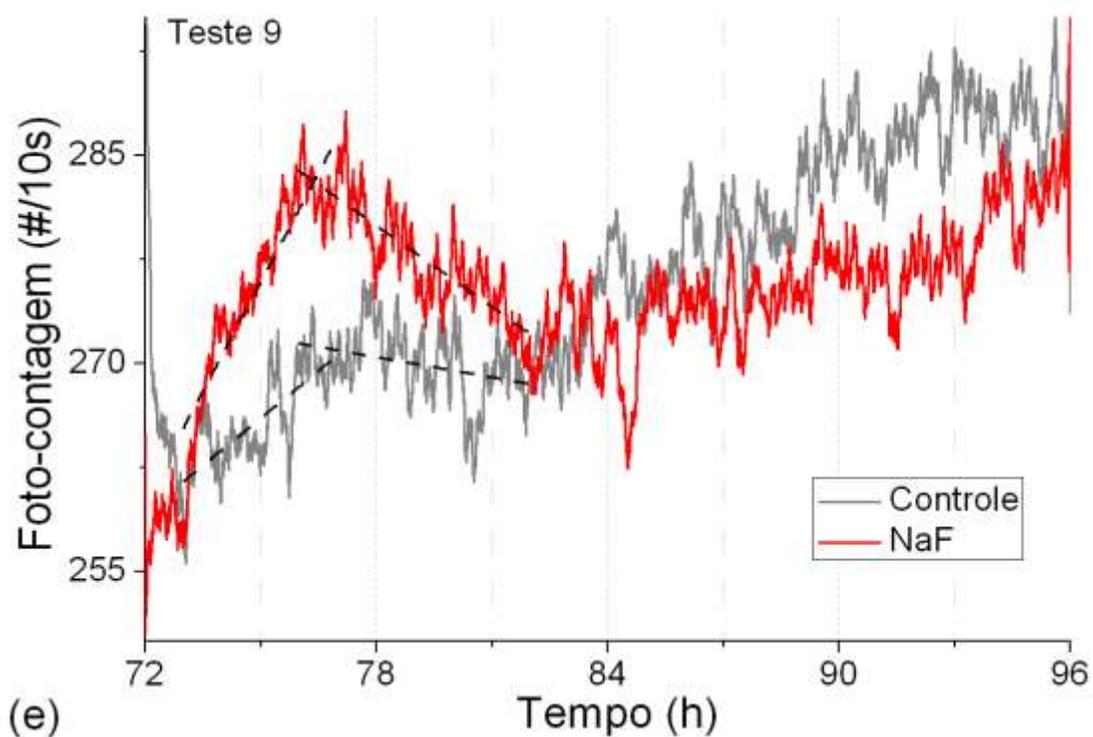
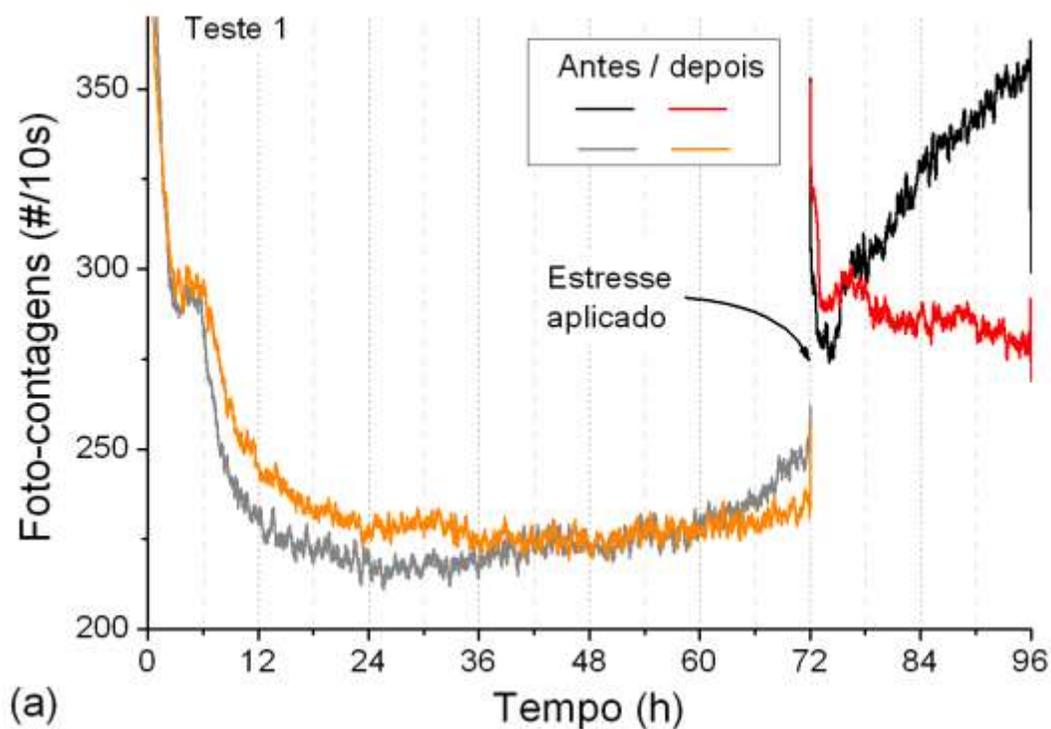
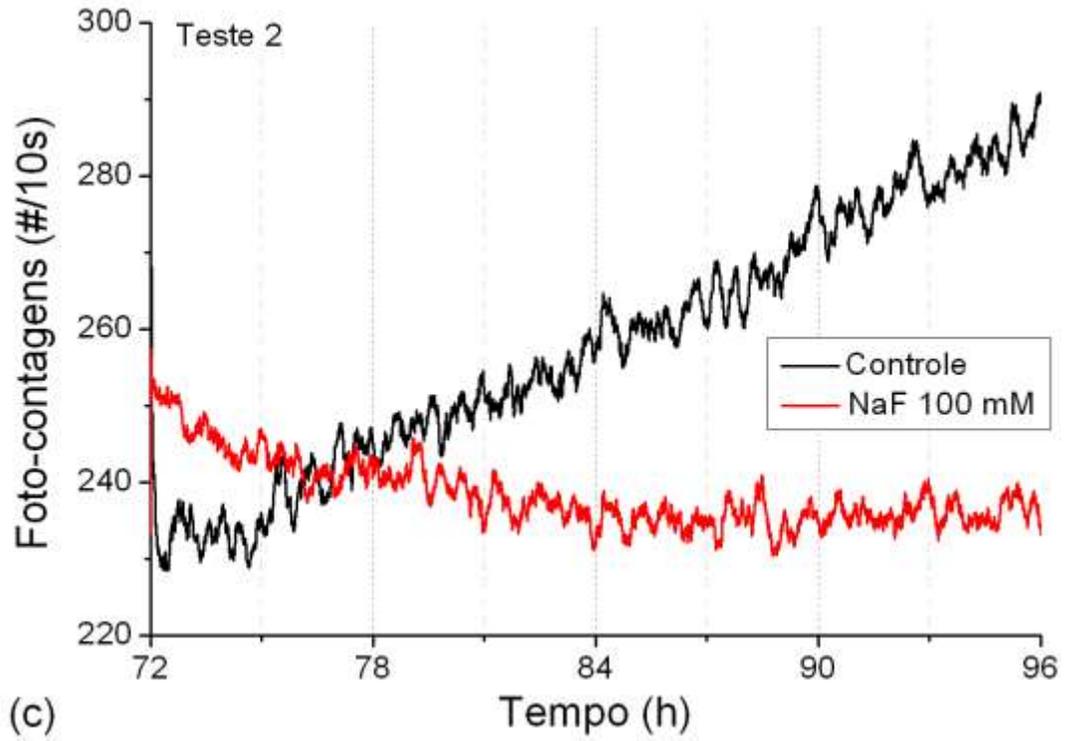
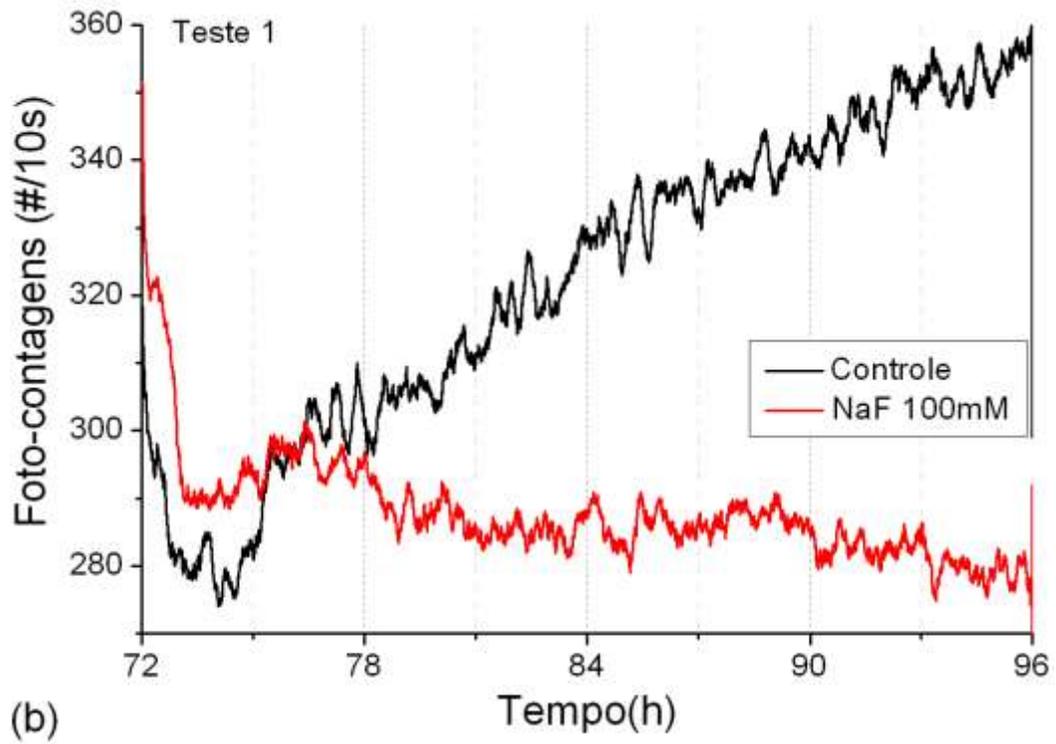


Figura 4.7 – Testes 5 a 10, (a) a (f), da série completa de testes de germinação de sementes de trigo estressadas por NaF 50 mM - EC_{50} no 4º dia.

4.3.4.2 UWPE dos testes com NaF - 100 mM (EC_{100})

Nesta série de 3 testes de germinação o agente estressante, solução de Fluoreto de Sódio (NaF) em concentração de 100 mM, correspondente à EC_{100} , foi aplicado no 4º dia de germinação, quando tiveram início as medições da UWPE, com duração de 24 h e período de integralização das contagens em 10 s, exceto para o teste 1 que teve a medição de UWPE a partir do 1º dia de germinação, como mostrado na Figura 4.8.





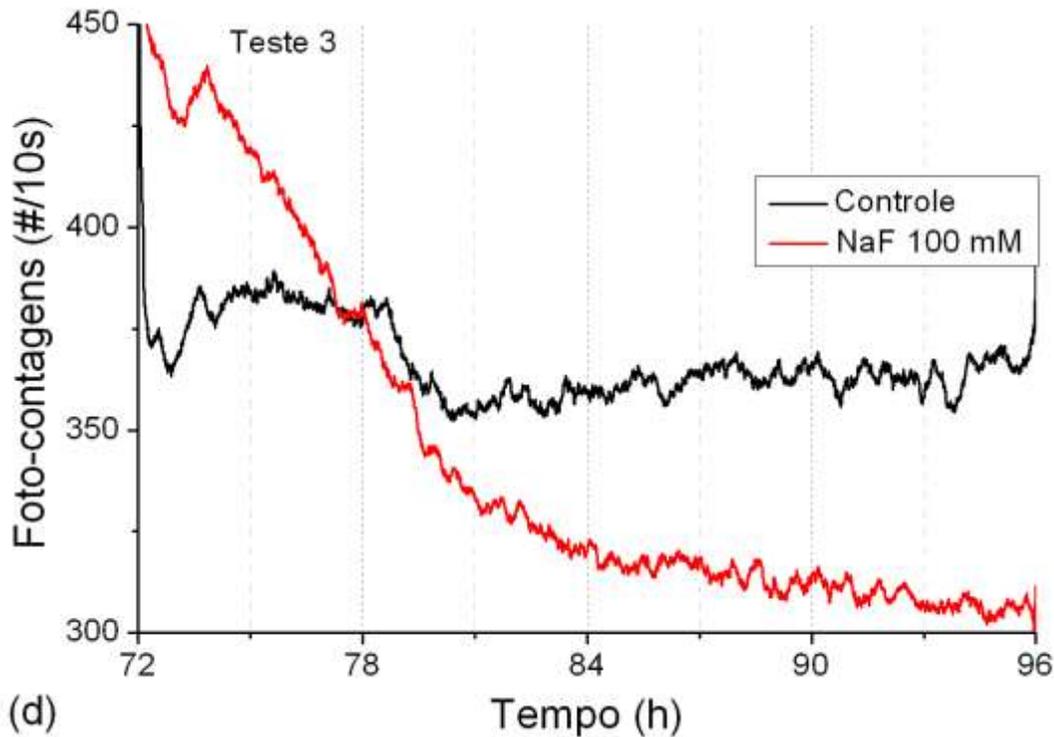


Figura 4.8 – Testes 1 a 3 (a) a (d) de germinação de sementes de trigo estressadas por NaF 100 mM - EC_{100} no 4º dia (24 horas finais de um período de 96 horas). Para o teste 1 as medições de UWPE se iniciaram no 1º dia de germinação (a).

4.3.4.3 Tratamento dos dados de UWPE dos testes com NaF

O processamento dos dados de foto-contagem da série completa, tendo como agente estressante NaF em concentração de 50 mM, correspondente à EC_{50} , foi feito através das aproximações lineares dos perfis de emissão das UWPE em dois trechos importantes destes perfis. O primeiro trecho é aquele compreendido entre a 73ª e 77ª h, período em que as emissões nas amostras estressadas apresentaram um incremento nas contagens em relação às amostras de controle, e o segundo trecho é aquele compreendido entre a 76ª e 82ª h, onde se constatou um comportamento oposto em relação ao primeiro trecho, ou seja, um decremento da contagem de fótons das amostras sob estresse em relação às amostras de controle. A correlação entre as variações nos coeficientes angulares nestes dois trechos (Alfa_1 - Alfa_2), e o ganho médio de biomassa e alongamento das raízes, para cada um dos 10 testes, está mostrado na Figura 4.9.

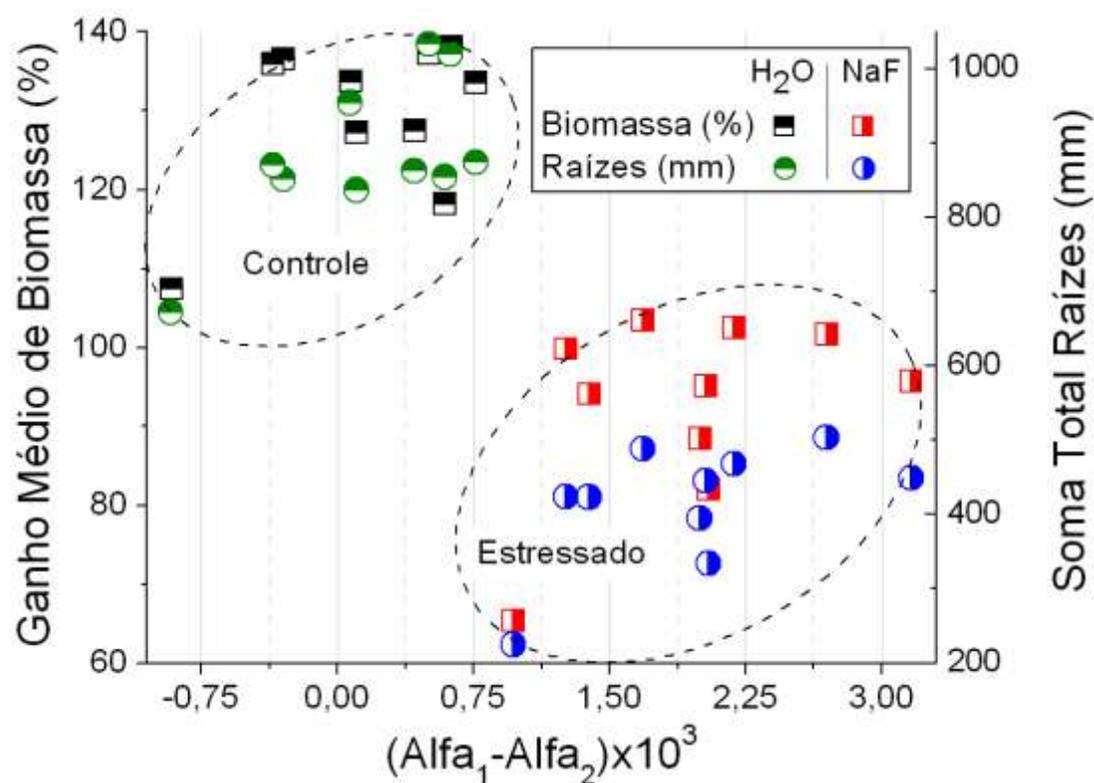


Figura 4.9 – Correlação entre os coeficientes angulares das aproximações lineares dos perfis de emissão de UWPE dos testes de germinação com estresse por NaF EC_{50} com os ganhos de biomassa e soma total dos alongamentos das raízes para a série completa.

4.3.4.4 Análise estatística dos dados da série de testes de estresse por NaF

A análise estatística dos dados da série de testes de estresse por NaF teve como objetivo comparar as médias amostrais dos dados de variação do coeficiente angular ($Alfa_1 - Alfa_2$) das amostras de controle em relação às amostras sob estresse. Através desta análise, verificou-se a significância estatística de tais resultados, e, portanto, da hipótese de que o estresse provocado pela solução de NaF nas sementes de trigo alteram significativamente o padrão de emissão espontânea de fótons.

Esta análise se baseou na ferramenta estatística para teste de hipóteses conhecido como “teste t ” ou “teste de *Student*”¹⁰, o qual somente se aplica para distribuições próximas da normal e

¹⁰ Willian Sealy Gosset, químico (1876-1937) publicou seus estudos acerca deste teste em 1908, em artigo da revista *Biometrika*, intitulado “*The Probable Error of a Mean*”, e para isso usou o pseudônimo de *Student* por ser funcionário de uma famosa cervejaria irlandesa que entendia ser essa questão de segredo industrial.

onde se conhece a média e variância amostral mas não a média e variância populacional [69]. O programa *OriginPro*, utilizado amplamente nesta tese para o processamento dos dados de UWPE, contém, em seu conjunto de ferramentas estatísticas, a implementação deste teste de hipóteses, sendo que esta ferramenta foi aqui utilizada na sua modalidade para amostras pareadas, uma vez que deseja-se testar a mudança nas emissões de fótons entre duas amostras de sementes germinando nas mesmas condições, sendo que em uma delas é aplicado um estresse químico.

Antes de executar o teste de *Student* há a necessidade de se testar os dois conjuntos de dados quanto ao tipo de distribuição que apresentam, uma vez que, como mencionado antes, o teste de *Student* somente se aplica a distribuições próximas da normal. O *OriginPro* também possui o teste de normalidade de amostras, sendo que este foi realizado e se obteve com grau de confiança de 95% que estes dois conjuntos de dados possuem distribuição normal.

O teste de hipóteses para amostras pareadas usando o teste de *Student* executado no *OriginPro* comprovou a hipótese de que as amostras são significativamente diferentes com nível de significância escolhido de $\alpha=0,05$, tendo a média amostral do conjunto de dados de controle resultado em $\mu_0=0,15582$ com desvio padrão amostral $S=0,53706$, e a média amostral do conjunto de dados de estresse resultado em $\mu_A=1,94461$ com $S=0,65964$, diferença de 1,7888 nas médias amostrais, ou seja:

- 1) Estabelecimento das hipóteses estatísticas:
 - a. Hipótese nula: $H_0: \mu_A = \mu_0 = 0,1558$;
 - b. Hipótese alternativa: $H_A: \mu_A \neq \mu_0$
- 2) Escolha do nível de significância: $\alpha = 0,05$
- 3) Valor crítico t do teste em função do grau de liberdade $gl = n-1 = 9$ (número de amostras $n = 10$) e do nível de significância escolhido ($\alpha = 0,05$) fornecido por uma tabela da distribuição t : $t_{0,05;9} = 1,833$
- 4) Valor calculado pelo *OriginPro* para a estatística t do teste: $t_{calc} = 9,01687$
- 5) Resultado: $|t_{calc}| = 9,01687 > t_{0,05;9} = 1,833$, pode-se, portanto, rejeitar a hipótese nula.
- 6) Conclusão: A diferença de 1,7425 entre as médias amostrais dos dois conjuntos de dados é estatisticamente significativa, e a série de 10 experimentos conduzida com amostras de trigo germinando por 96 horas simultaneamente em água destilada e es-

tressadas por NaF no 4º dia de germinação, produziram diferentes perfis de emissões de fótons ultra-fracas no 4º dia de germinação, o que pode ser comprovado pelo teste *t* e pelo gráfico da Figura 4.9.

4.3.4.5 Foto das placas controle e estresse para NaF a 100 mM

A foto da Figura 4.10, tirada após as amostras de sementes de trigo em germinação terem sido retiradas das câmaras PMT01 e PMT02, mostra à esquerda a placa com a amostra de controle, e à direita a amostra que sofreu a ação da solução de NaF a 100 mM, aplicada no 4º dia de germinação. Como esta concentração de 100 mM é a que provoca os maiores danos à planta, esta foto foi escolhida para ilustrar a agressividade do agente estressor.



Figura 4.10 – Foto mostrando as placas de Petri com as amostras de controle (esquerda) e sob estresse por NaF a 100mM (direita).

4.3.4.6 Discussão dos testes de estresse por NaF

As Figuras 4.8 de (a) a (d), mostram os padrões de emissão da UWPE de 96 horas do teste 1, Figuras (a) e (b), e 24 h dos testes 2 e 3, Figuras (c) e (d), para a solução de 100 mM de NaF (EC_{100}), evidenciam o rápido decaimento nas emissões das amostras sob estresse (PMT02), se comparadas às amostras de controle (PMT01). Este fato reflete a forte ação deletéria da solução de NaF - EC_{100} sobre as sementes em germinação.

O teste 1 desta série, usando a solução de NaF - EC₁₀₀, sendo um teste de 1º dia, mostra em seu período inicial, ou seja, sem a aplicação de estresse químico, Figura 4.8 (a), um grande sincronismo entre o perfil de emissão de UWPE das amostras nas 2 câmaras até a 72ª hora, isso em resposta a fatores ambientais comuns. Após a aplicação do estresse químico na amostra presente na câmara escura PMT02, pode-se notar que as emissões de UWPE das 2 amostras divergem entre si, evidenciado o efeito do agente estressante na amostra sob estresse, como mostrado em detalhe na Figura 4.8 (b).

Comparativamente aos gráficos da Figura 4.8, para os testes com NaF - EC₁₀₀, os gráficos mostrados na Figura 4.5, para a solução NaF em concentração de 50 mM - EC₅₀, evidenciam mudanças menores nos padrões de emissão das UWPE das amostras de controle em relação às amostras sob estresse químico. A observação destes padrões, na forma de um gráfico que apresenta o desvio das trajetórias dos perfis de emissão, correlacionados aos parâmetros de germinação (ganho de biomassa e alongamento das raízes), como o da Figura 4.9, facilita a interpretação dos resultados, e nos permite ter uma visão mais clara acerca da ação estressante da solução de NaF sobre o processo de germinação das sementes.

A análise estatística feita para a série longa de experimentos com sementes de trigo estressadas pela solução de fluoreto de sódio EC₅₀ atestou a validade da hipótese de que os desvios apresentados nos padrões de emissão de UWPE se devem realmente à ação estressante do agente químico aplicado.

A técnica apresentada, baseada na análise dos padrões de emissão da UWPE de duas amostras de sementes de trigo, simultaneamente medidas, nas mesmas condições, no quarto dia de germinação, se mostra com potencial aplicação na área de controle ambiental, usando as sementes como indicador biológico na detecção de possíveis agentes contaminantes.

4.3.5 DL de sementes em germinação sob estresse químico por Hg

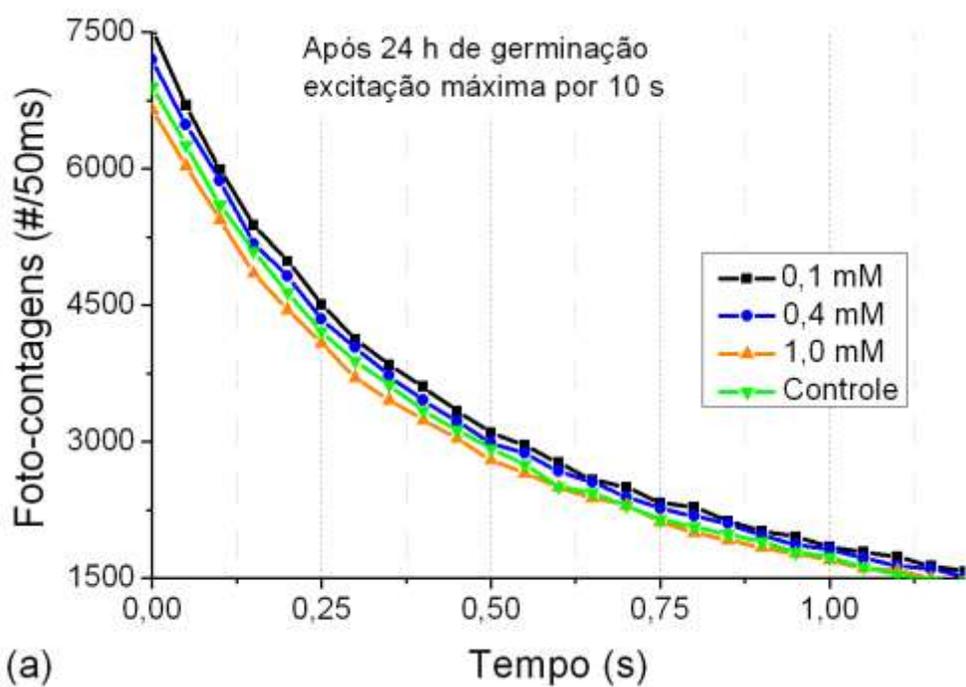
4.3.5.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental para a medição das DLs de sementes em germinação sob estresse químico seguiu o roteiro descrito a seguir:

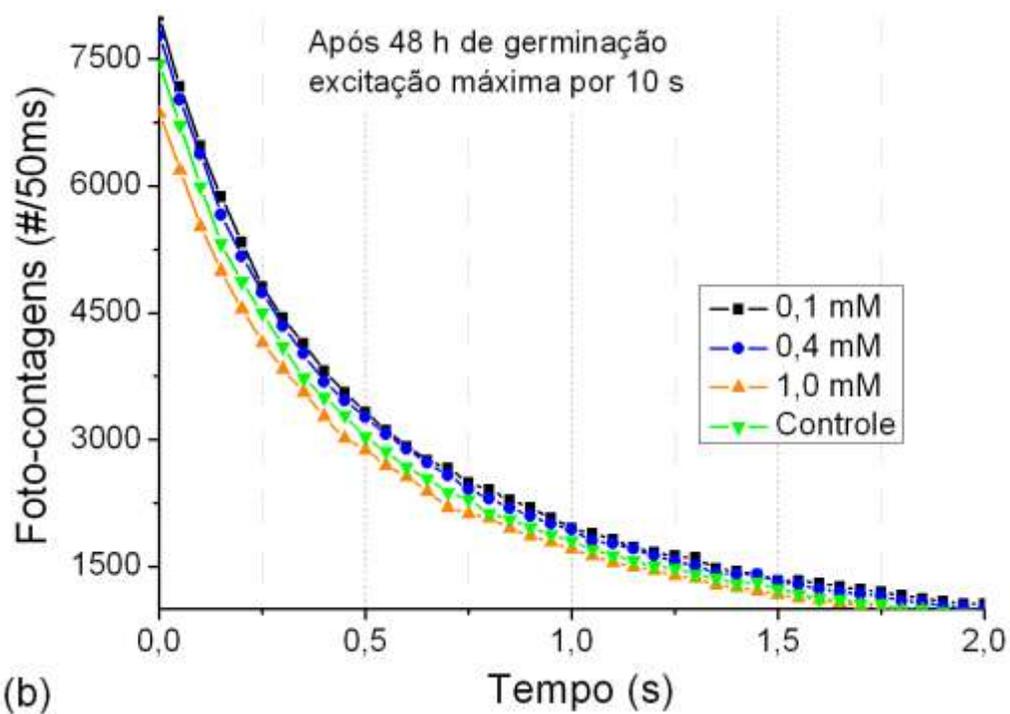
- **Preparação das soluções** - Soluções de Hg em concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mM foram preparadas a partir de uma solução padrão de Hg, tendo posteriormente o pH destas soluções sido corrigidos para próximo de 7, por ser o pH neutro, correspondendo ao pH da água destilada.
- **Germinação das sementes** - Como descrito na seção 4.3.2, 10 amostras contendo 25 sementes cada são pesadas, arranjadas em 6 placas de Petri com 5 filtros de papel embebidos em 3 ml de água destilada e levadas a uma câmara de germinação para germinar no escuro, sob temperatura controlada em 20 °C, por um período inicial de 24 horas, quando, então, duas a duas recebem as soluções de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mM de Hg. Antes, porém, as amostras são retiradas da câmara de germinação, e levadas à câmara PMT02 em condição de pouca iluminação, onde as DLs são medidas como descrito a seguir. Após períodos sucessivos de 24 horas, ou seja, a 48, 72 e 96 horas do início da germinação, as amostras são novamente retiradas em condição de pouca iluminação tendo as suas DLs medidas conforme procedimento a seguir.
- **Medições das DLs** - Após se proceder a esterilização da câmara PMT02 com álcool 70%, a amostra sob estudo retirada da câmara de germinação, em condição de pouca iluminação, é colocada no interior da câmara PMT02 (usando a placa de contagem USB C8855) e devidamente fechada. Parâmetros de aquisição da DL são ajustados para uma duração do teste de 90 segundos e contagens integralizadas a cada 50 milisegundos, e então, iniciam-se as medições das DLs com 5 repetições sucessivas para cada amostra.
- **Medição dos resultados das germinações** - Após as medições das DLs terem sido feitas, as 6 amostras de 25 sementes que estiveram germinando e adquiriram biomassa são, então, pesadas, e os comprimentos das raízes medidos em milímetros. Estes dados, juntamente com os dados das medições das DLs, são então processados.

4.3.5.2 Resultados dos testes de DL após 24, 48, 72 e 96 h

Os resultados das medições das DLs, obtidas conforme descrito nos procedimentos experimentais, são mostrados na Figura 4.11, de (a) até (d), respectivamente.



(a)



(b)

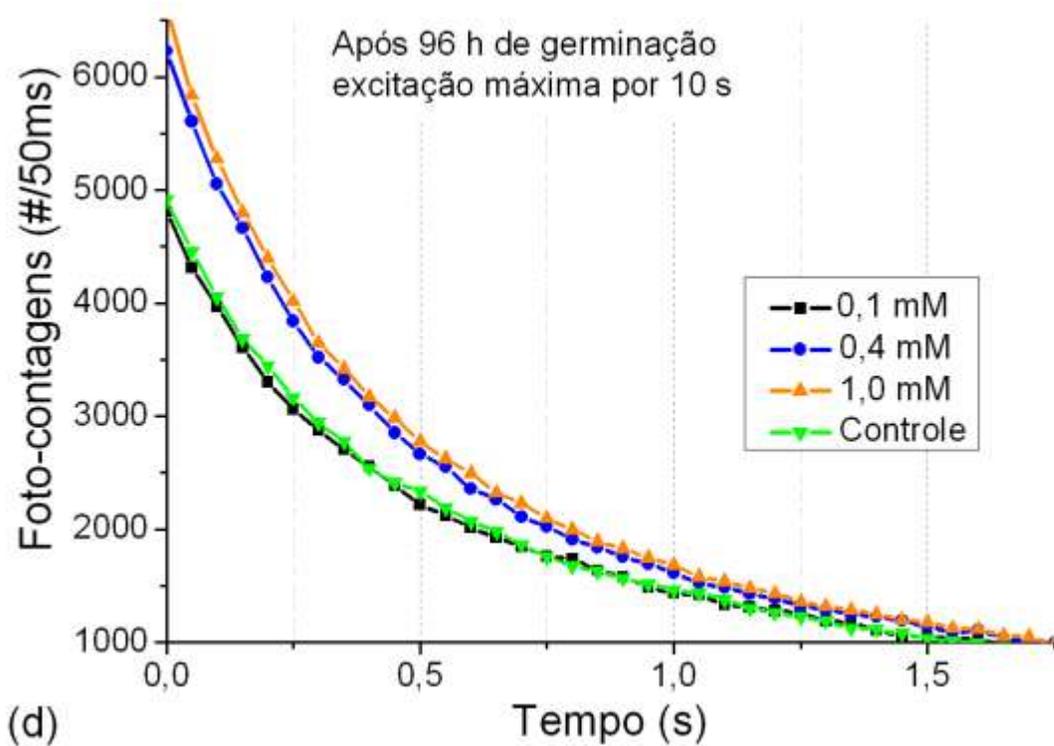
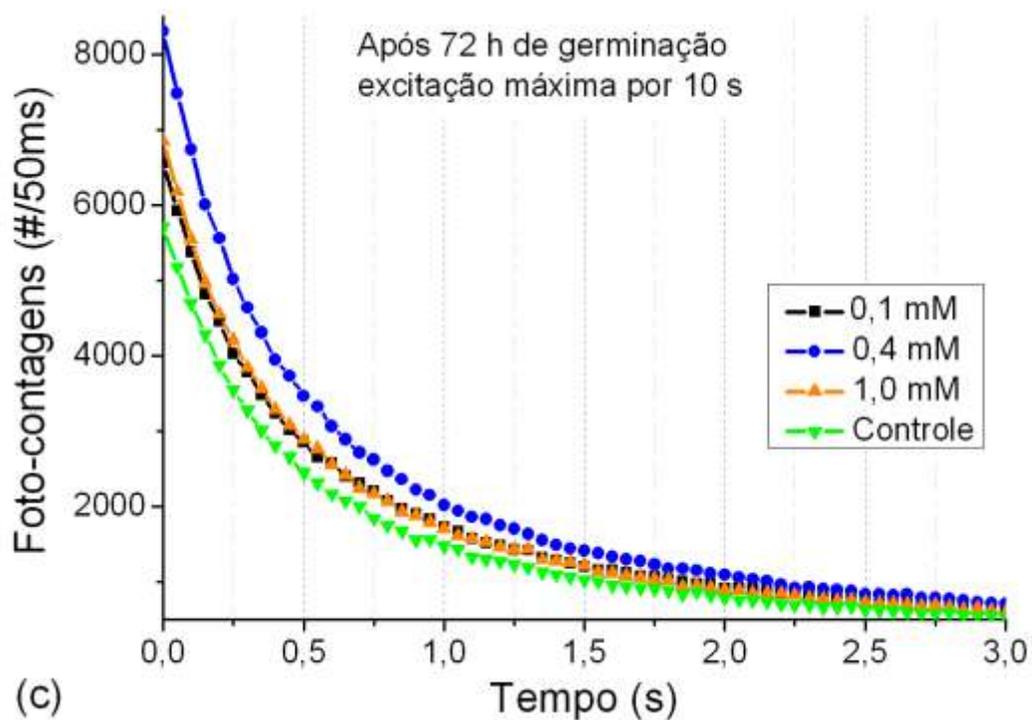
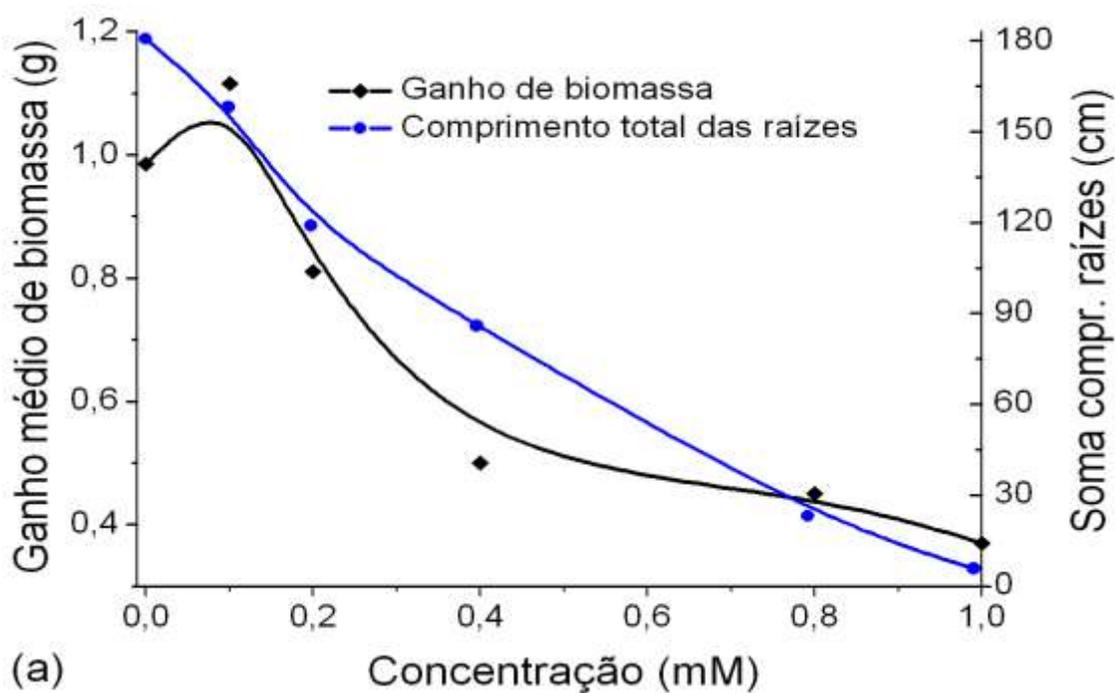


Figura 4.11 – DLs das amostras de sementes de trigo em germinação após 24, 48, 72 e 96 horas sob ação de soluções de Hg de concentrações 0,1; 0,4 e 1,0 mM além do controle.

4.3.5.3 Resultados das medições do ganho de biomassa e comprimento das raízes

Os resultados das medições dos ganhos médios de biomassa das amostras após as 96 horas de germinação, e os respectivos comprimentos totais médios das raízes, em correspondência com as concentrações das soluções de Hg, podem ser vistos na Figura 4.12 (a). Em (b) o ganho de biomassa e contagem total média dos biofótons em 90 s são correlacionados com as concentrações das soluções.



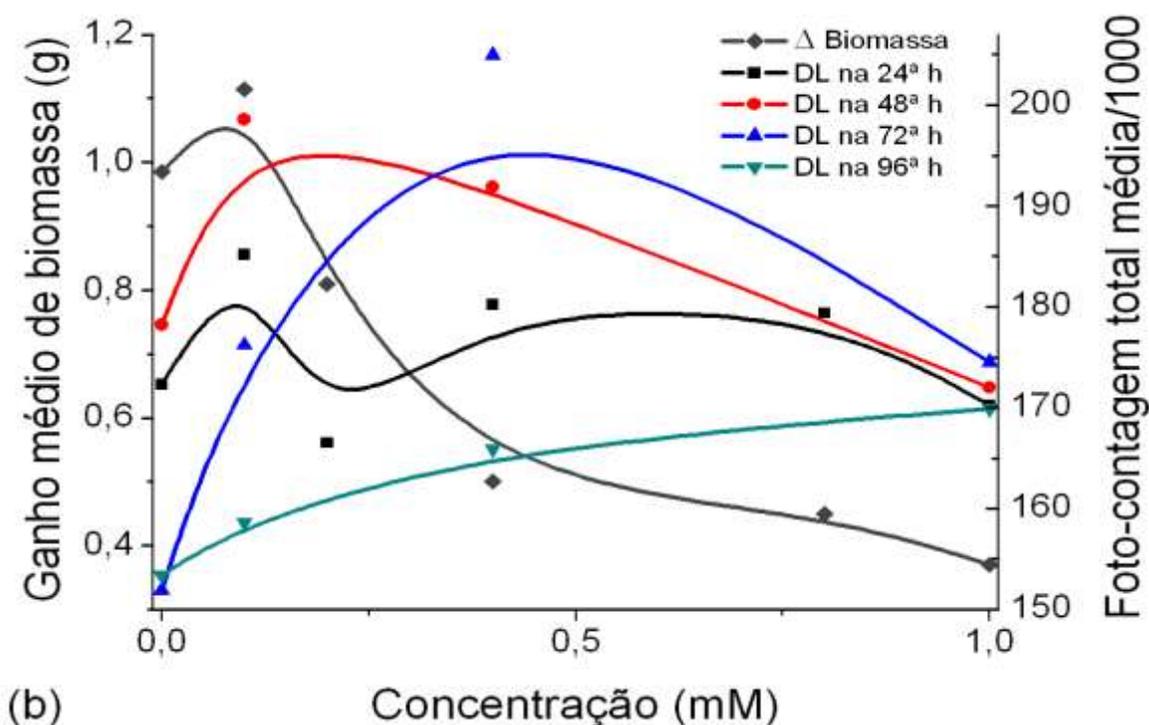


Figura 4.12 – Ganhos de biomassa e soma total dos comprimentos das raízes, versus concentração das soluções de Hg (a). Em (b) ganhos de biomassa e soma total da contagem dos fótons das DLs em 90 s, versus concentração das soluções de Hg.

4.3.5.4 Discussão sobre os resultados dos testes de DL

Na Figura 4.11 de (a) a (d) estão mostrados os perfis das contagens de fótons da luminescência retardada registradas por 90 s e obtidas 24, 48, 72 e 96 horas do início da germinação, respectivamente, com excitação luminosa de 174 lx por 10 s. Comparando-se estes vários gráficos, pode-se observar que os decaimentos das amostras submetidas às maiores concentrações das soluções de Hg (0,4 e 1,0 mM) se distanciam daqueles das amostras de controle e com 0,1 mM para instantes de medição posteriores em relação ao início da germinação, demonstrando uma relação direta entre a concentração da solução e o distúrbio provocado no perfil da DL. Os gráficos apresentados na Figura 4.12 em (a) mostram a relação entre o ganho de biomassa e o comprimento linear das raízes, medidos na 96ª hora de germinação, mostrando a ação deletéria das soluções com maiores concentrações de Hg no desenvolvimento da planta. A Figura 4.12 (b) mostra a relação entre o ganho de biomassa e os totais das contagens de fótons das DLs em 90 s, mostrando um comportamento conhecido como curva U invertida. Este comportamento da curva dose-

resposta em forma de U invertido, de característica bifásica, é conhecido na área da toxicologia como efeito hormético, se caracterizando por uma resposta adaptativa ou compensatória das células do organismo às doses moderadas de um agente tóxico, de modo a produzir um efeito estimulante ou mesmo benéfico, e um efeito inibitório ou mesmo tóxico para altas doses [Hadley2003, Mattson2008].

Embora estes testes de DL em sementes sob estresse químico tenham sido preliminares, por se tratar de apenas um experimento, se as conclusões aqui relatadas se consolidarem através de uma série longa de experimentos, este procedimento experimental poderá se tornar uma técnica rápida e de fácil aplicação na análise de toxicidade em controle ambiental.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho de tese foram apresentados os resultados do projeto e implementação de um sistema automático para medidas de UWPE/DL, e aplicações deste sistema em controle ambiental e estudos de viabilidade de sementes, avaliando-se os perfis de emissão dos dados de UWPE/DL correlacionados aos parâmetros de germinação.

O sistema automático para medidas de UWPE/DL implementado apresenta recursos bastante desejáveis em estudos de UWPE e DL, tais como: controle de iluminação para medidas de DL, controlador PID de temperatura e controle da fonte de alimentação do módulo fotomultiplicador. Além disto, a parte mecânica da câmara foi projetada em pequenas dimensões de modo a garantir uma boa SNR, o que foi mostrado nos testes de desempenho do sistema apresentados no Capítulo 3.

Um sistema alternativo baseado em uma placa microcontrolada desenvolvida para substituir a placa USB de contagem de fótons e o acionador do *shutter* do iluminador, ambos dispositivos comerciais de alto custo, ainda provendo o controle de acionamento de uma fonte de alimentação para o módulo PMT e a leitura de um sensor de temperatura integrado LM35, torna o sistema alternativo de baixíssimo custo, sendo ainda muito versátil, já que outras funções podem ser incorporadas a este sistema em projetos futuros, adicionando-se os recursos de hardware e/ou software necessários a determinada aplicação. O firmware desta placa que tem como base um microcontrolador da família AVR RISC, pode ser portado para elementos da família AVR com maior capacidade de processamento, ou ainda, que contém dispositivos periféricos específicos, contemplando assim os requisitos necessários a uma determinada aplicação.

Os instrumentos virtuais, desenvolvidos em LabVIEW, para controlar os dispositivos de hardware da versão do sistema integrado por componentes proprietários, e da versão desenvolvida com base na placa microcontrolada, foram implementados como uma máquina de estados, operando com eventos para tratar os controles de seu painel frontal, o que conferiu aos projetos grande versatilidade de operação e facilidade de manutenção em futuras adições de controles e funções.

No âmbito das aplicações desenvolvidas para o sistema implementado, resultados experimentais com sementes de trigo e crescimento de bactérias apontam para uma gama variada de aplicações práticas, nas áreas de controle ambiental e agricultura. Estudos de caráter básico usan-

do duas câmaras idênticas apontaram para a possibilidade de verificação de ciclos circadianos associados às amostras biológicas em estudo, especialmente em relação a sementes, comprovado pela apresentação de desvios destes ciclos quando as amostras de sementes são estressadas quimicamente.

Um método de análise de toxicidade de soluções de Hg e NaF nas concentrações efetivas EC_{50} e EC_{100} , baseado na medição simultânea das UWPEs de duas amostras de semente de trigo no 4º dia de germinação, uma delas sendo quimicamente estressada pela solução, e a outra não, e sendo estas medidas efetuadas por dois sistemas de medição idênticos, e em condições ambientais idênticas, de forma inédita, apontou para uma possível aplicação prática na área de controle ambiental, tendo como vantagens em relação aos métodos tradicionais, a maior rapidez do teste e sua maior simplicidade, uma vez que bastará a análise destes perfis de emissão de UWPE ao invés das laboriosas medições de parâmetros de germinação como comprimentos de raízes de um grande número de amostras.

Preliminarmente, experimentos com DLs de sementes em germinação estressadas quimicamente por soluções de Hg em 4 concentrações diferentes, registradas por 90 s e obtidas 24, 48, 72 e 96 horas do início da germinação, se mostraram promissores como um indicador biológico na análise de toxicidade em controle ambiental.

Como trabalhos futuros que dão prosseguimento a este trabalho de tese, o mais premente é no sentido de se avançar nos estudos das DLs de sementes sob estresse químico, estendendo os resultados preliminares apresentados na seção 4.3.5; para tanto, uma série de experimentos constituída de muitos testes deve ser realizada. No âmbito da instrumentação, aperfeiçoamentos podem ser feitos, por exemplo, proporcionando à câmara um meio de infundir soluções estressantes nas amostras sob experimentação sem a necessidade de se interromper a medida e abrir a câmara escura. Outro tipo de aperfeiçoamento seria um mecanismo capaz de introduzir filtros de diferentes comprimentos de onda entre a amostra e a janela óptica da PMT de forma automática possibilitando-se estudos para se levantar componentes espectrais das emissões de fótons e, assim, trazer novas informações a serem analisadas. Enfim, o tema desta tese abre muitas oportunidades de trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- [1] SHEN, X.; VAN-WIJK, R. (Org.). **Biophotonics-Optical Science and Engineering for the 21st Century**. New York: Springer Science+Business Media, Inc, 2005. 222 p.
- [2] POPP, F. A. Biophoton background, experimental results, theoretical approach and applications. **Res. Adv. in Photochemistry & Photobiology**, v. 1, p. 31-40, 2000.
- [3] DEVARAJ, B.; USA, M.; INABA, H. Biophotons: ultraweak light emission from living systems. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 2, n. 2, p. 188-193, 1997.
- [4] INABA, H. Measurement of biophoton from human body. *Journal of International Society of Life Information Science*, v. 18, n. 2, p. 448-451, 2000.
- [5] SHIMIZU, Y. *et al.* Measuring methods for ultra-low light intensity and their application to extra-weak spontaneous bioluminescence from living tissues. **IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement**, v. IM-22, n. 2, p. 153-157, 1973.
- [6] RATTEMeyer, M.; POPP, F. A. Evidence of photon emission from dna in living systems. **Naturwissenschaften**, v. 68, n. 11, p. 572-573, 1981.
- [7] TAKEDA, M. *et al.* A novel method of assessing carcinoma cell proliferation by biophoton emission. **Cancer Letters**, v. 127, p. 155-160, 1998.
- [8] KOBAYASHI, M. *et al.* In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress. **Neuroscience Research**, v. 34, p. 103-113, 1999.
- [9] ZEIGER, B. F. Biophotons as a measure of germinative ability and vigour. In: CHANG J. J.; FISCH, J.; POPP Fritz-Albert (Org.). **Biophotons**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. P. 251-297.
- [10] YAN, Y.; POPP, F. A.; ROTHE, G. M. Correlation between germination capacity and biophoton emission of barley seeds (*hordeum vulgare* L.). **Seed Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 249-258, 2003.
- [11] GALLEP, C. M. *et al.* Ultra-weak delayed luminescence in coee seeds (*coea arabica* and *c. canephora*) and their germination potential: some indications for a photonic approach in seed viability. In: PROCEEDINGS OF 11TH BRAZILIAN SYMPOSIUM OF MICROWAVE AND OPTOELECTRONICS, 2004, São Paulo, **Anais**, section p1-12, 2004.

- [12] LANZANÒ L. *et al.* Time-resolved spectral measurements of delayed luminescence from single soybean seed: effects of thermal damage and correlation with germination performance. **Luminescence**, v. 24, n.6, p. 409-415, 2009.
- [13] WANG, J.; YU, Y. Relationship between ultra-weak bioluminescence and vigour and irradiation dose of irradiated wheat. **Luminescence**, v. 24, n.4, p. 209-212, 2008.
- [14] MATHEW, F. P.; ALAGESAN, D.; ALOCIJA; E. C. Chemiluminescence detection of *Escherichia coli* in fresh produce obtained from different sources. **Luminescence**, v. 19, p. 193-198, 2004.
- [15] GALLEP, C. M.; SANTOS, S. R. Photon-counts during germination of wheat (*triticum aestivum*) in wastewater sediment solutions correlated with seedling growth. **Seed Science & Technology**, v. 35, n. 3, p. 607-614, 2007.
- [16] SCOTT, R. Q.; USA, M.; INABA, H. Ultraweak emission imagery of mitosing soybeans. **Appl. Phys. B.**, v. 48, p. 183-138, 1989.
- [17] SCORDINO, A. *et al.* Influence of the presence of atrazine in water on the in-vivo delayed luminescence of *acetabularia acetabulum*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, p. 11-17, 1996.
- [18] RODA, A *et al.* Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 295-303, 2004.
- [19] KATSUMATA. M. *et al.* Rapid ecotoxicological bioassay using delayed fluorescence in the green alga *pseudokirchneriella subcapitata*. **Water Research**, v. 40, p. 3393-3400, 2006.
- [20] GURWITSH, A. A. A historical review of the problem of mitogenetic radiation. **Experientia**, v. 44, p. 545-550, 1988.
- [21] STREHLER, B. L.; ARNOLD, W. Light production by green plants. **The Journal of General Physiology**, v. 34, n. 6, p. 809-820, 1951.
- [22] COLLI, L.; FACCHINI, U. Light emission by germinating plants. **Nuovo Cimento**, v. 12, p. 150-155, 1954.
- [23] COLLI, L.; FACCHINI, U. Further measurements on the bioluminescence of the seedlings. **Experientia**, v. 11, p. 479-481, 1955.
- [24] FOX, M. **Quantum optics: an introduction**. Oxford: Oxford University Press Inc., 2006. 378 p.

- [25] POPP, F. A. Properties of biophotons and their theoretical implications. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 391-402, 2003.
- [26] SHEN, X.; LIU, F.; LI, X. Y. Experimental study of photocounts statistics of the ultraweak photon emission from some living organisms. **Experientia**, v. 49, n. 4, p. 291-295, 1993.
- [27] CHOI, C. *et al.* Biophotons emission from the hands. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 41, n. 2, p. 275-278, 2002.
- [28] JUNG, H. H. *et al.* Photon counting statistics analysis of biophotons from hands. **Ind. J. Exp. Biol.**, v. 41, p. 446-451, 2003.
- [29] MUSUMECI, F.; SCORDINO, A.; TRIGLIA, A.. Coherence and biophoton emission as investigated on acetabularia acetabulum. In: CHANG J. J.; FISCH, J.; POPP Fritz-Albert (Org.). **Biophotons**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 109-120.
- [30] POPP, F. A. About the coherence of biophotons. In: MACROSCOPIC QUANTUM COHERENCE, **Proceedings of an International Conference on the Boston University**, edited by Boston University and MIT, World Scientific 1999.
- [31] POPP, F. A.; CHANG, J. J. The physical background and the informational character of biophoton emission. In: CHANG J. J.; FISCH, J.; POPP F. A. (Org.). **Biophotons**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 239-250.
- [32] BAJPAI, R. P.; BAJPAI, P. K.; ROY, D. Ultraweak photon emission in germinating seeds: A signal of biological order. **Bioluminescence and Chemiluminescence**, v. 6, n. 4, p. 227-230, 1991.
- [33] CHEN, W. L. *et al.* Rapid determination of rice seed vigour by spontaneous chemiluminescence and singlet oxygen generation during early imbibitions. **Luminescence**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2003.
- [34] SUZUKI, S. *et al.* Two-dimensional imaging and counting of ultraweak light emission patterns from injured plant seedlings. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 9, n. 2, p. 211-217, 1991.
- [35] INABA, H. Photonic sensing technology is opening new frontiers in biophotonics. **Optical Review**, v. 4, n. 1A, p. 1-10, 1997.
- [36] KIM, J. *et al.* Spontaneous ultra-weak photon emission during the growth of the cell population of cultured hela cell line. **Journal of Health Science**, v. 53, n. 4, p. 481-485, 2007.

- [37] KIM, J. *et al.* Analysis of changes in the intensities of spontaneous ultraweak photon emission during the growth of the cell population of cultured hela cell line. In: WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING 2006. **IFMBE Proceedings**, v. 14, p. 3619-3622, 2007.
- [38] KIM, J. *et al.* Scanning spontaneous photon emission from transplanted ovarian tumor of mice using a photomultiplier tube. **Electromagnetic Biology and Medicine**, v. 25, n. 2, p. 97-102, 2006.
- [39] VAN-WIJK, R; KOBAYASHI, M.; VAN-WIJK. E. P. A. Anatomic characterization of human ultra-weak photon emission with a moveable photomultiplier and CCD imaging. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, n.1, p. 69-76, 2006.
- [40] JUNG, H. *et al.* Year-long biophoton measurements: normalized frequency count analysis and seasonal dependency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, p. 149-154, 2005.
- [41] QUICKENDEN, T. I.; QUE HEE, S. S. Weak luminescence from the yeast *saccharomyces cerevisiae* and the existence of mitogenetic radiation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 60, n. 2, p. 764-770, 1974.
- [42] QUICKENDEN, T. I.; QUE HEE, S. S. The spectral distribution of the luminescence emitted during growth of the yeast *saccharomyces cerevisiae* and its relationship to mitogenetic radiation. **Photobiochem Photobiology**, v. 23, p. 201-204, 1976.
- [43] VOGEL, R.; SÜSSMUTH, R. Interaction of bacterial cells with weak light emission from culture media. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 93-101, 1998.
- [44] TILBURY, R. N. The effect of stress factor on the spontaneous photon emission from microorganisms. **Experientia**, v. 48, p. 1030-1040, 1992.
- [45] NIKOLAEV, Y. A. Role of distant interactions in the regulation of the adhesion of *pseudomonas fluorescens* cells. **Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 291-295, 2000.
- [46] FELS, D. Cellular communication through light. **PLoS ONE**, v. 4, p. 18, 2009.
- [47] VOGEL, R.; GUO, X.; SÜSSMUTH, R. Chemiluminescence patterns from bacterial cultures undergoing bacteriophage induced mass lysis. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 46, n. 1, p. 59-64, 1998.

- [48] VOGEL, R.; SÜSSMUTH, R. A model for the generation of low level chemiluminescence from microbiological growth media and its depletion by bacterial cells. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 48, n. 2, p. 375-382, 1999.
- [49] VOGEL, R.; SÜSSMUTH, R. Weak light emission patterns from lactic acid bacteria. **Luminescence**, v. 14, n. 2, p. 99-105, 1999.
- [50] EISBERG, R.; RESNICK, R. **Quantum physics of atoms, molecules, solids, nuclei and particles**. New York: John Wiley and Sons, Inc., 1974. 713 p.
- [51] HOBBIIE, R. K.; ROTH, B. J. Atoms and Light. In: **Intermediate Physics for Medicine and Biology**. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2007. p. 372-376.
- [52] EDITORIAL COMMITTEE HAMAMATSU PHOTONICS K. K. **Photomultiplier tubes, basics and applications, 3^o edition**. Technical report. Japan, 2007. 323 p.
- [53] SLAWINSKA, D.; SLAWINSKI, J. Biological chemiluminescence. **Photochemistry and Photobiology**, v. 37, n. 6, p. 709-715, 1983.
- [54] DOTTA, B. T. *et al.* Biophoton emissions from cell cultures: biochemical evidence for the plasma membrane as the primary source. **Gen Physiol Biophys.**, v. 30, n. 3, p. 301-309, 2011.
- [55] CHEN, W. L.; XING, D.; VAN-WIJK, R. Chemiluminescence during rice seed imbibitions at different temperatures. **Luminescence**, v. 21, n. 1, p. 31-35, 2006.
- [56] MAKINO, T. *et al.* Ultraweak luminescence generated by sweet potato and fusarium oxysporum interactions associated with a defense response. **Photobiochem Photobiology**, v. 64, n. 6, p. 953-956, 1996.
- [57] ZHURAVLEV, A. I. Ultraweak luminescence in biology. **Trans. Moscow Soc. Naturalists**, v. 39, 1972.
- [58] POPP, F. A. *et al.* Physical aspects of biophotons. **Experientia**, v. 44, n. 7, p. 576-585, 1988.
- [59] HEERING, W. Measuring weak light signals not far from noise-level. In: CHANG J. J.; FISCH, J.; POPP Fritz-Albert (Org.). **Biophotons**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 143-157.
- [60] GALL, D.; FISH, J.; NOLTE, R.; WALKLING, A. Measurement of low-level light emission under labconditions. In: CHANG J. J.; FISCH, J.; POPP Fritz-Albert (Org.). **Biophotons**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 159-181.

- [61] EDITORIAL COMMITTEE HAMAMATSU PHOTONICS K. K. **Photon counting using photomultiplier tubes**. Technical report. Japan, 2001.
- [62] HAMAMATSU PHOTONICS K. K. **Photomultiplier tube modules**. Technical report. Japan, 2012, 76 p.
- [63] EDITORIAL COMMITTEE HAMAMATSU PHOTONICS K. K. **C8855 counting unit instruction manual**. Technical report. Japan, 2002, 23 p.
- [64] SOUZA FILHO, E. R. **Controlador de temperatura PID digital e aquisição de dados para protótipo laboratorial**. 2010. Trabalho de diplomação, Faculdade de Tecnologia, Unicamp, Limeira, 2010.
- [65] GALLEP, C. M.; SANTOS A. M. O.; CONFORTI E. Low-cost, simplified systems for photon counting measurements in biological samples. In: INTERNATIONAL MICROWAVE AND OPTOELECTRONICS CONFERENCE, IMOC. **Anais**, 2005, Brasília.
- [66] APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Technical report. Washington, 1999, 46 p.
- [67] PIMENTEL, D. *et al.* Water resources: agriculture, the environment, and society. **BioScience**, v. 47, n. 97, p.97-106, 1997.
- [68] OECD/OCDE. **Guideline for testing chemicals 208. terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test**. Technical report. Paris, 2006. 21 p.
- [69] CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**, princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2007. 255 p.
- [70] HADLEY, C. What doesn't kill you makes you stronger. **European molecular biology organization reports**, v. 4, n. 10, p.924-926, 2003.
- [71] MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 1, p.17, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Diagramas em blocos do programa em LabVIEW

A.1 Estados da máquina de estados

A estrutura da máquina de estados pode ser vista na Figura A.1, onde se pode ver que os estados da máquina de estados são: *Inic*, *Event*, *Start* e *End*.

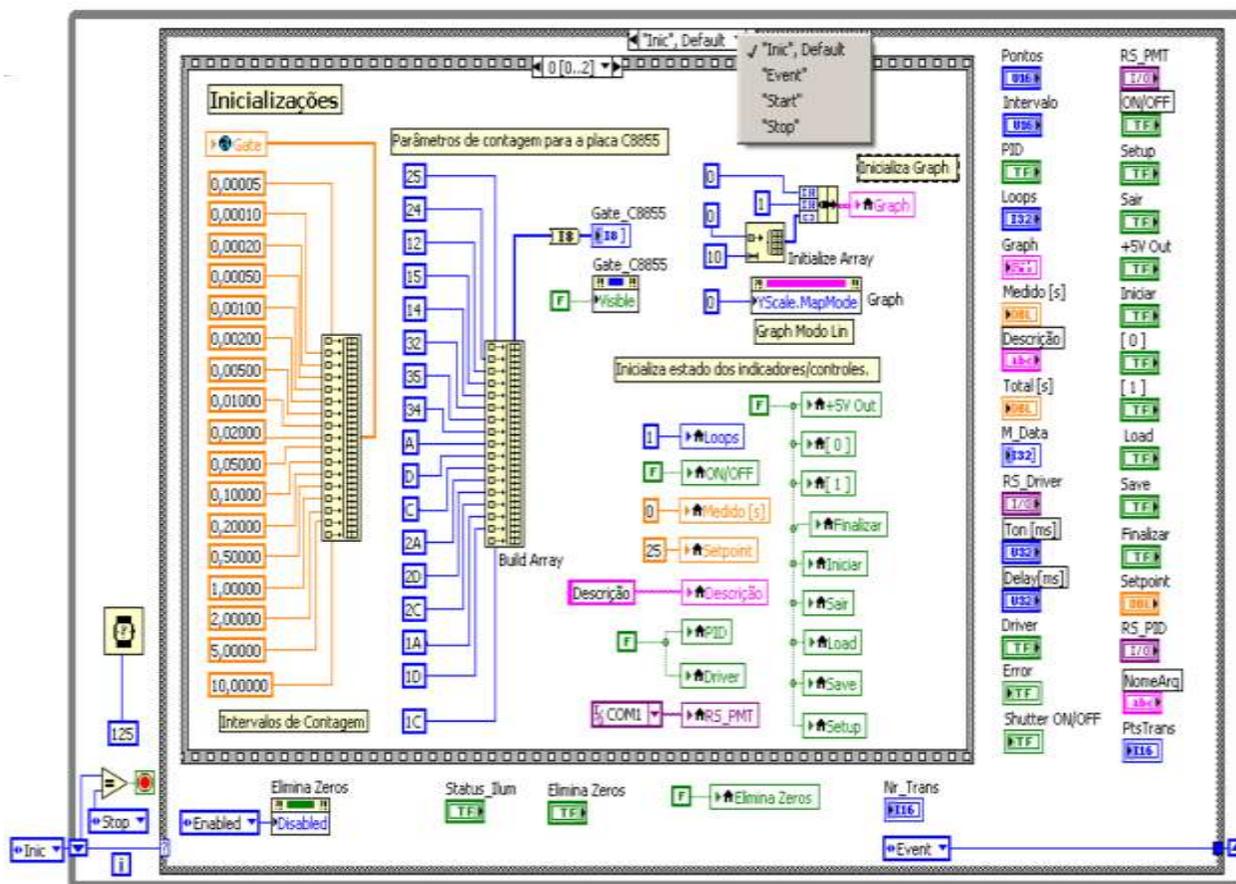


Figura A.1 – Máquina de estados do VI no estado *Inic*, quadro 0.

A.1.1 Estado *Inic* quadro 0

A Figura A.2 mostra o quadro 0/2 da *Stacked Sequence* que compõe o estado *Inic*. Neste quadro são feitas inicializações gerais, tais como: definição dos valores para os intervalos de con-

tagem (à esquerda), inicialização de vários controles do painel frontal, e colocação de uma linha horizontal em zero na tela gráfica. Ainda são inicializados valores associados aos intervalos de contagem usados pelo *firmware* da placa de contagem na programação de sua operação.

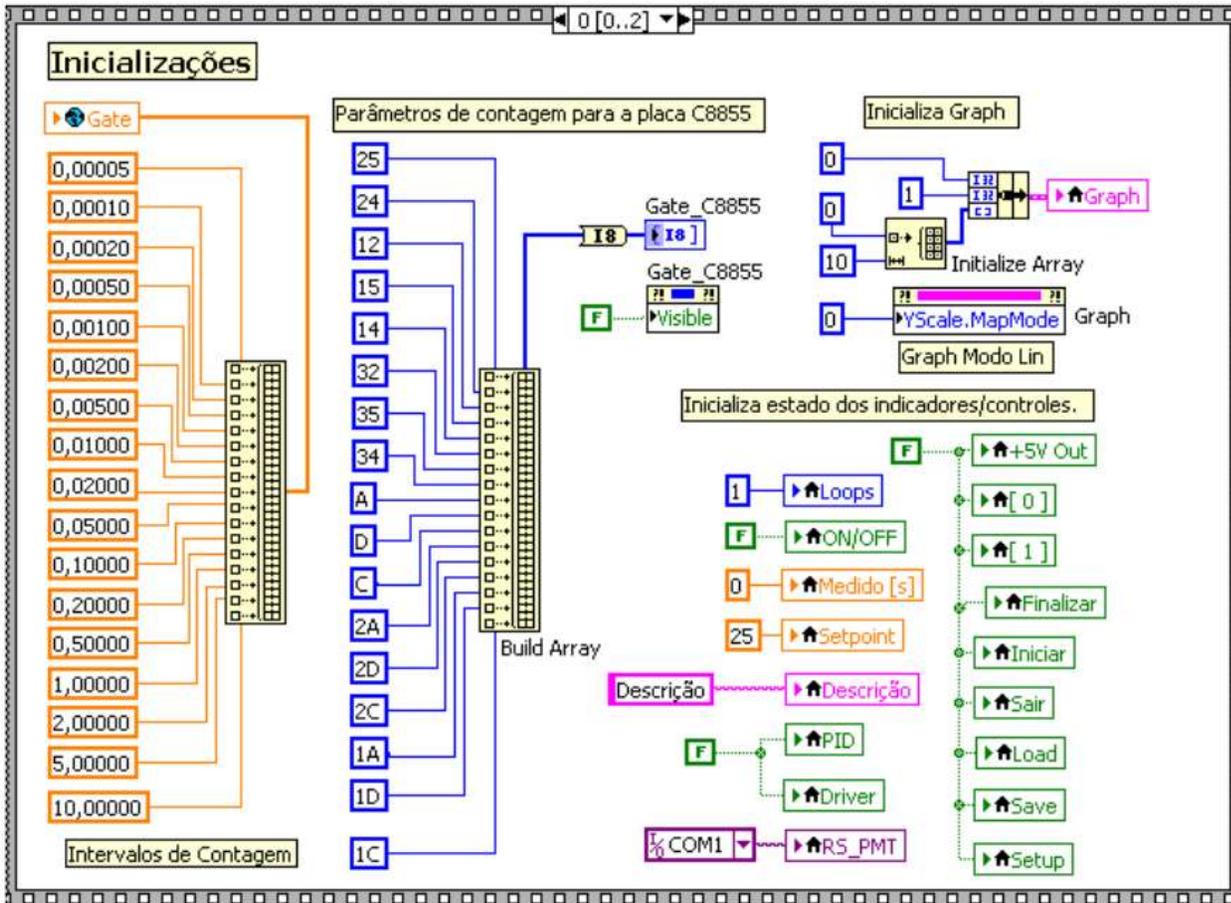


Figura A.2 – Estado *Inic* da máquina de estados, quadro 0.

A.1.2 Estado *Inic* quadro 1

A Figura A.3 mostra o quadro 1 do estado *Inic*, onde a placa de contagem USB é inicializada, assim como controles e indicadores do painel frontal.

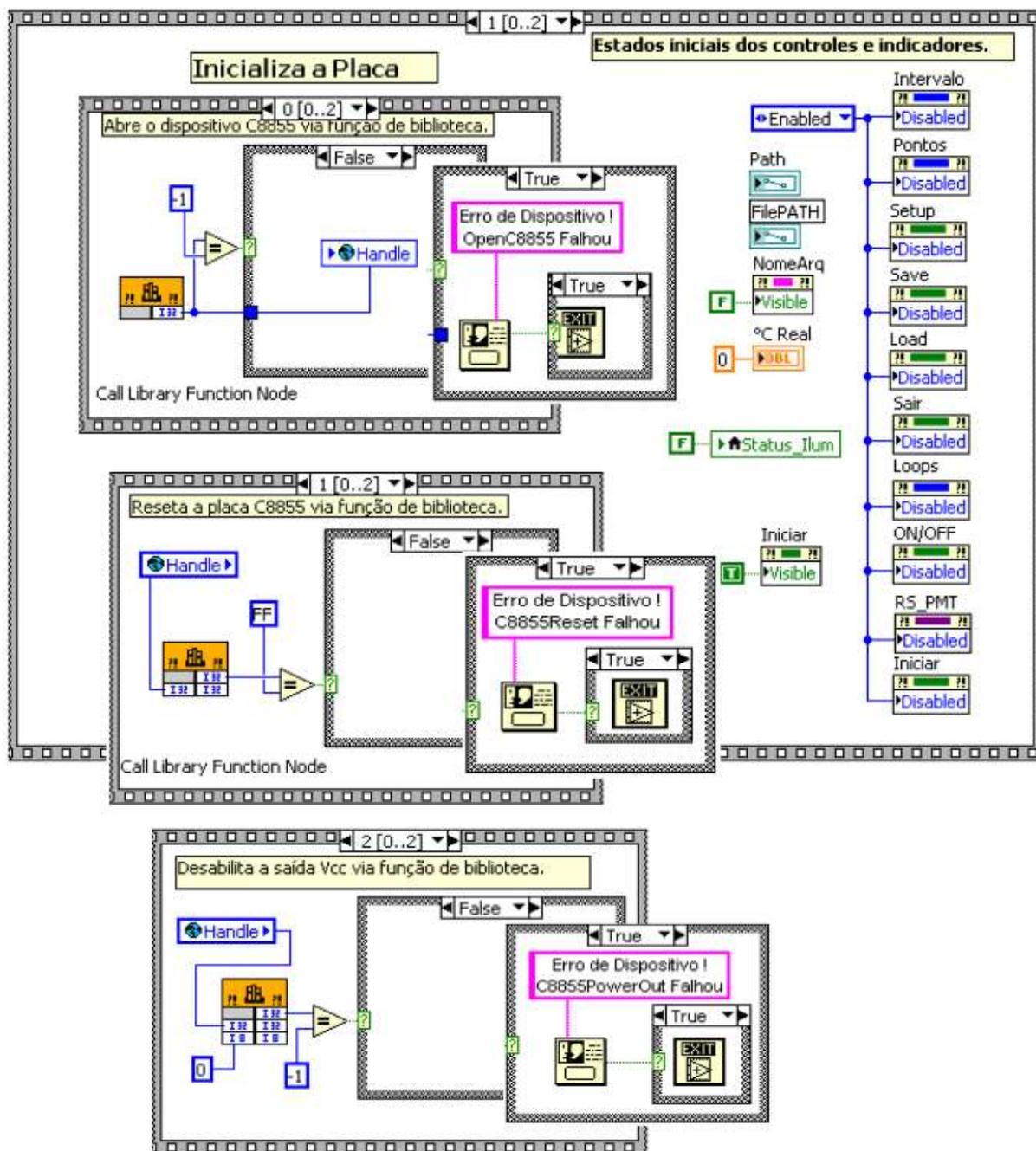


Figura A.3 – Estado *Inic* da máquina de estados, quadro 1.

A.1.3 Estado *Inic* quadro 2

A Figura A.4 mostra o quadro 2 do estado *Inic*, onde o arquivo de inicialização é lido para carregar os controles e indicadores com os valores usados pela última vez. Além disto, a fonte de

alimentação é desligada, caso já esteja ligada. Por fim, as condições de vários controles e indicadores são inicializados.

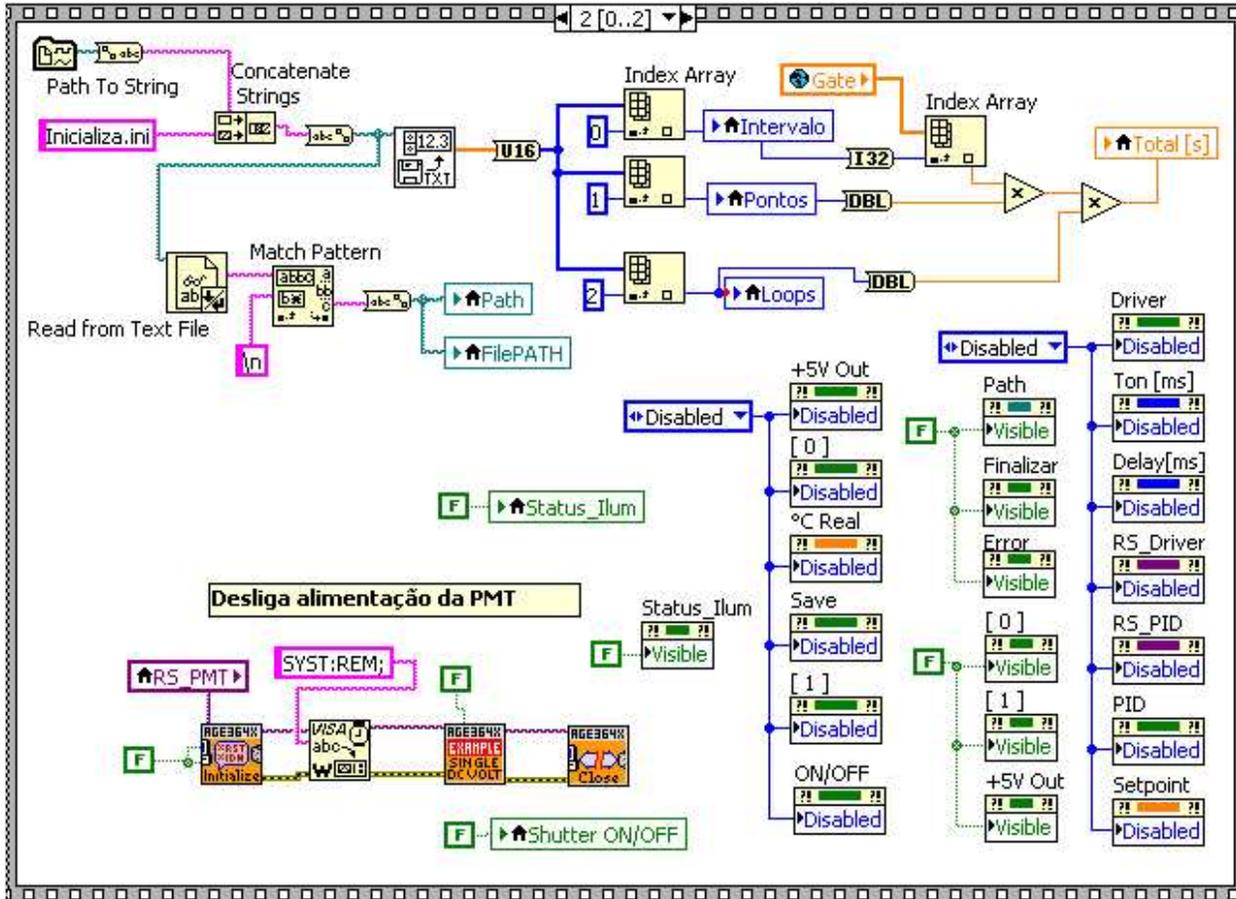


Figura A.4 – Estado *Inic* da máquina de estados, quadro 2.

A.1.4 Estado *Event* da máquina de estados

Na Figura A.5 pode-se ver a estrutura de eventos associada ao estado *Event* da máquina de estados, onde a lista dos eventos controlados está mostrada, que são os seguintes:

- **Loops, Intervalos, Pontos** - permite ao usuário ajustar o período de aquisição através do número de repetições (*Loops*) da aquisição de um número de valores (*Pontos*) de contagem totalizados a cada intervalo de tempo (*Intervalo*);

- **Setup** - permite seleccionar o diretório de destino de dados, habilitar/desabilitar o controlador de temperatura e o iluminador;
- **ON/OFF** - permite acionar/desacionar a alimentação em +5Vcc da PMT pela fonte Agilent via interface serial padrão RS232;
- **PID** - permite habilitar/desabilitar o controlador PID de temperatura via interface serial padrão RS232;
- **Descrição** - usado para designar um nome ao arquivo de dados a ser salvo automaticamente de forma incremental a cada Loop;
- **Iniciar** - permite ao usuário iniciar a aquisição de dados;
- **Load** - permite ao usuário carregar um arquivo de dados na tela do painel frontal da VI;
- **Save** - permite ao usuário salvar um arquivo de dados;
- **Sair** - permite ao usuário encerrar o programa.

A.1.4.1 Evento *Loops, Pontos, Intervalo*

No diagrama em blocos da Figura A.5 é executado o cálculo do tempo total de aquisição em função dos dados de entrada nas variáveis *Pontos, Intervalo e Loops* quando o usuário atuar num destes controles. Estes dados são também salvos no arquivo texto de inicialização *Inicializa.ini*.

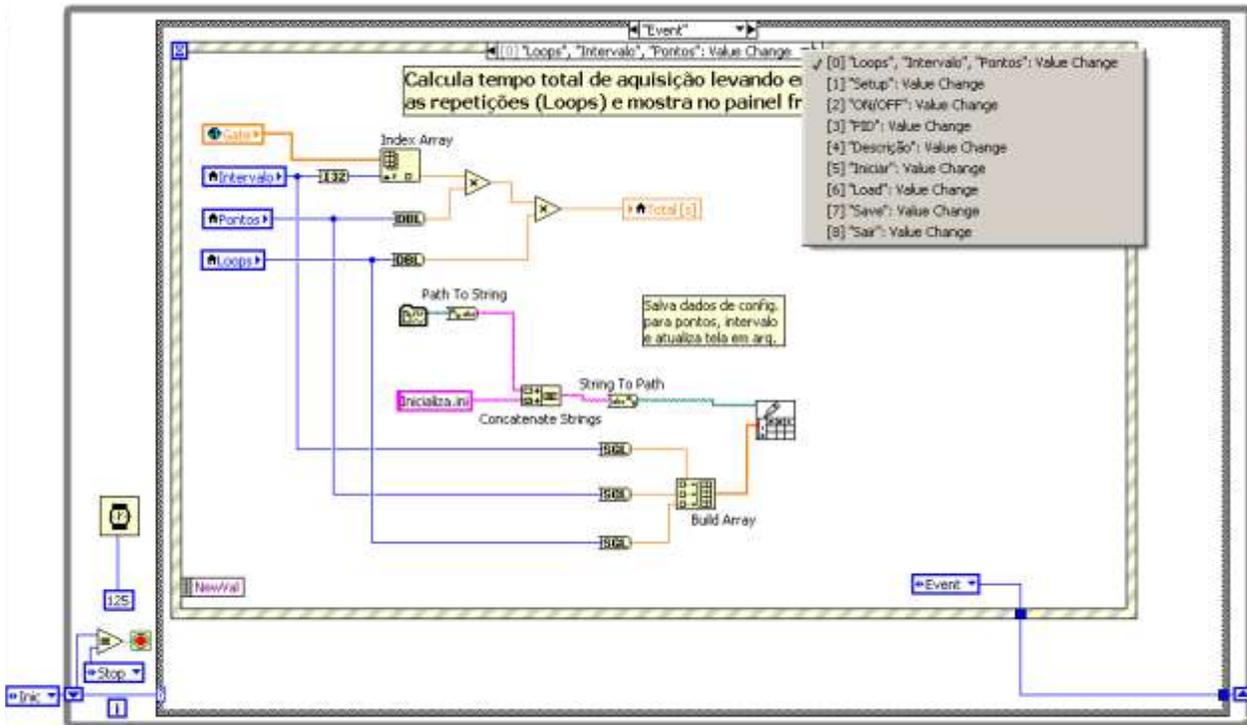


Figura A.5 – Estado *Event* no evento *Loops, Pontos, Intervalo*.

A.1.4.2 Evento *Setup*

No diagrama em blocos da Figura A.6 pode-se observar a estrutura do evento *Setup*. Este é constituído de uma estrutura do tipo *Stacked Sequence*, composta de 3 quadros, sendo o quadro 0 para a opção de definição do diretório destino dos dados, mostrado nesta Figura A.6.

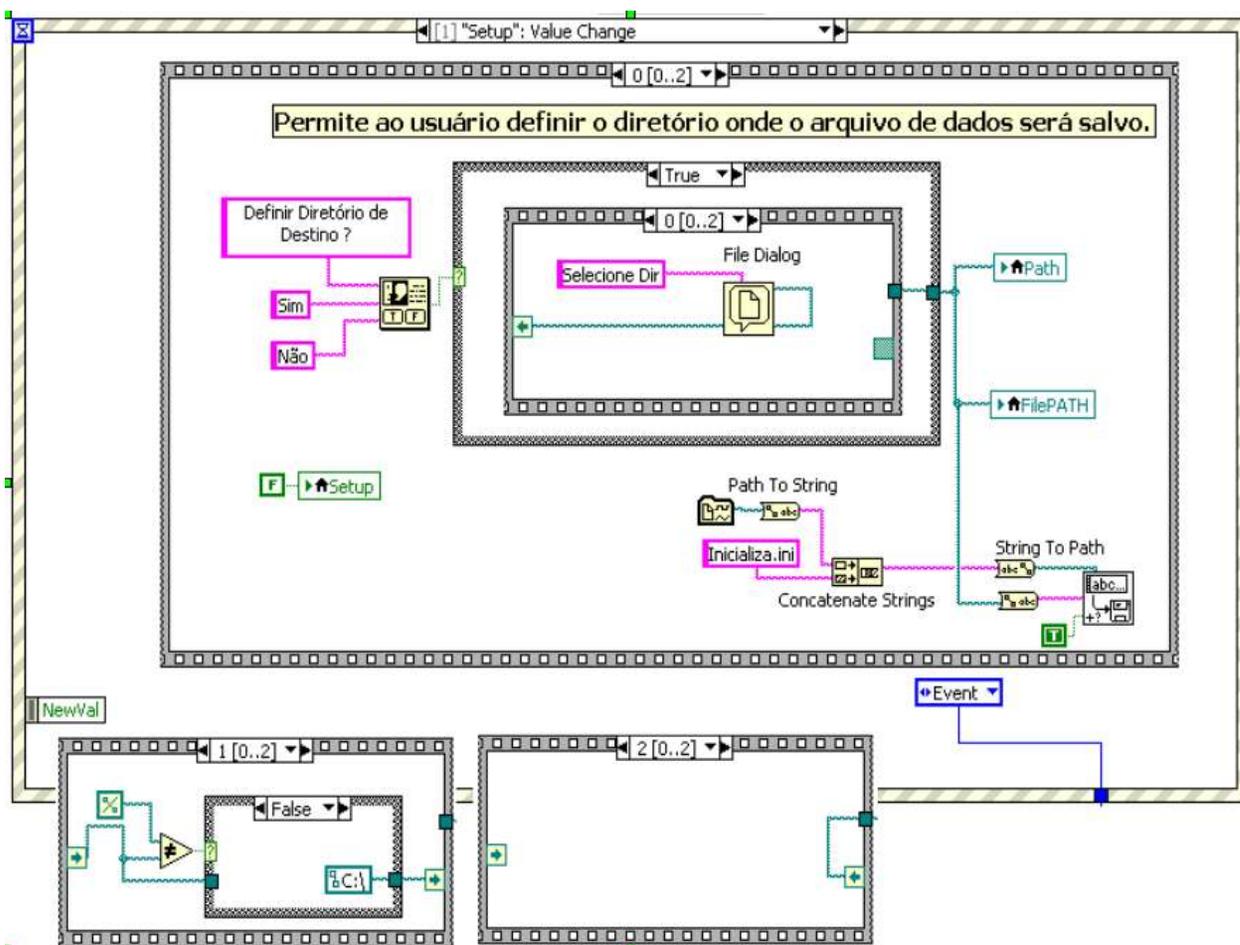


Figura A.6 – Estado *Event* no quadro 0 do evento *Setup*.

Os quadros 1 e 2 da estrutura *Stacked Sequence* do evento *Setup*, estão mostrados na Figura A.7. Nestes quadros estão as seguintes opções oferecidas ao usuário:

1. Habilitar/desabilitar o iluminador no quadro 1;
2. Habilitar/desabilitar o controlador PID de temperatura no quadro 2.

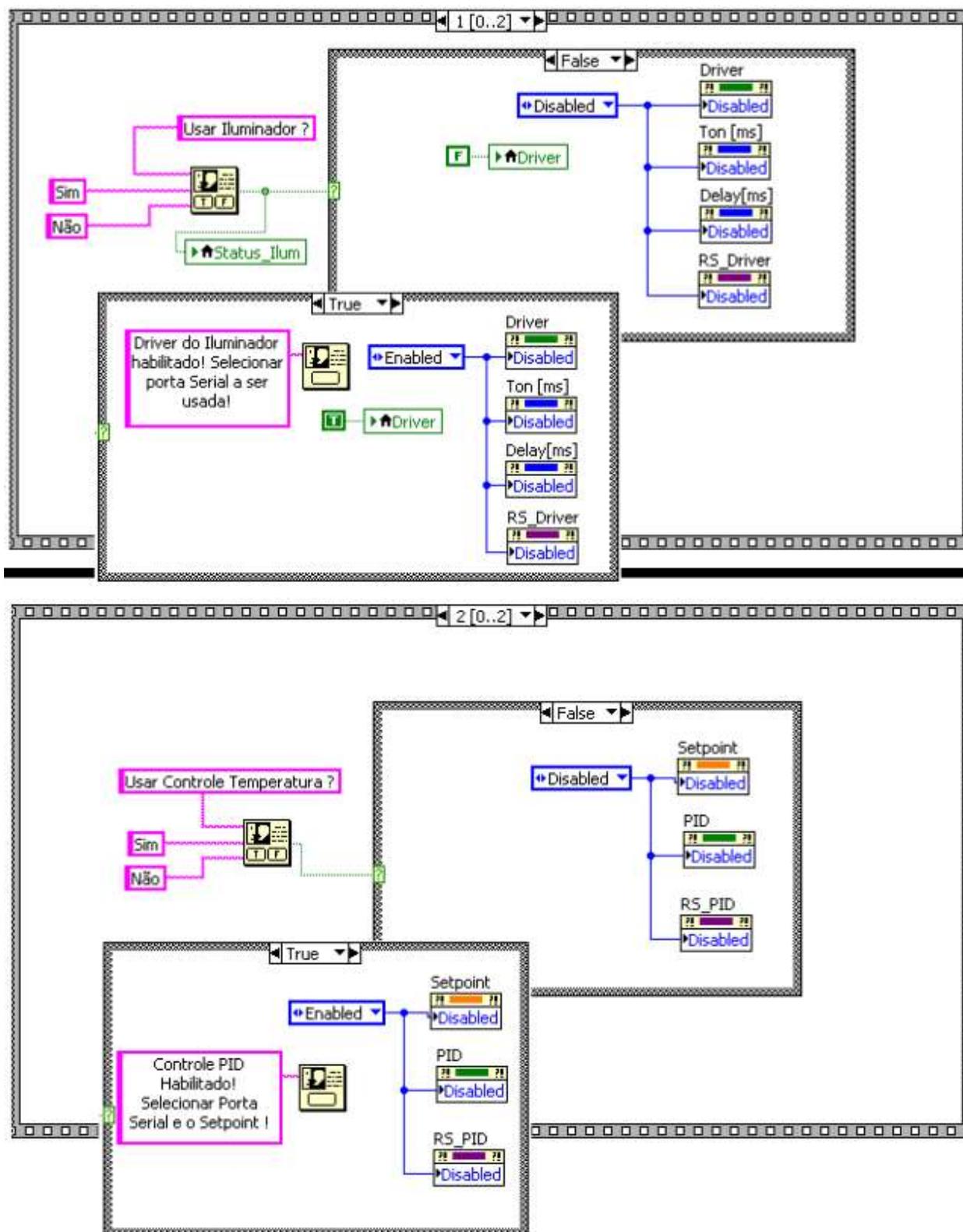


Figura A.7 – Evento Setup, quadros 1 e 2.

A.1.4.3 Evento *ON/OFF*

No diagrama em blocos da Figura A.8, a seguir, pode-se ver a estrutura que permite acionar e desacionar a alimentação do módulo PMT através de uma fonte de alimentação controlada, através de uma interface RS232.

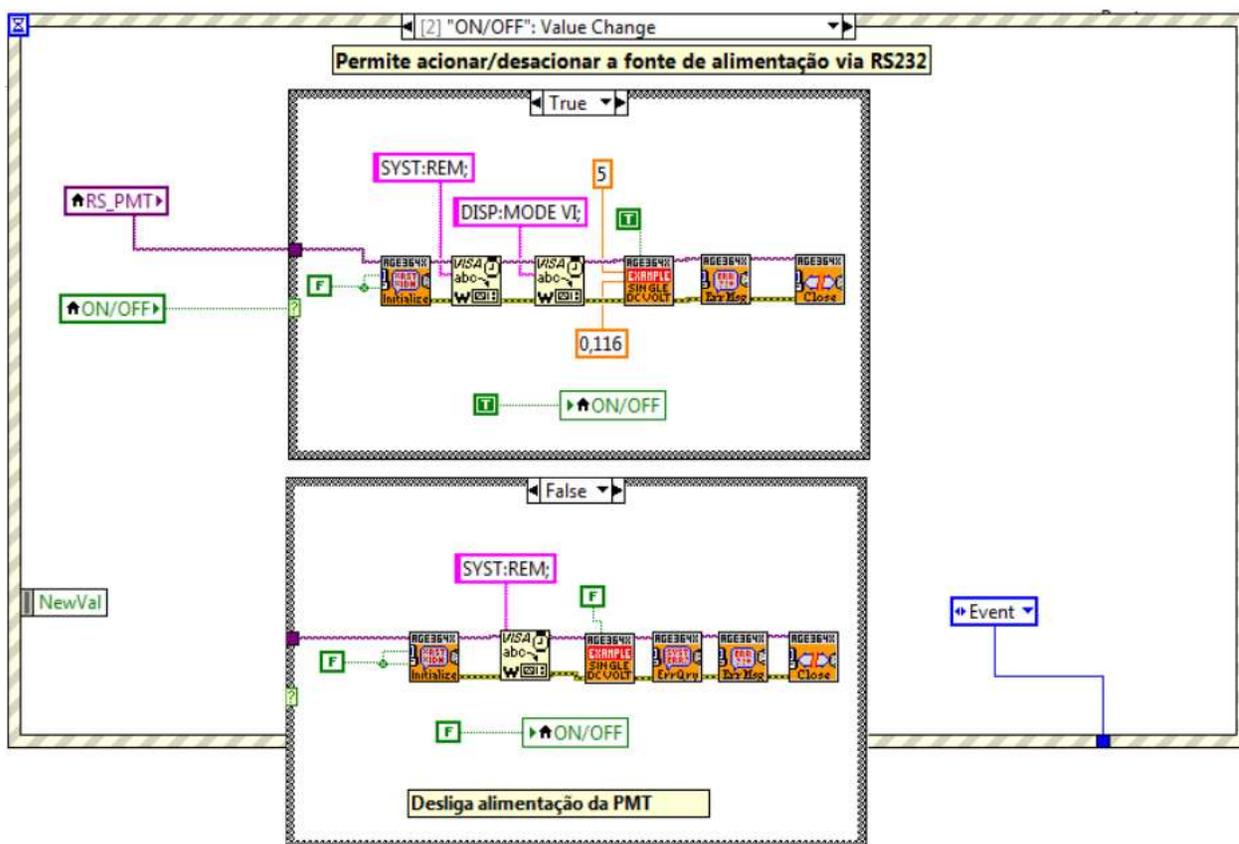


Figura A.8 – Evento *ON/OFF*.

A.1.4.4 Evento *PID*

No diagrama em blocos da Figura A.9, a seguir, pode-se ver a estrutura que permite acionar o controlador PID de temperatura. A figura mostra a sequência que envia o *Setpoint* para o controlador via RS232 onde, após o canal serial ter sido configurado com 9600 bps, 8 bits, sem paridade, que são as opções default do bloco *VISA Configure Serial Port*, um *handshaking* sim-

ples é implementado. Neste, o programa envia um caracter “a” ao controlador de temperatura, e este ao receber este caracter entende como sendo uma solicitação para envio do *setpoint* de temperatura; então o controlador responde através de um caracter “b”, indicando a disponibilidade para receber os *bytes* correspondentes ao *Setpoint*.

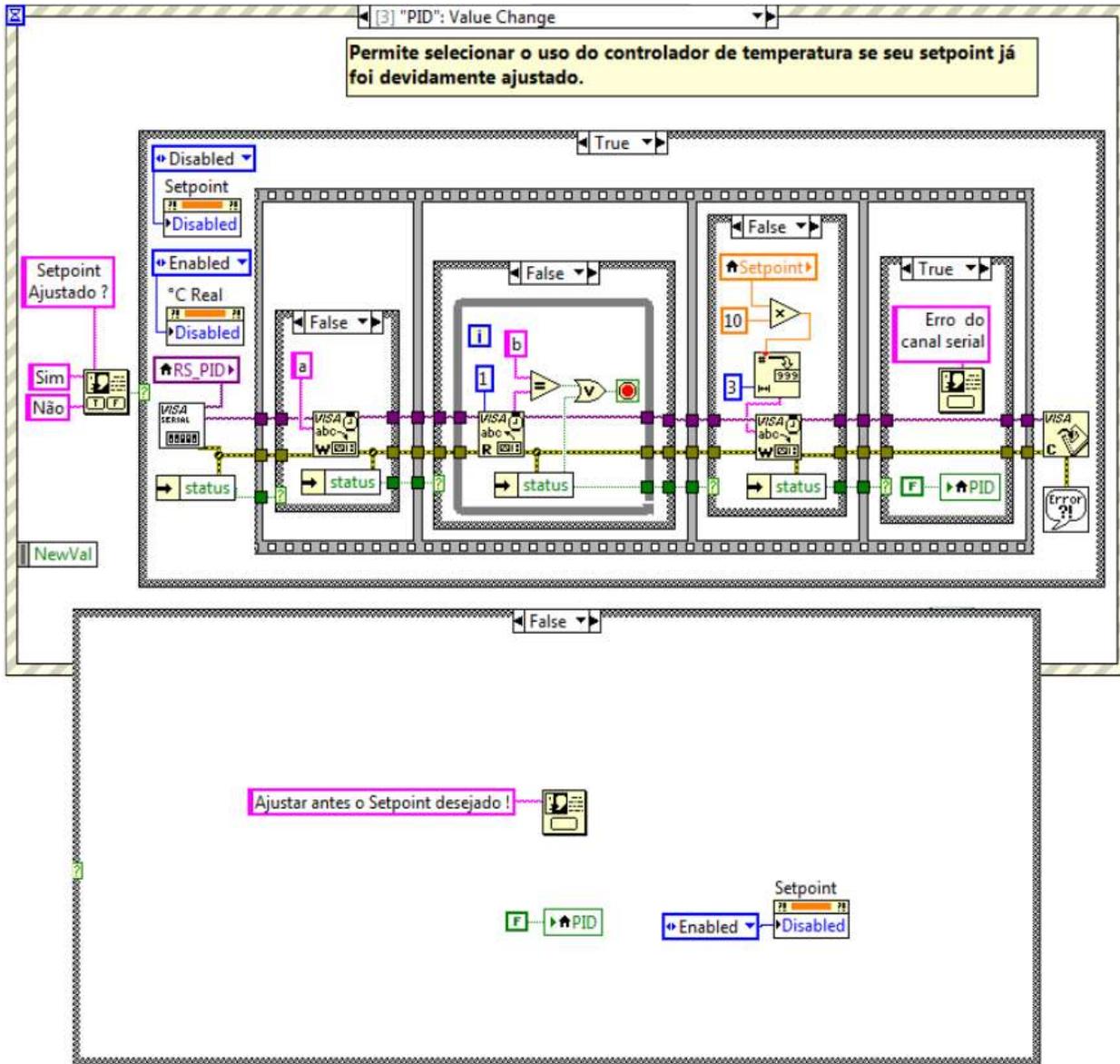


Figura A.9 – Evento PID.

A.1.4.5 Evento *Descrição*

Na Figura A.10, a seguir, está mostrado o diagrama em blocos do evento associado ao campo para a entrada da descrição que será digitada pelo usuário e que irá compor o nome do arquivo a ser salvo com os dados da aquisição.

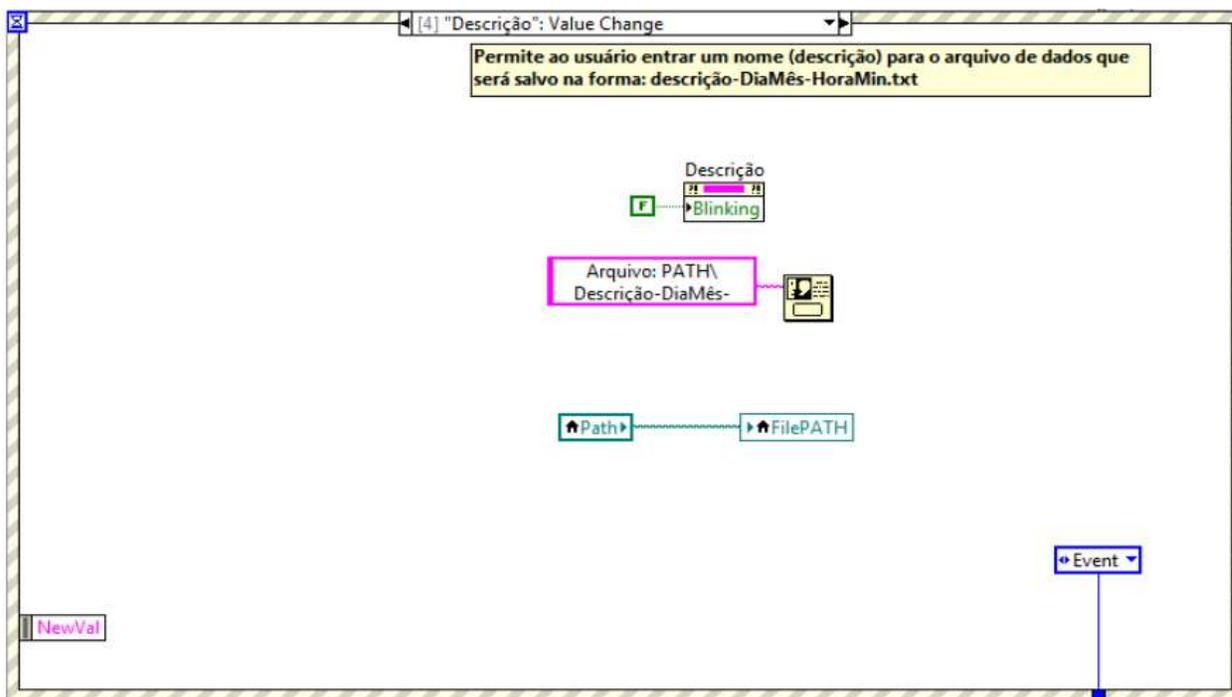


Figura A.10 – Evento *Descrição*.

A.1.4.6 Evento *Iniciar*

A Figura A.11 mostra o diagrama em blocos do evento da tecla *Iniciar* na qual tem início o processo de aquisição, caso na caixa de diálogo mostrada seja escolhido *Sim*.

No quadro 1 da sequência mostrada na Figura A.11 há uma chamada a uma função de biblioteca de vínculo dinâmico da biblioteca *C8855api.dll*; no caso a função chamada é a *C8855Setup*, que inicializa a placa C8855 antes do início da aquisição. Há ainda, uma estrutura *Case* que determina o número de pontos por transferência que é o parâmetro *Number of Gates* da função *C8855Setup*. Acima outra estrutura *Case* calcula o número de transferências a serem exe-

cutadas a partir do número de pontos a serem adquiridos, e do número de pontos por transferência. O outro parâmetro da função *C8855Setup* é o modo de transferência (*Tans_SW*) podendo ser no modo *Single* ou *Block*, ou seja *byte a byte* ou transferência em blocos de 512 *bytes*.

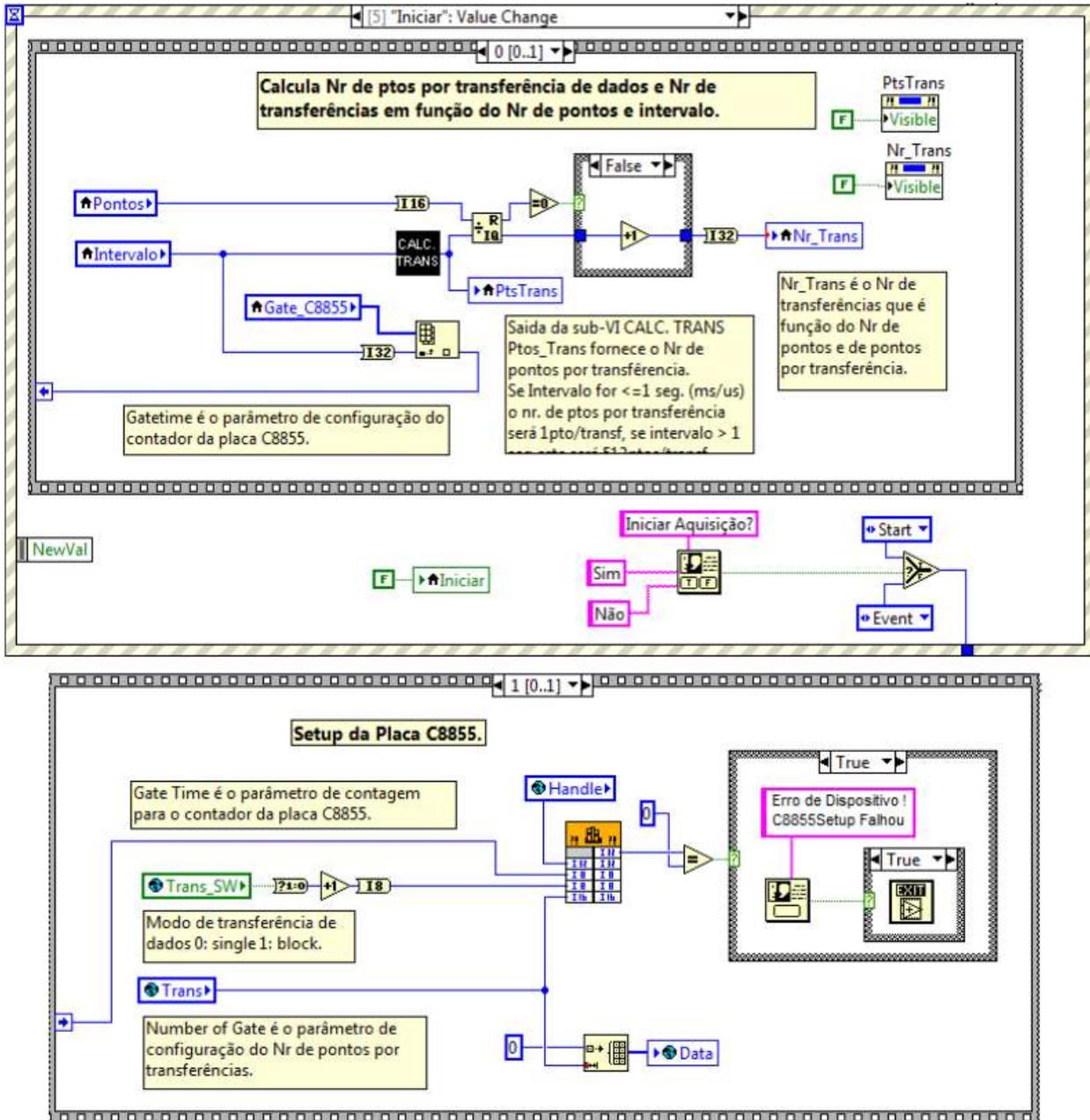


Figura A.11 – Evento Iniciar.

A.1.4.7 Evento *Load*

Na Figura A.12 vê-se o diagrama em blocos do evento relativo à carga de um arquivo de dados. Nesta figura pode-se observar a presença de uma *Stacked Sequence* de 5 quadros, todos eles ali mostrados.

No quadro 0 é mostrado a sub-VI *Read From Spreadsheet.vi* que mostrará uma caixa de diálogo solicitando ao usuário que localize o arquivo a ser carregado. Se a operação resultar correta, como saída esta sub-VI proverá um *array 2D* com os N pontos de dados das contagens feitas pela placa C8855, em que em uma coluna estão os instantes de tempo múltiplos do valor *Intervalo* e, na segunda coluna, os valores das contagens nestes intervalos de tempo. Em seguida este *array 2D* deverá ser transposto para que no quadro 1 este possa ser manipulado de modo a se determinar o valor N do número de pontos de dados, separar os dados de contagem gerando um *array 1D* e, então, no quadro 2 determinar o intervalo de tempo usado na aquisição. No quadro 3 desta sequência serão apresentados os N pontos de contagem no *Waveform Graph*, e no quadro 4 os campos dos indicadores do painel frontal *Pontos* e *Intervalo* serão atualizados com os valores relativos ao arquivo de dados carregado.

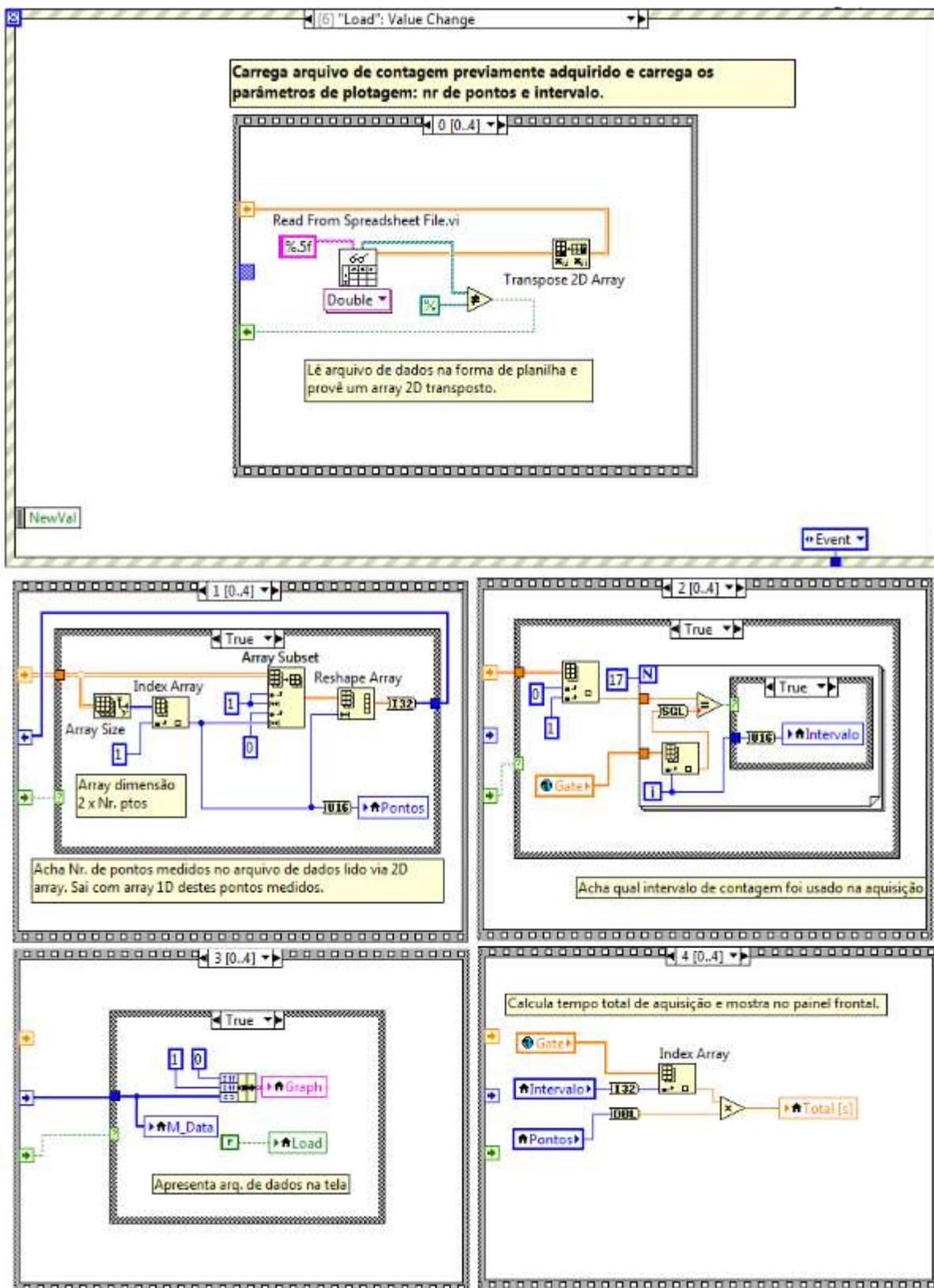


Figura A.12 – Evento Load.

A.1.4.8 Evento *Save*

Na Figura A.13 está mostrado o diagrama da estrutura do evento da tecla *Save*.

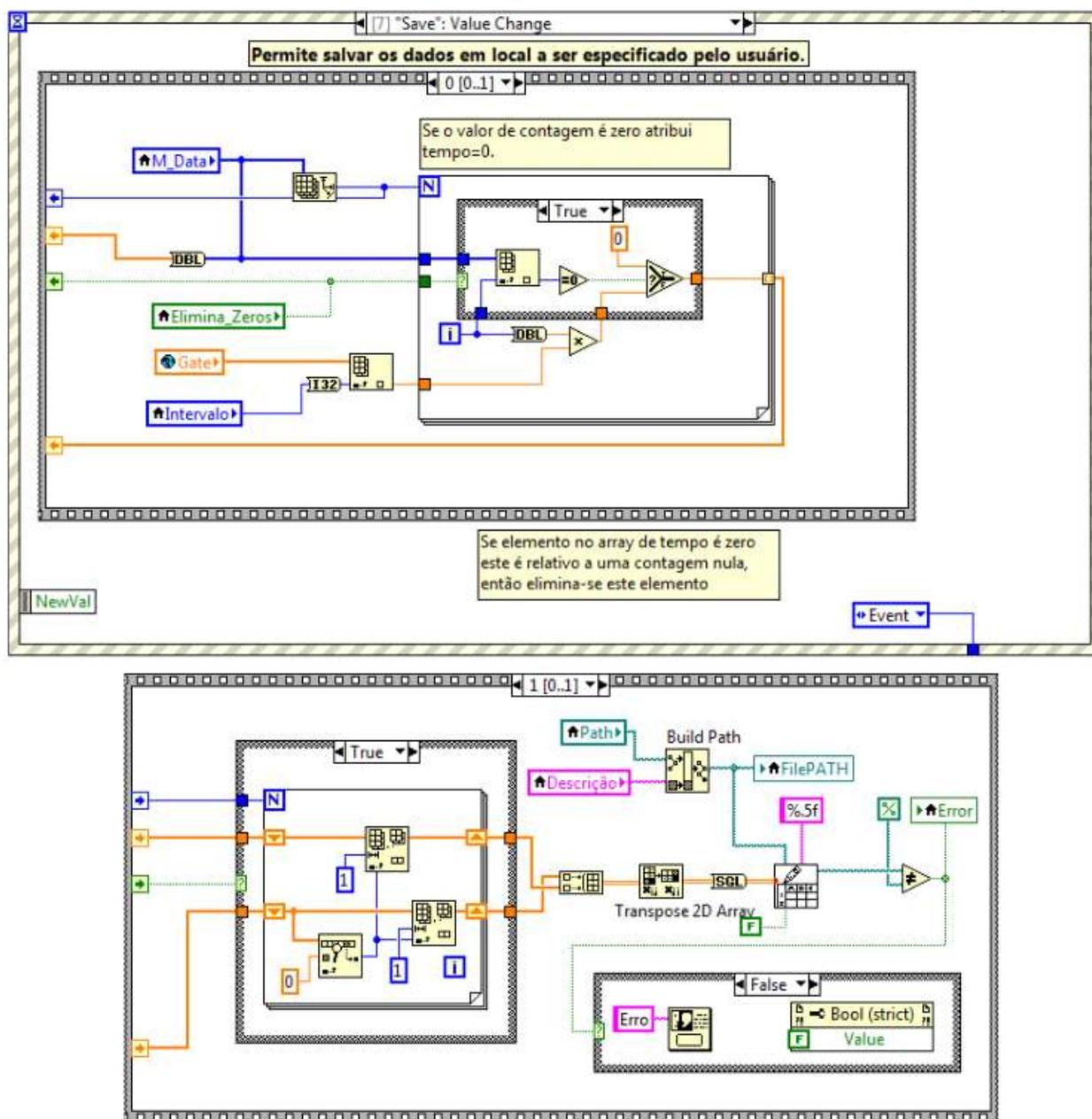


Figura A.13 – Evento *Save*.

Neste diagrama, no quadro 0 da sequência alí apresentada, caso a opção de eliminar contagens zeradas esteja habilitada, estas são retiradas do *array M_Data* onde os dados da aquisição estão guardados; em caso contrário, o *array* é mantido como está. No quadro 1 da sequência, através de uma estrutura de repetição, o arquivo de dados no formato texto é gerado na forma de um *array*. Em seguida, este *array* é salvo em um arquivo com nome montado pelo que foi digitado no campo *Descrição*, seguido da data de início da aquisição. Além disto, a localização do diretório do arquivo no disco é aquela que foi definida no evento *Setup*.

A.1.4.9 Evento Sair

Na Figura A.14 está mostrado o diagrama da estrutura do evento da tecla *Sair* para encerrar o programa. Neste, uma caixa de diálogo desvia o fluxo de dados para o estado *Fim* ou volta para *Eventos*, conforme a resposta seja *Sim* ou *Não*, respectivamente.

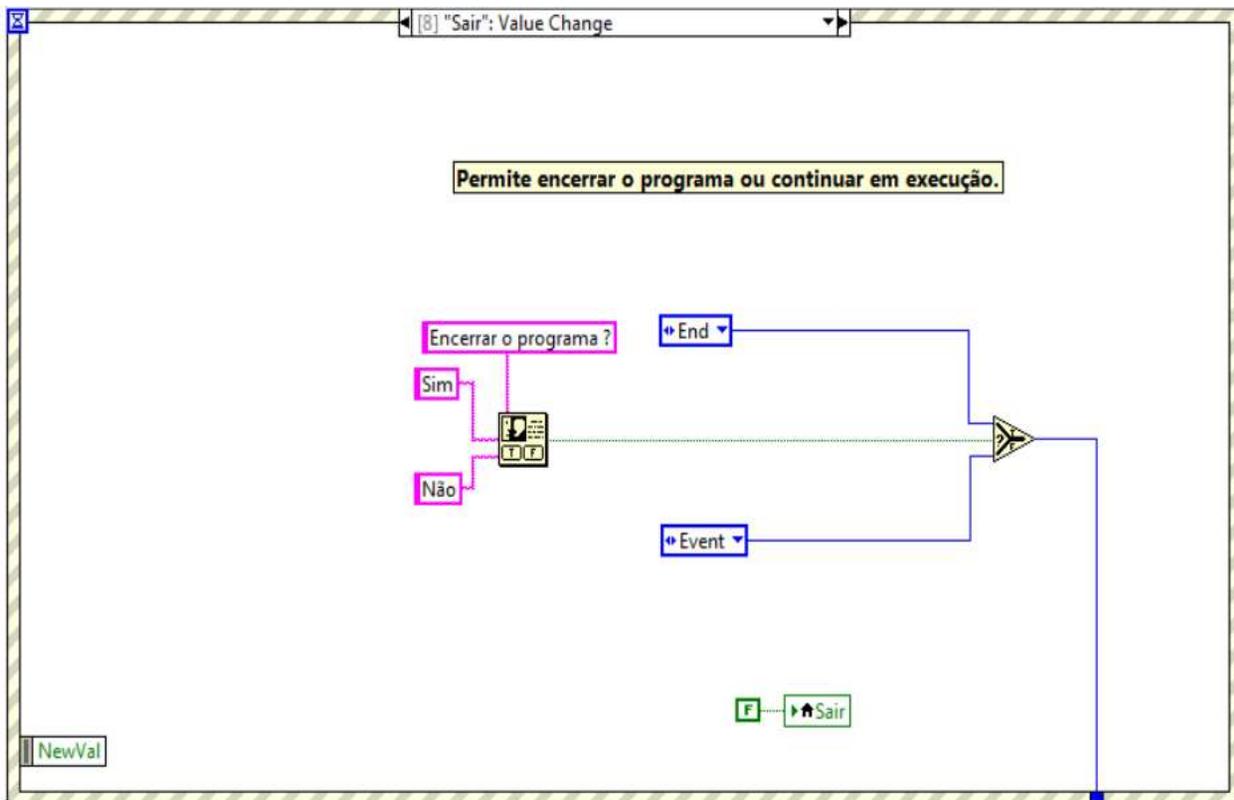


Figura A.14 – Evento *Sair*.

A.1.5 Estado *Start*

A Figura A.15, a seguir, mostra a estrutura do estado *Start*, onde tem início a aquisição dos dados das contagens de fótons.

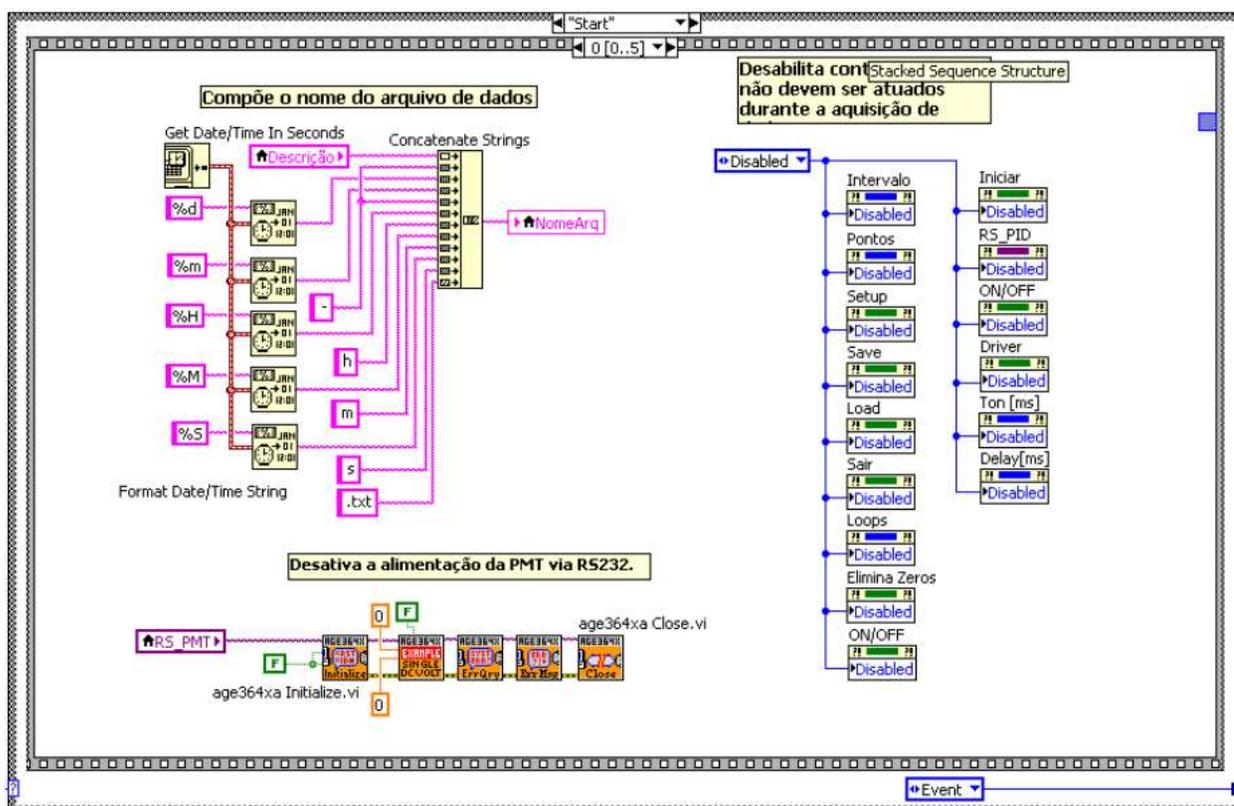


Figura A.15 – Estado *Start*, quadro 0.

Nesta Figura A.15 está mostrado o primeiro quadro da sequência de 6 quadros onde são desabilitados os controles que não devem ser atuados enquanto a aquisição de dados se processa. Além disto, o campo descrição entrado pelo usuário é concatenado pela função *Concatenate Strings* com as *strings* relativas ao dia, mês, hora e minuto, finalizando com a *string* de texto. As *strings* relativas ao dia/mês/hora/min são produzidos pela função *Get Date/Time In Seconds* e pela função *Format Date/Time String*.

Já na Figura A.16 está mostrado o quadro 1 da sequência do estado *Start* onde observa-se a presença de uma sequência com seis quadros, onde o *Driver* do *shutter* aciona o iluminador via RS232 por *Ton [ms]* e, então, o desliga, caso o *Driver* tenha sido previamente ativado no

Setup. Observe ainda que, após o iluminador ter sido desligado, decorre um atraso de tempo, dado por *Delay*, até o término da execução deste quadro.

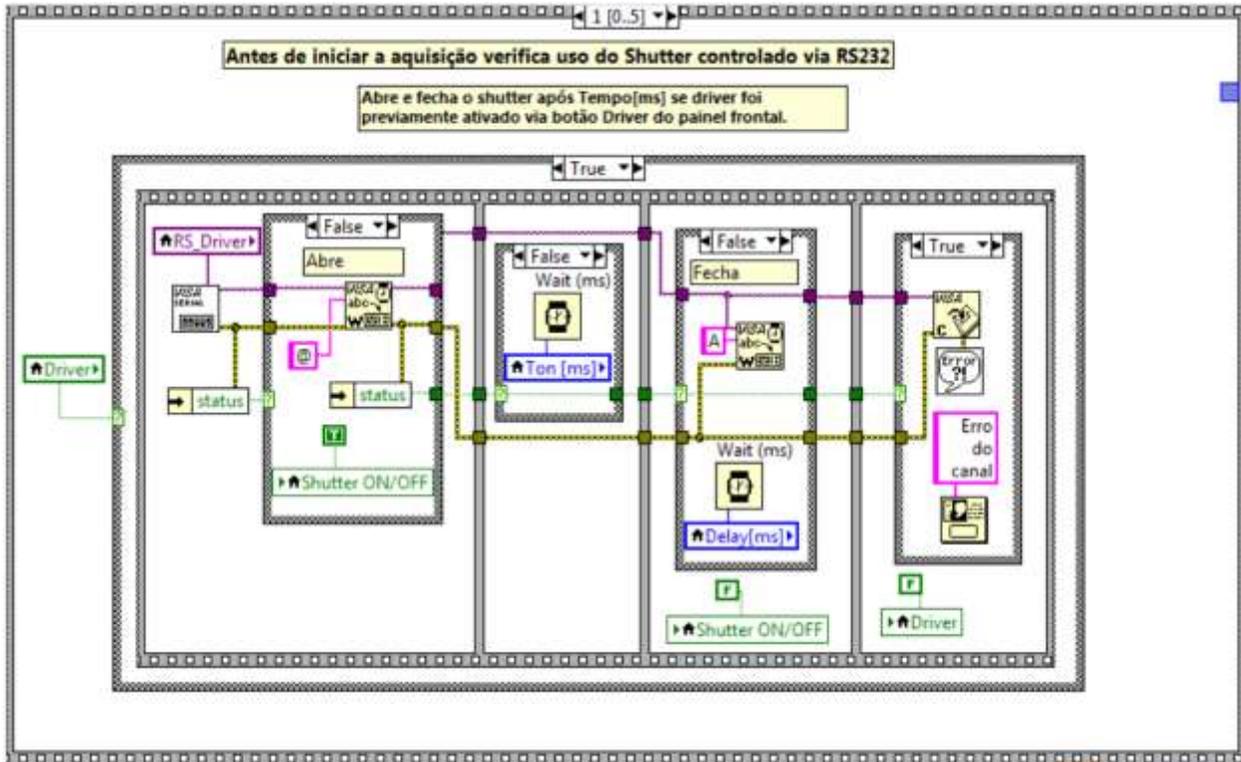


Figura A.16 – Estado *Start*, quadro 1.

No quadro 2 da sequência contida no estado *Start* mostrado na Figura A.17, a alimentação do módulo PMT em +5 V e 116 mA que é ativada através do envio de comandos à fonte de alimentação Agilent modelo E3640A controlada via interface RS232.

Ainda na Figura A.17 está mostrado o quadro 3 da sequência, onde uma chamada da função *C8855CountStart* da biblioteca de vínculo dinâmico *C8855api.dll* ocorre de modo a iniciar a contagem pela placa *C8855*. Além disto, neste mesmo quadro a tecla *Finaliza* se torna visível, tecla *Iniciar* oculta, e a paleta de controles do *Graph* do painel frontal fica invisível.

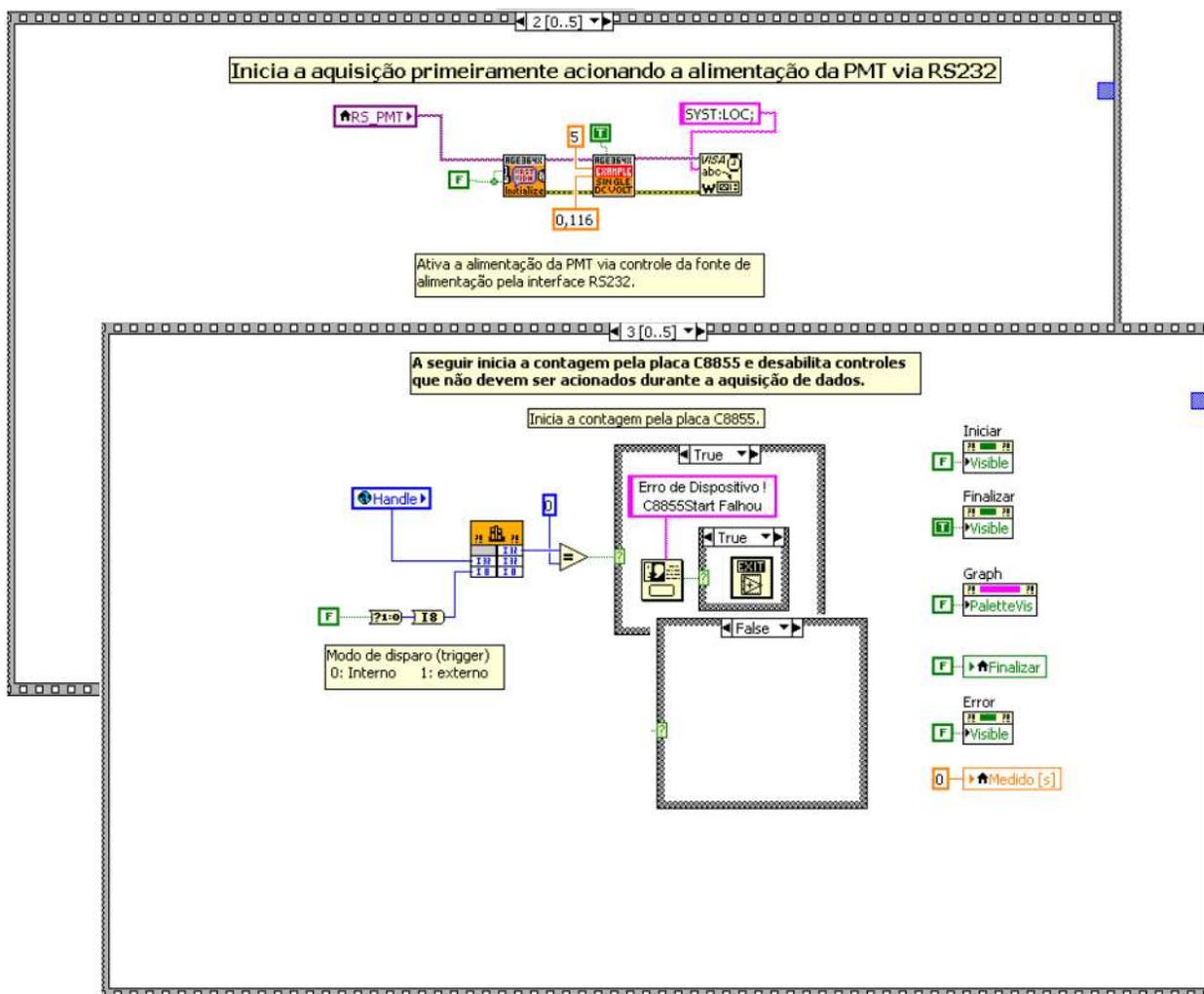


Figura A.17 – Estado *Start*, quadros 2 e 3.

O quadro 4 da sequência presente no estado *Start*, mostrado na Figura A.18, é onde efetivamente tem início a leitura dos N pontos definidos no controle *Pontos*, medidos a cada intervalo de tempo de contagem dado por *Intervalo* e com as repetições dada pelo controle *Loops*. Pode-se notar nesta figura a presença de uma estrutura de repetição *For-Loop* responsável pela repetição pelo valor *Loops* das N leituras, e internamente a esta um *stacked sequence* de 2 quadros, sendo que o quadro 0 mostrado é composto por um *While-Loop* onde as N leituras de dados são realizadas através da chamada da função de biblioteca de vínculo dinâmico *C8855Read*. Esta função de biblioteca lê os dados da memória da placa de contagem C8855 via USB. Observe ainda que o *While-Loop* será terminado ao final das transferências dos N pontos, ou por intervenção do usuário pelo controle *Finalizar* do painel frontal.

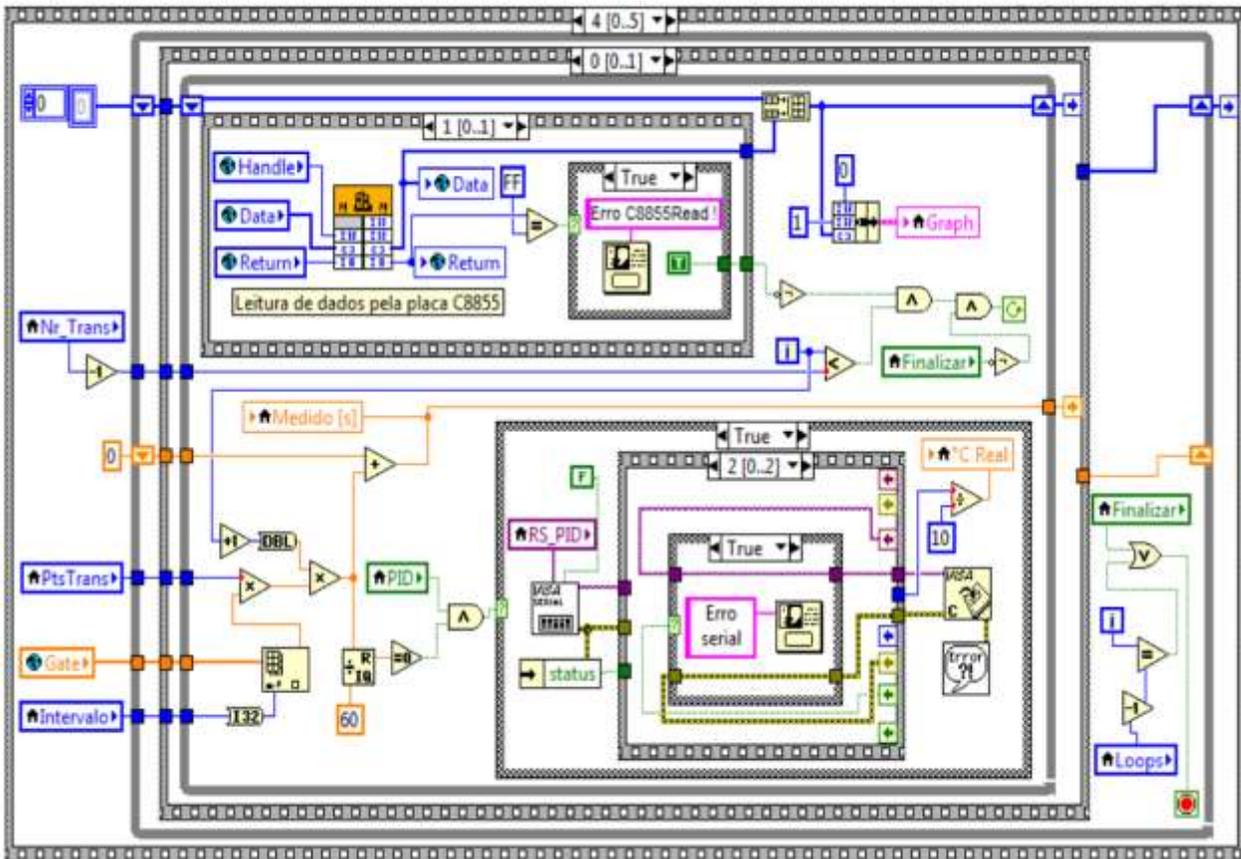


Figura A.18 – Estado *Start*, quadros 2 e 3.

Observe ainda que a cada 60 segundos a recepção serial é ativada na estrutura *Case* mostrada no canto inferior direito de modo a receber e informar no painel frontal a temperatura no interior da câmara escura recebida do controlador de temperatura. Para isto, um *handshaking* simples foi implementado para garantir o correto recebimento dos dados, o que pode ser visto nos 3 quadros da sequência interna da estrutura *Case*. O *handshaking* consta de um pedido de dados através do envio do caracter “s”, que sendo reconhecido pelo controlador PID envia o dado de temperatura na forma de 3 *bytes*, correspondendo aos 3 dígitos ASCII do valor desta temperatura. Como o valor dos 3 *bytes* está multiplicado por 10, já que o controlador de temperatura representará um valor com uma casa decimal sem o ponto, por exemplo 27,5 °C como 275, este valor é dividido por 10 no final da leitura dos dados, via RS232.

No quadro 1 da sequência interna ao *For-Loop*, mostrado na Figura A.19, é onde o processo de salvamento automático dos dados ocorre, com a possibilidade de se eliminar as contagens nulas ou não, dependendo da opção feita anteriormente no evento da tecla *Setup*, mostrado

antes. Além disto, como já discutido no item que descreveu o evento *Descrição*, esta descrição, especificada pelo usuário, comporá o nome do arquivo a ser salvo, juntamente com a data e hora de início da aquisição.

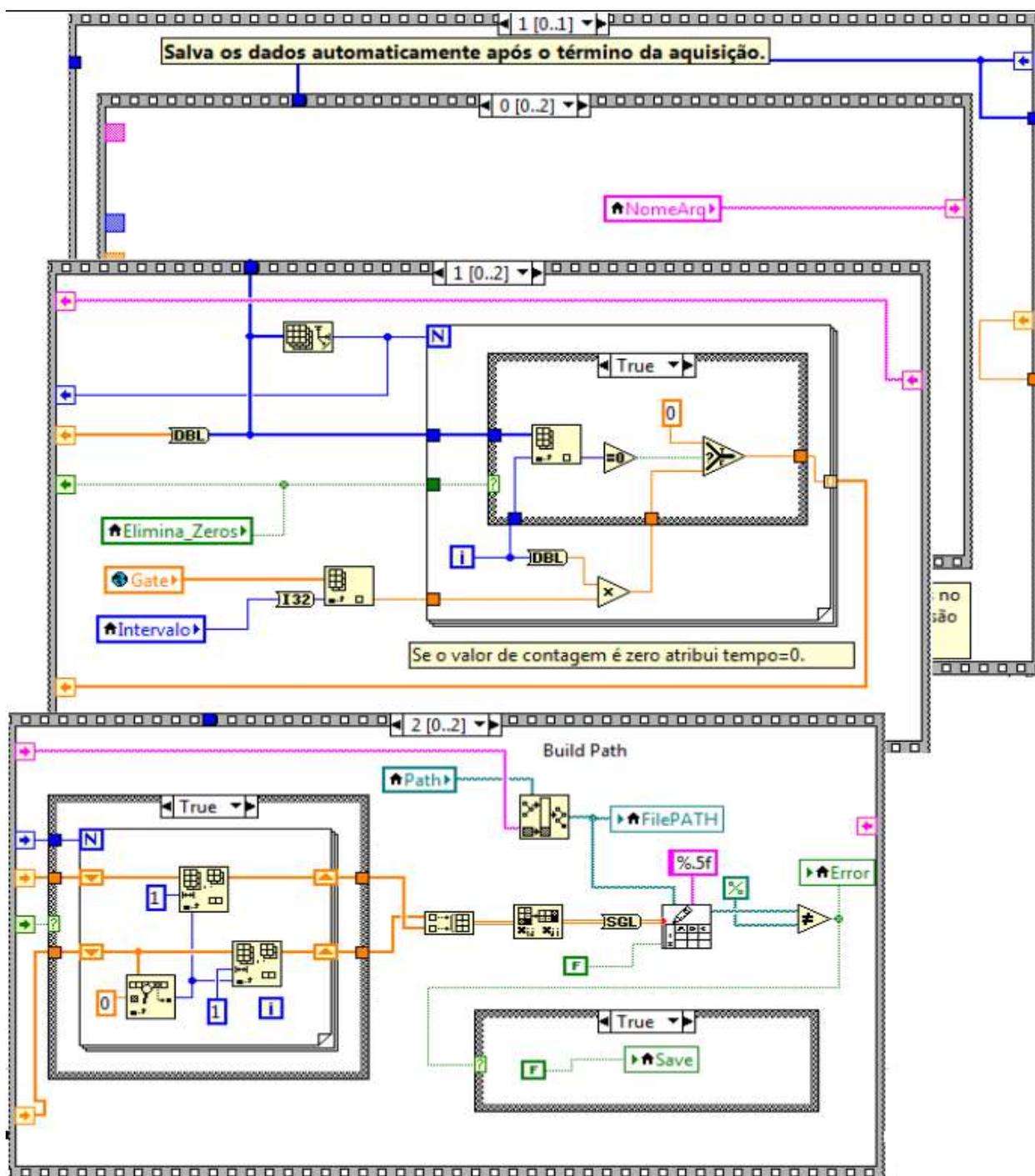


Figura A.19 – Quadro 1 da *stack sequence* interna ao *For-Loop* do quadro 4 do estado *Start*.

Finalmente, no quadro 4 mostrado na Figura A.20, é finalizada a aquisição, parando a contagem pela placa C8855 através da chamada à função de biblioteca de vínculo dinâmico *C8855Stop*, mostrando os *N* pontos multiplicados por *Loops*, e habilitando novamente os controles desabilitados por ocasião do início da aquisição.

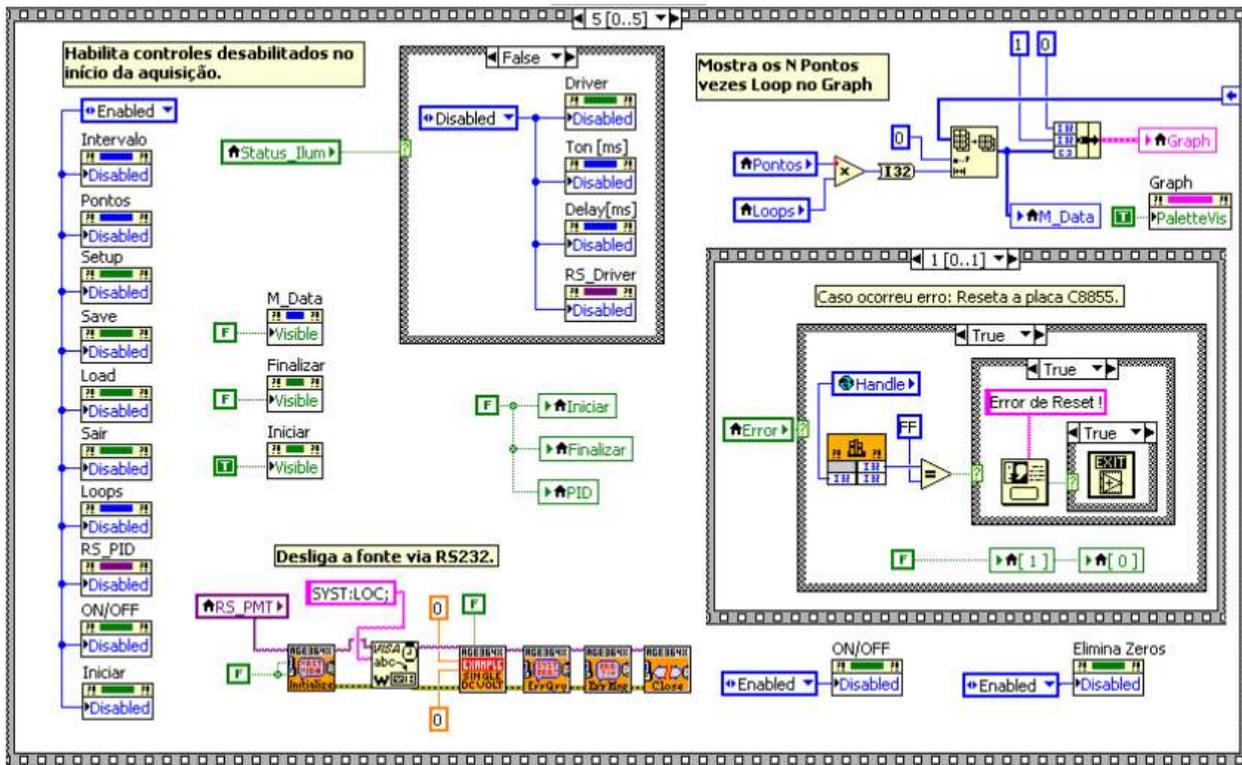


Figura A.20 – Quadro 5 do estado *Start*.

A.1.6 Estado End

O diagrama em blocos da Figura A.21 mostra o estado *End* que finaliza o programa; como mostrado, o comparador desta figura tem sua condição de igualdade satisfeita acionando o botão que finaliza o *While-Loop* mais externo da máquina de estados.

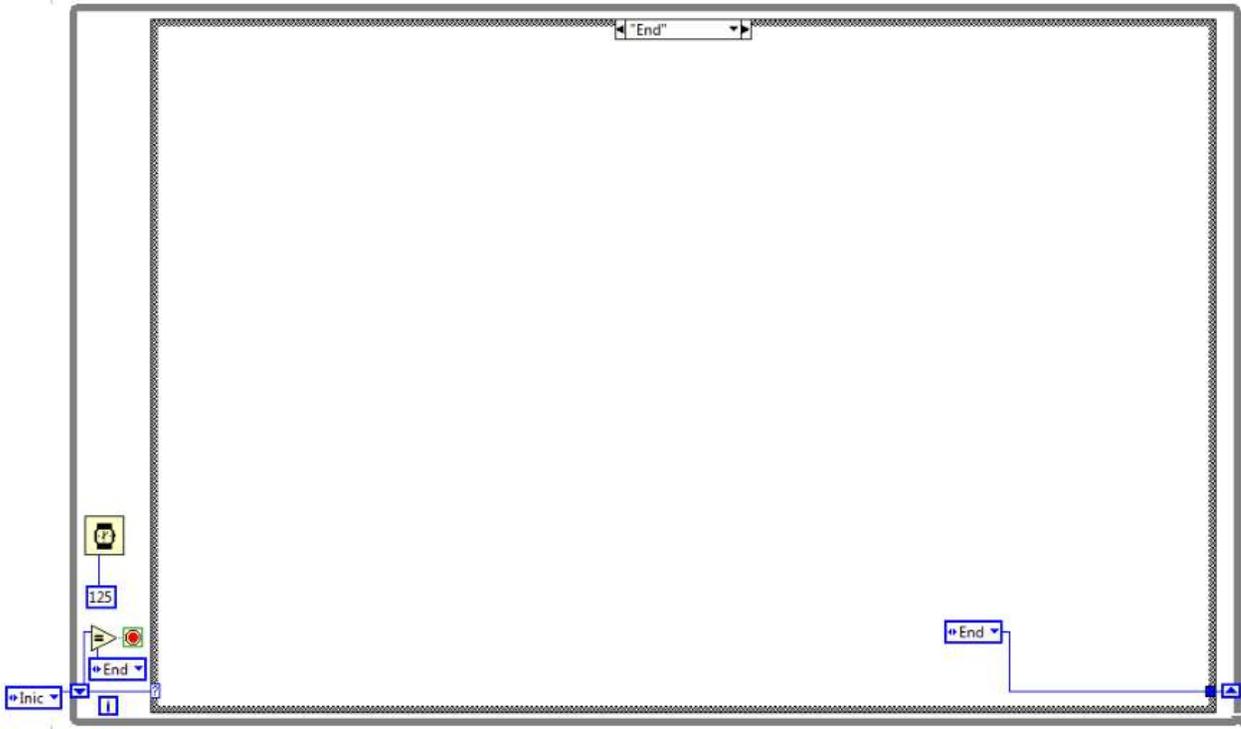


Figura A.21 – Estado *End*.

APÊNDICE B – Código fonte em C do firmware do sistema alternativo

```

/* Chip: ATmega328P  Clock: 16,000000 MHz */

#include <avr/io.h>    // Arq. cabeçalho para família AVR
#include <avr/portpins.h> // Arq. cabeçalho pinos de E/S
#include <avr/interrupt.h> // Arq. cabeçalho interrupções
#include <avr/dealy.h>  // Arq. cabeçalho delays

#define F_CPU 16000000UL // Freq. do relógio da CPU: 16 MHz

#define ADC_VREF_TYPE 0xC0 // Tipo tensão de ref. do ADC: interna

// Definições de Pinos do AVR
#define RELE_SHUTTER 3 //Pino conectado ao relê do shutter
#define RELE_PMT_VCC 5 //Pino conectado ao relê da fonte da PMT

//Protótipos das Funções

void inic(void);
unsigned int read_adc(unsigned char adc_input);

//Variáveis Globais
unsigned int time_ms,temp1,contagem=1;
unsigned char conta[5]={0,0,0,0,0};
unsigned int gatetime[]={ 1,2,5,10,20,50,100,200,500,1000};

// Programa principal
int main(void)
{
  unsigned char temp;

```

```

inic();          // Inicializa portas de E/S
while(1)        // Laço principal
{
    while(!(UCSR0A & (1<<RXC0)));
    temp=UDR0;  // Leitura do canal serial
    switch(temp)
    {
    case 'Q':    // ASCII 'Q' desliga fonte PMT
        cli();
        PORTC&=0<<RELE_PMT_VCC;
        break;

    case 'O':    // ASCII 'O' aciona rôle do shutter
        cli();
        PORTC|=1<<RELE_SHUTTER;
        break;

    case 'C':    // ASCII 'O' desaciona rôle do shutter
        cli();
        PORTC&=0<<RELE_SHUTTER;
        break;

    default:     // ASCII '0' a '9' corresponde o index de gatetime
        temp=temp-0x30;
        temp1=gatetime[temp]; // Gatetime em milisegundos/10
        time_ms=temp1;
        TIMSK1=0x01; // TC1 Interrup o Habilitada
        EIMSK=0x01; // INT0 Interrup o Habilitada
        PORTC|=1<<RELE_PMT_VCC;
        sei();
        break;
    };
}
}

```

```

// External Interrupt 0 service routine
ISR(INT0_vect)
{
  unsigned int temp;
  contagem++;          // Incrementa variável de contagem
  conta[0]= contagem % 10 + 0x30; // Dígito 0 do valor de contagem
  temp= contagem/10;
  conta[1]= temp % 10 + 0x30;    // Dígito 1 do valor de contagem
  temp= temp/10;
  conta[2]= temp % 10 + 0x30;    // Dígito 2 do valor de contagem
  temp= temp/10;
  conta[3]= temp % 10 +0x30;     // Dígito 3 do valor de contagem
  temp= temp/10;
  conta[4]= temp +0x30;          // Dígito 4 do valor de contagem
}

// ISR do TC1 por overflow
ISR(TIMER1_OVF_vect)
{
  unsigned int valor;
  TCNT1=-2500;          // Valor inicial de contagem do T/C1
  time_ms--;
  if(time_ms==0)
  {
    time_ms=temp1;      // Recarrega valor de gatetime
    UDR0=conta[4];      // Dígito 4 do valor de contagem
    while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
    UDR0=conta[3];      // Envia dígito 3 do valor de contagem
    while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
    UDR0=conta[2];      // Envia dígito 2 do valor de contagem
  }
}

```

```

while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=conta[1];          // Envia dígito 1 do valor de contagem
while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=conta[0];          // Envia dígito 0 do valor de contagem
valor=read_adc(0);
valor = (valor * 10.753); // Temp(°C)=(1.1*Valor Lido)/1023
while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=valor/10000 + 0x30; // Envia dígito 5 mais signif. valor Temp(°C)
valor=valor%10000;
while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=valor/1000 + 0x30; // Envia dígito 4 valor Temp(°C)
valor=valor%1000;
while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=valor/100 + 0x30; // Envia dígito 3 valor Temp(°C)
valor=valor%100;
while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=valor/10+0x30; // Envia dígito 2 valor Temp(°C)
while(!(UCSR0A & (1<<UDRE0)));
UDR0=valor%10+0x30; // Envia dígito 1 menos signif. valor Temp(°C)
contagem=1;          // Reinicializa variável de contagem
}
else
return;
}

// Leitura do A/D adc_input
unsigned int read_adc(unsigned char adc_input)
{
ADMUX=adc_input | (ADC_VREF_TYPE & 0xff);
_delay_us(10); // Espera tensão na entrada do A/D estabilizar
ADCSRA|=0x40; // Início de conversão

```

```

while ((ADCSRA & 0x10)==0);    // Espera o fim de conversão
ADCSRA|=0x10;
return ADCW;
}

// Rotina de inicializações
void inic()
{
// Inicializa Portas de I/O
PORTB=0x00;           // Porta B
DDRB=0x01;           // PB0 saída
PORTD=0x00;           // Porta D
DDRD=0x28;           // PD3 e PD5 saídas
// T/C1 Fonte de Clock: Clock do Sistema
// Clock: 250,000 kHz
// Modo de operação: Normal top=FFFFh
// Interrupção por Overflow
TCCR1A=0x00;
TCCR1B=0x03;
TCNT1H=0xF6;
TCNT1L=0x3A;
// Interrupções Externas: INT0=On; INT1=Off
EICRA=0x02; // Borda de Descida
EIMSK=0x00;
EIFR=0x00;
PCICR=0x00;
// USART: 8 Dados, 1 Stop, Sem Paridade
// Receiver=On / Transmitter=On
// Modo: Assíncrono
// Baud Rate=38400
UCSR0A=0x00;

```

```
UCSR0B=0x18;
UCSR0C=0x06;
UBRR0H=0x00;
UBRR0L=0x19;
// Comparador Analógico: Off
// Input Capture pelo T/C1: Off
ACSR=0x80;
ADCSRB=0x00;
// ADC Clock: 1000,000 kHz
// Tensão de Referência: Interna
// Auto Trigger: ADC Stopped
// Digital input buffers em ADC0-ADC5: On
DIDR0=0x00;
ADMUX=ADC_VREF_TYPE & 0xff;
ADCSRA=0x84;
// Desabilitação da Interrupção do T/C1
TIMSK1=0;
}
```

APÊNDICE C – Esquema elétrico do sistema alternativo

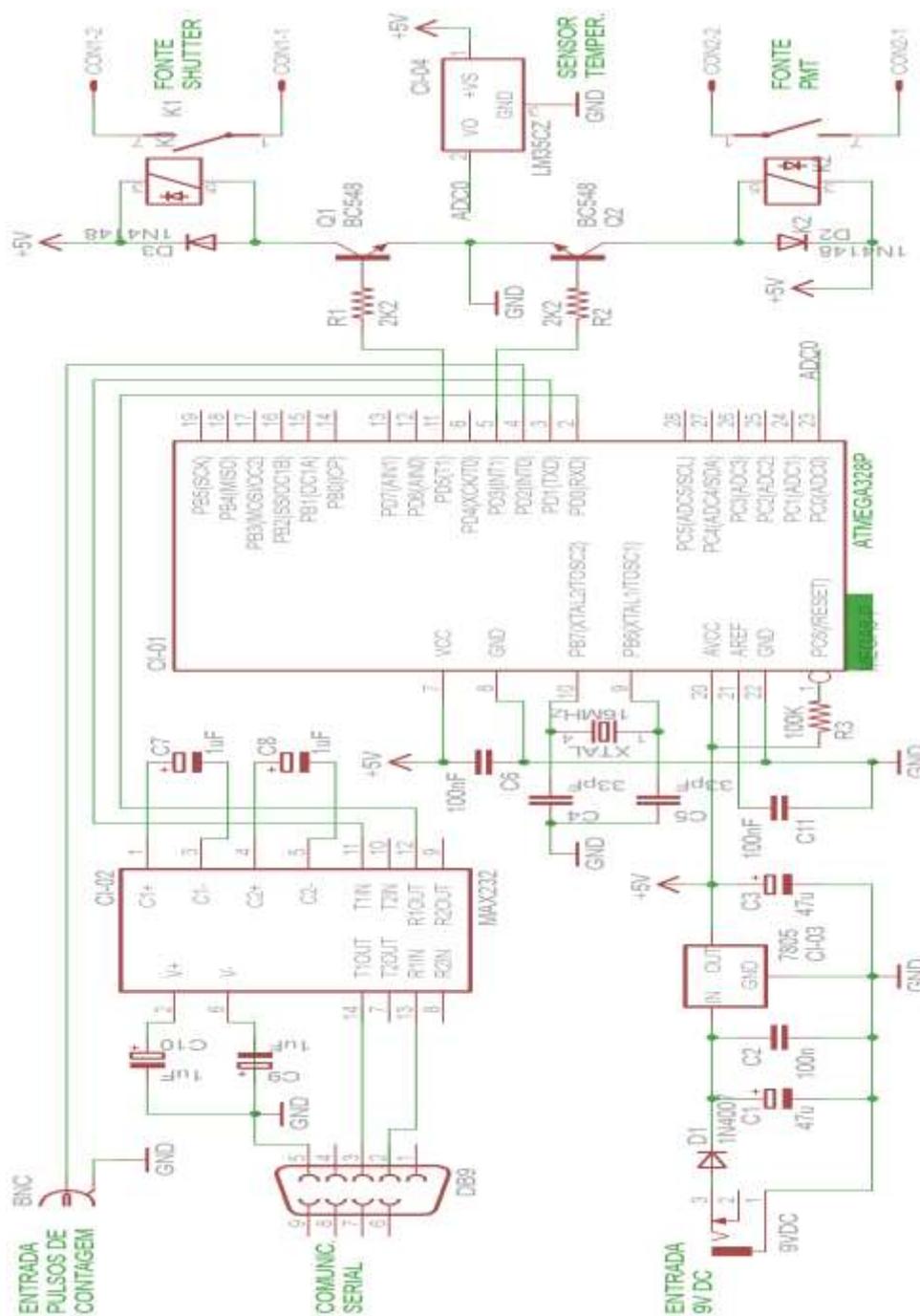


Figura C.1 – Esquema elétrico do sistema alternativo.

APÊNDICE D – Diagramas em blocos do VI do sistema AVR

D.1 Estados da máquina de estados – Estado Inic

A estrutura da máquina de estados que implementa a VI do sistema alternativo pode ser vista na Figura D.1, onde se pode ver que os estados da máquina de estados são: *Inic*, *Event*, *Start* e *Stop*.

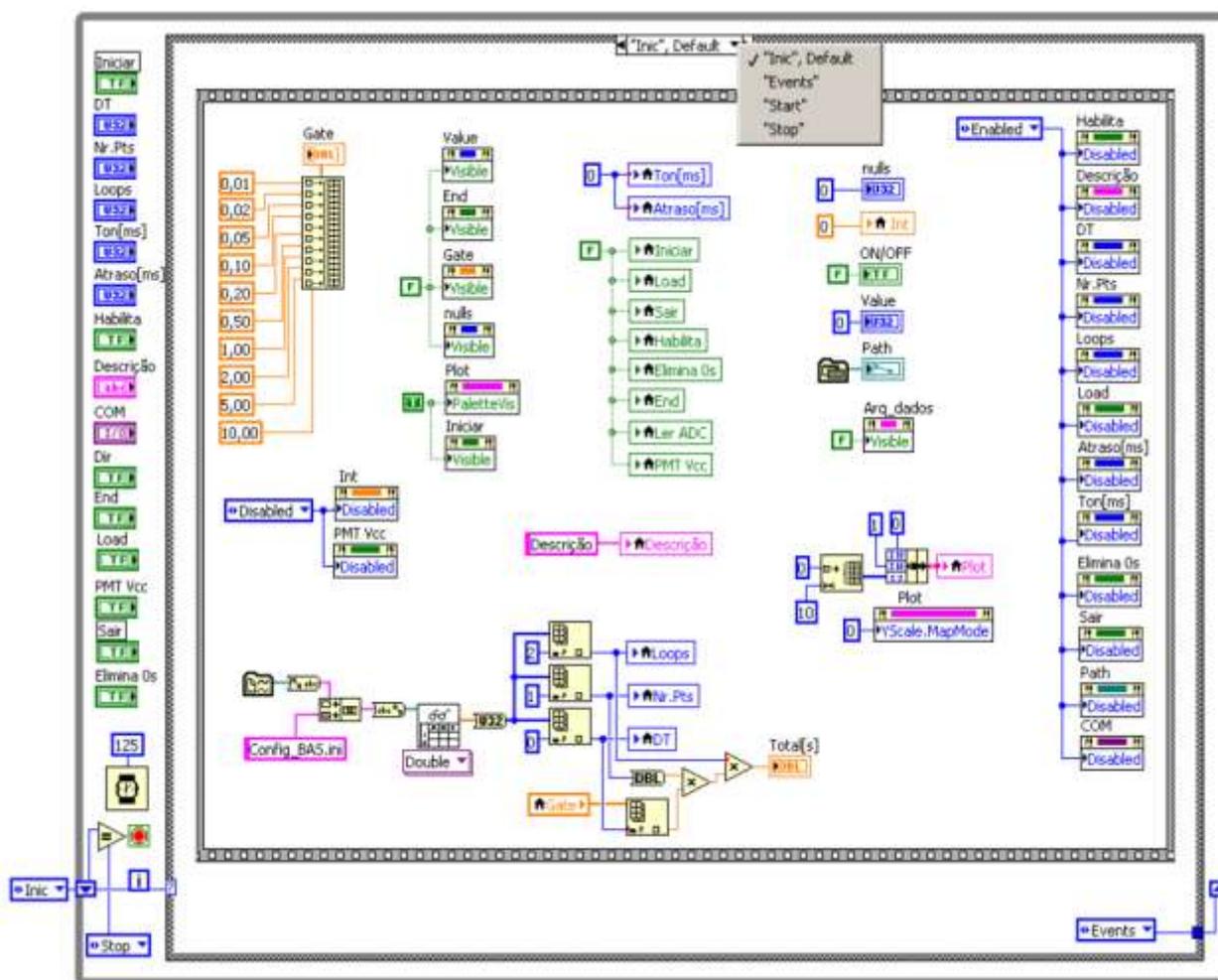


Figura D.1 – Máquina de estados do VI do sistema alternativo no estado *Inic*, quadro 0.

D.2 Estado *Event* da máquina de estados

A estrutura de eventos do estado *Events* pode ser vista na Figura D.2, com os eventos que tratam dos seguintes controles do painel frontal:

- ***Iniciar*** - permite ao usuário iniciar a aquisição de dados;
- ***Sair*** - permite ao usuário encerrar o programa;
- ***Load*** - permite ao usuário carregar um arquivo de dados na tela do painel frontal;
- ***Dir*** - permite ao usuário selecionar o diretório de destino dos dados;
- ***Loops, Nr.Ptos, DT*** - permite ao usuário ajustar o período de aquisição através do número de repetições (*Loops*) da aquisição de um número de valores (*Nr.Ptos*) de contagem totalizados a cada intervalo de tempo (*DT*);
- ***Descrição*** - usado para designar um nome ao arquivo de dados a ser salvo automaticamente de forma incremental a cada *Loop*.

D.2.1 Evento *Iniciar*

Na Figura D.2 o diagrama em blocos associado ao evento *Iniciar* está mostrado. Neste evento é apresentada ao usuário a caixa de mensagem com a seguinte pergunta: “*Iniciar aquisição ?*”, e dependendo da resposta: *Sim* ou *Não* levará, respectivamente, a um dos seguintes estados: *Start* no qual a aquisição de dados de foto-contagem tem início, ou *Events* que leva o programa a varrer a estrutura de eventos novamente.

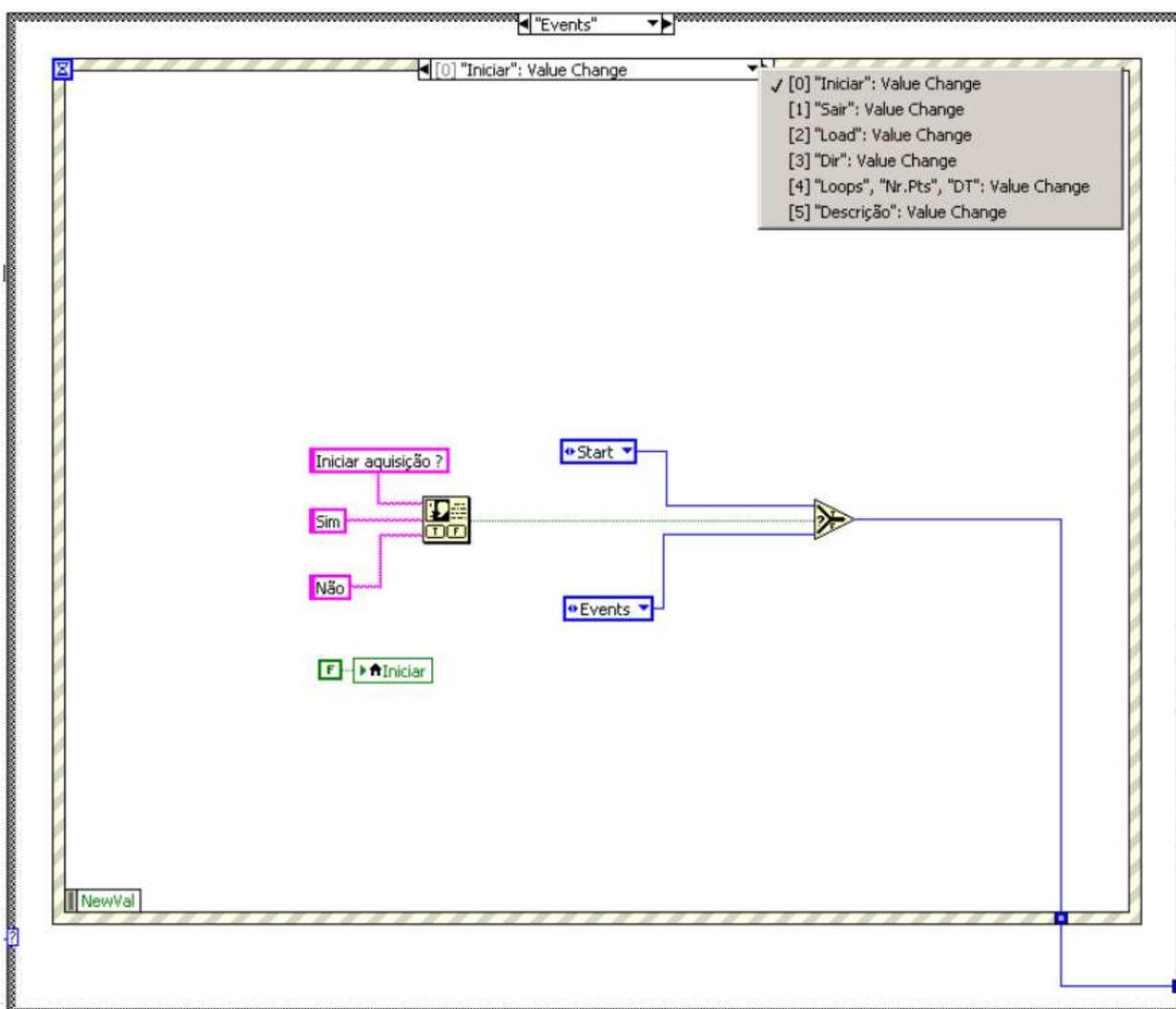


Figura D.2 – Estado *Event* no evento *Iniciar*.

D.2.2 Evento *Sair*

Na Figura D.3 o diagrama em blocos associado ao evento *Sair*, está mostrado, e da mesma forma que para o evento *Iniciar*, uma caixa de mensagem é apresentada ao usuário com a pergunta *Finalizar programa ?*, e dependendo da resposta: *Sim* ou *Não* levará, respectivamente, a um dos seguintes estados: *Stop* no qual o programa é encerrado, ou *Events* que leva o programa a varrer a estrutura de eventos novamente.

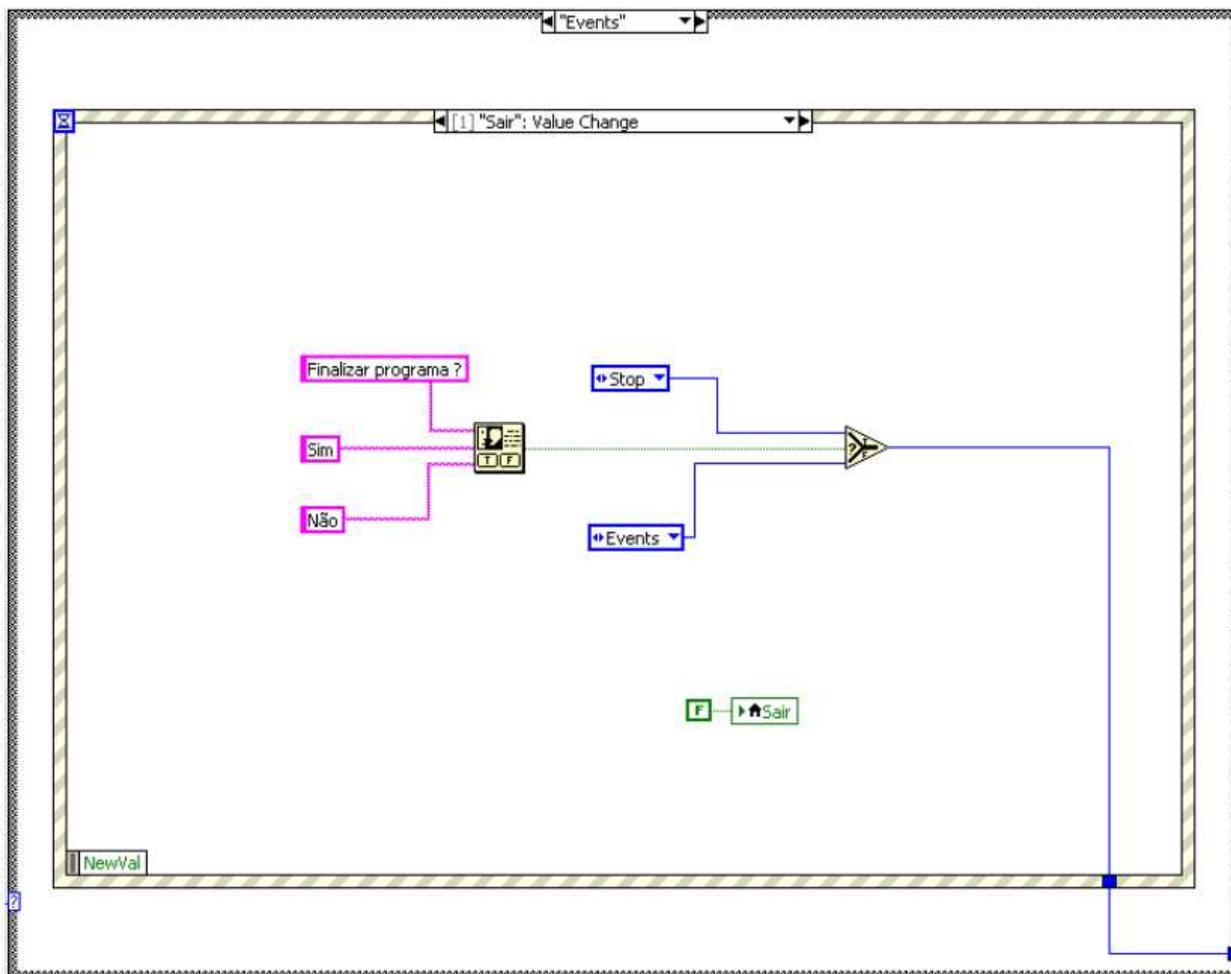


Figura D.3 – Estado *Event* no evento *Sair*.

D.2.3 Evento Load

Na Figura D.4 o diagrama em blocos associado ao evento *Load*, está mostrado, e sua estrutura é a mesma que aquela já explicada antes no seção A.1.4.7.

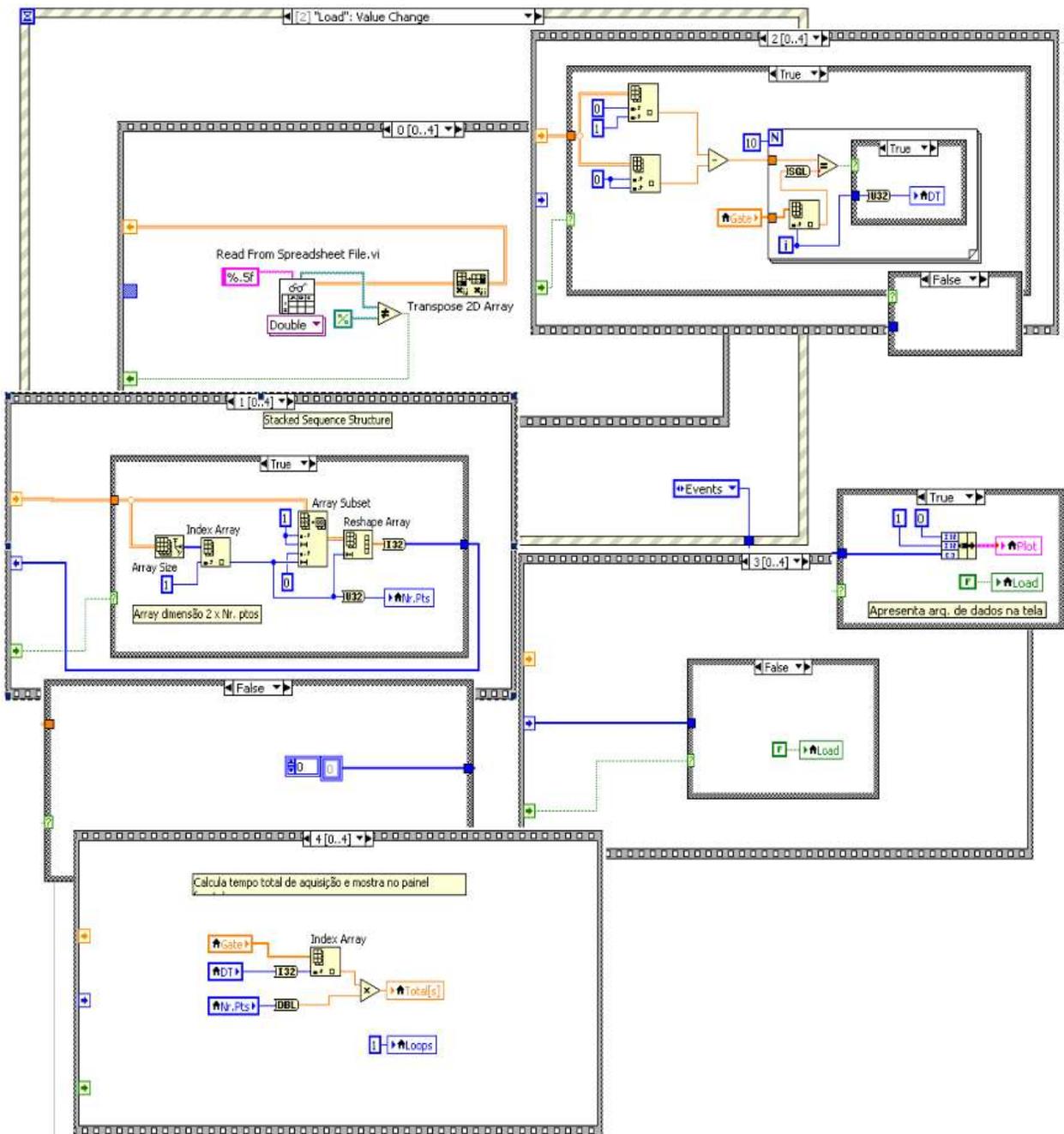


Figura D.4 – Estado *Event* no evento *Load*.

D.2.4 Evento *Dir*

Na Figura D.5 o diagrama em blocos associado ao evento *Dir* está mostrado, onde o usuário especifica o diretório de destino do arquivo de dados.

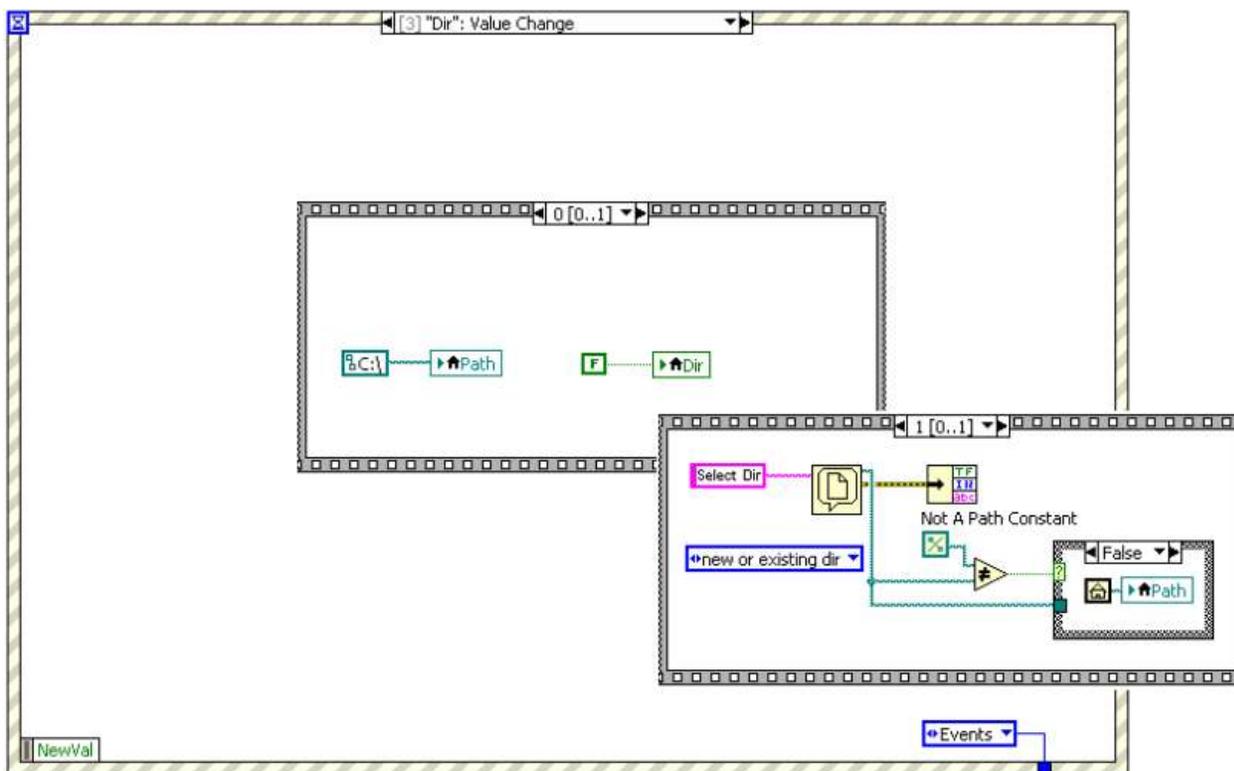


Figura D.5 – Estado *Event* no evento *Dir*.

D.2.5 Evento *Loops, Nr.Ptos, DT*

Na Figura D.6 o diagrama em blocos associado ao evento *Loops, Nr.Ptos, DT* está mostrado.

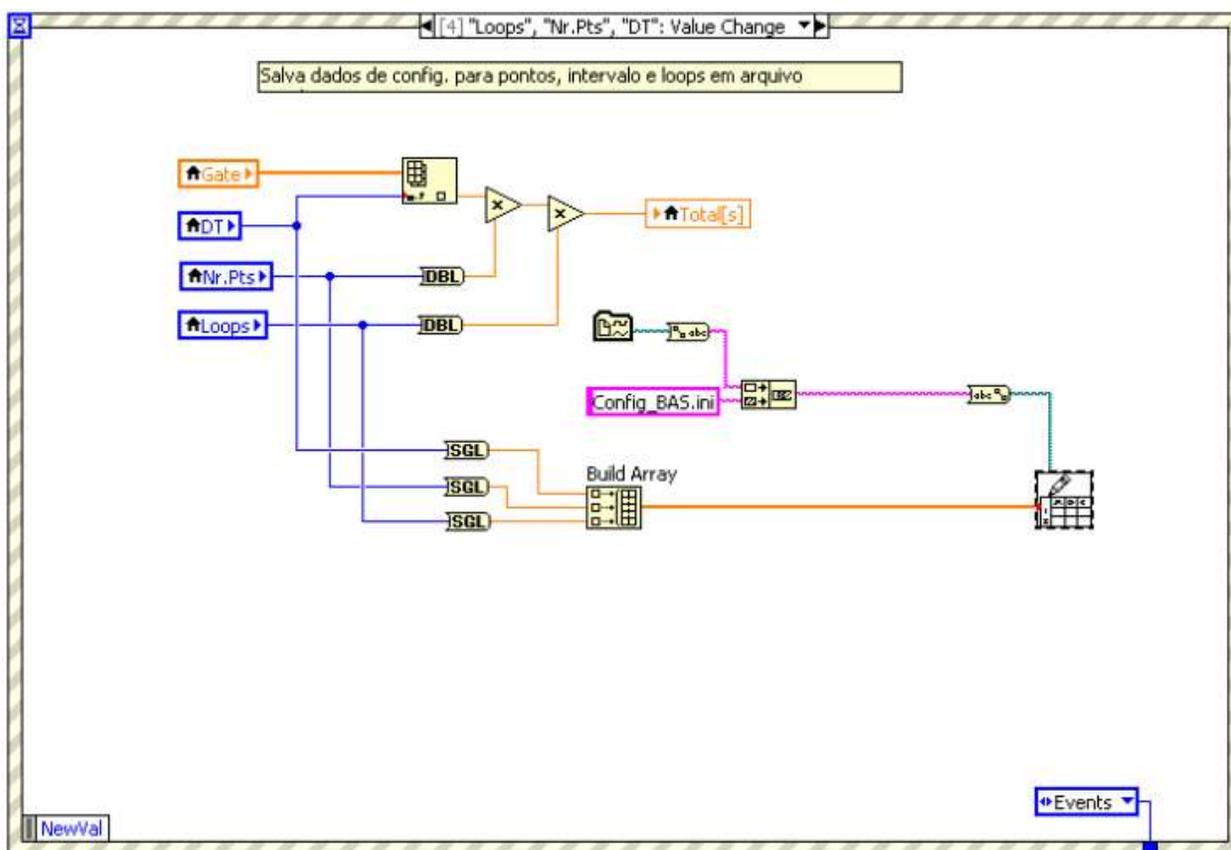


Figura D.6 – Estado *Event* no evento *Loops, Nr.Ptos, DT*.

D.2.6 Evento *Descrição*

Na Figura D.7 o diagrama em blocos associado ao evento *Descrição* está mostrado.

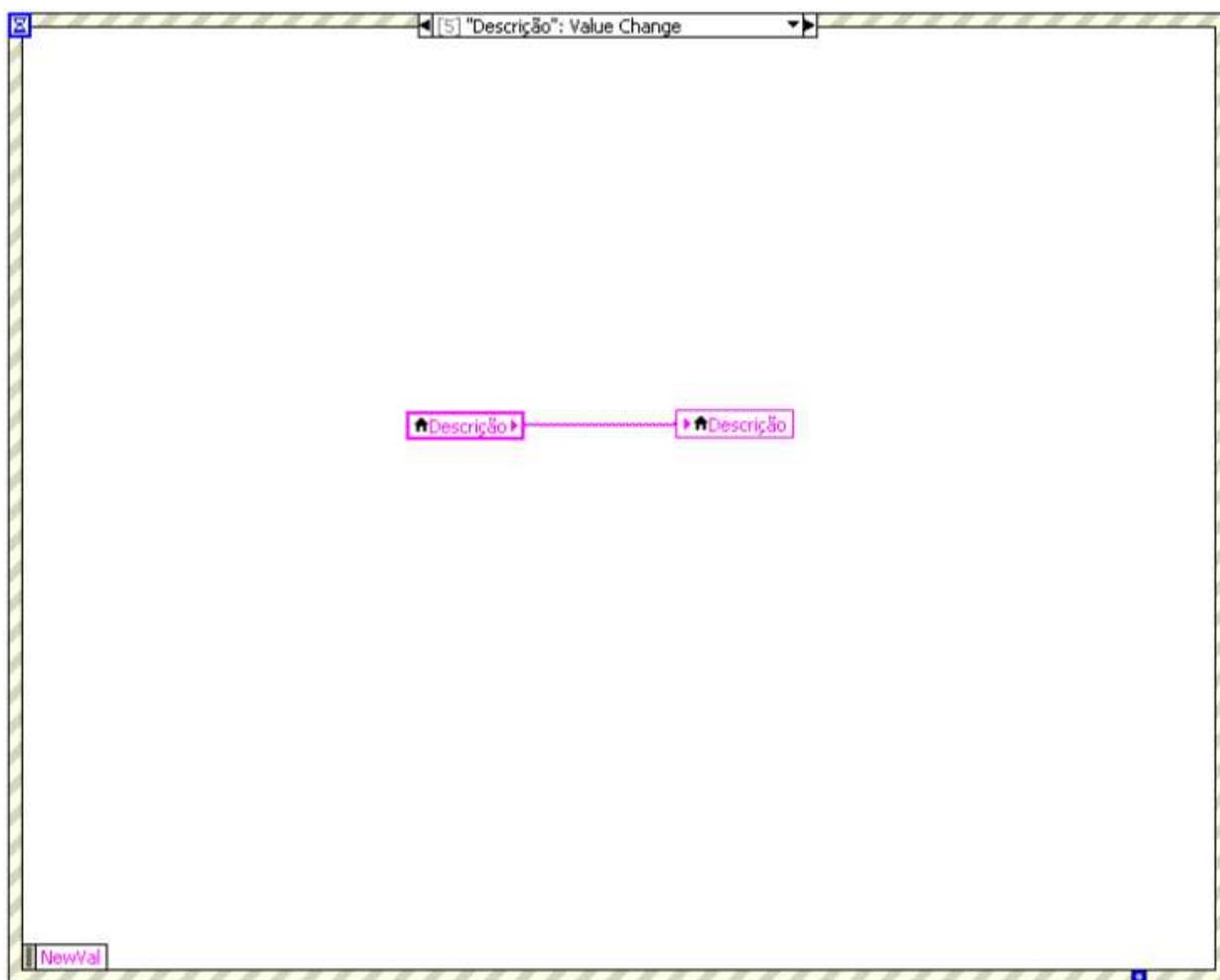


Figura D.7 – Estado *Event* no evento *Descrição*.

D.3 Estado *Start* da máquina de estados

A estrutura do quadro 0 da sequência contida no estado *Start*, em que é iniciada a aquisição de dados de foto-contagem, pode ser vista na Figura D.8.

Neste primeiro quadro da sequência no seu canto superior esquerdo estão os blocos que formam o nome a ser atribuído ao arquivo de dados, e, ao lado destes, várias inicializações de controles são feitas.

Na parte inferior da Figura D.8 está mostrada uma sequência na qual ocorre o acionamento do *shutter* do iluminador, caso o controle *Habilita* tenha sido previamente selecionado pelo usuário. Os comandos para abrir e fechar o *shutter* são enviados pela interface serial à placa mi-

controlada a uma taxa de 38400bps, através dos caracteres ASCII “O” e “C”, respectivamente, sendo o tempo de iluminação especificado pelo usuário no controle $Ton[ms]$, e o tempo de atraso para o início da contagem de fótons sendo dado pelo controle $Atraso[ms]$.

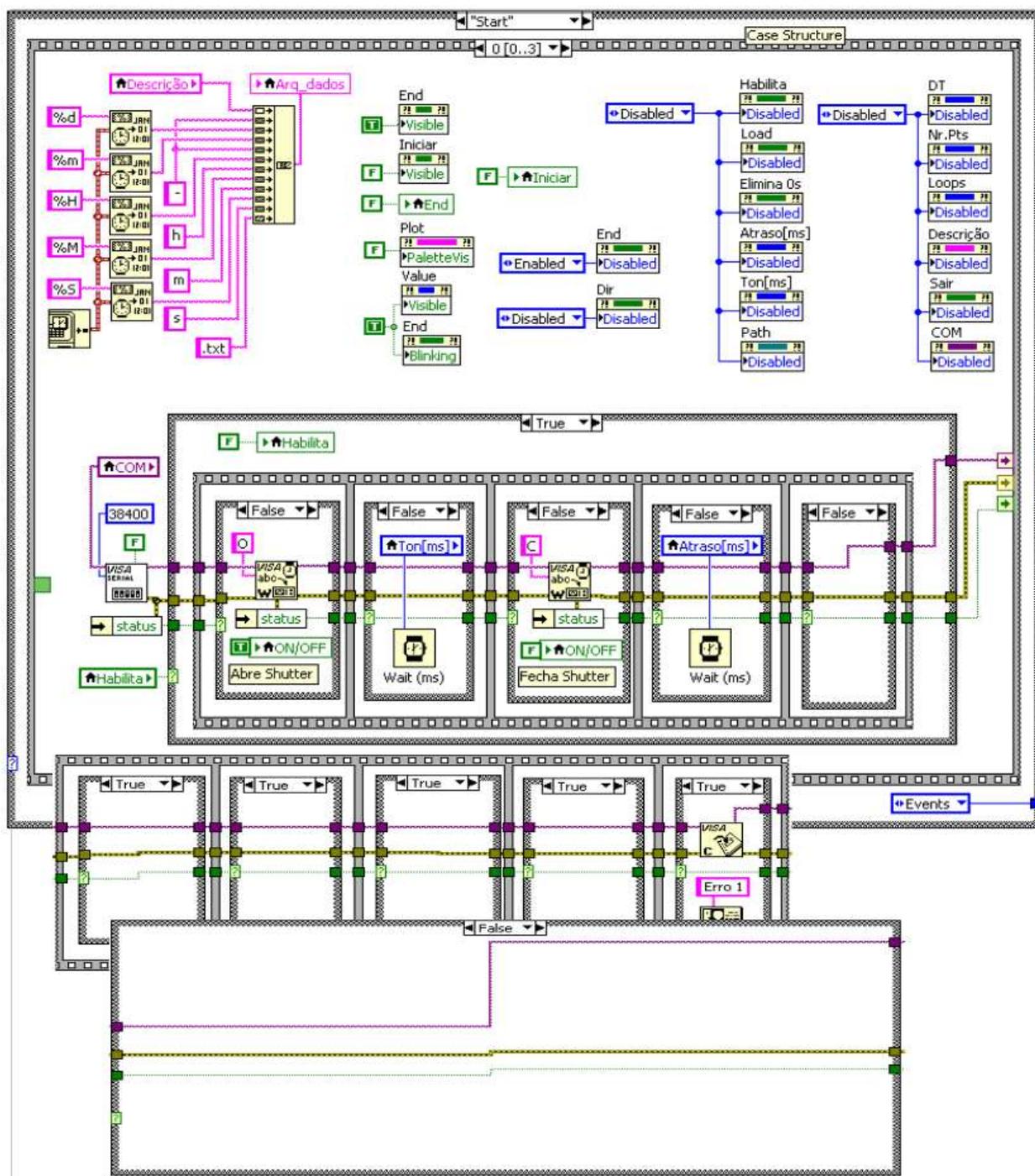


Figura D.8 – Estado *Start* da máquina de estados, quadro 0 da sequência.

No diagrama em blocos da Figura D.9 o parâmetro relativo ao intervalo de tempo de integralização das contagens de fótons selecionado pelo usuário é passado à placa microcontrolada através da interface serial.

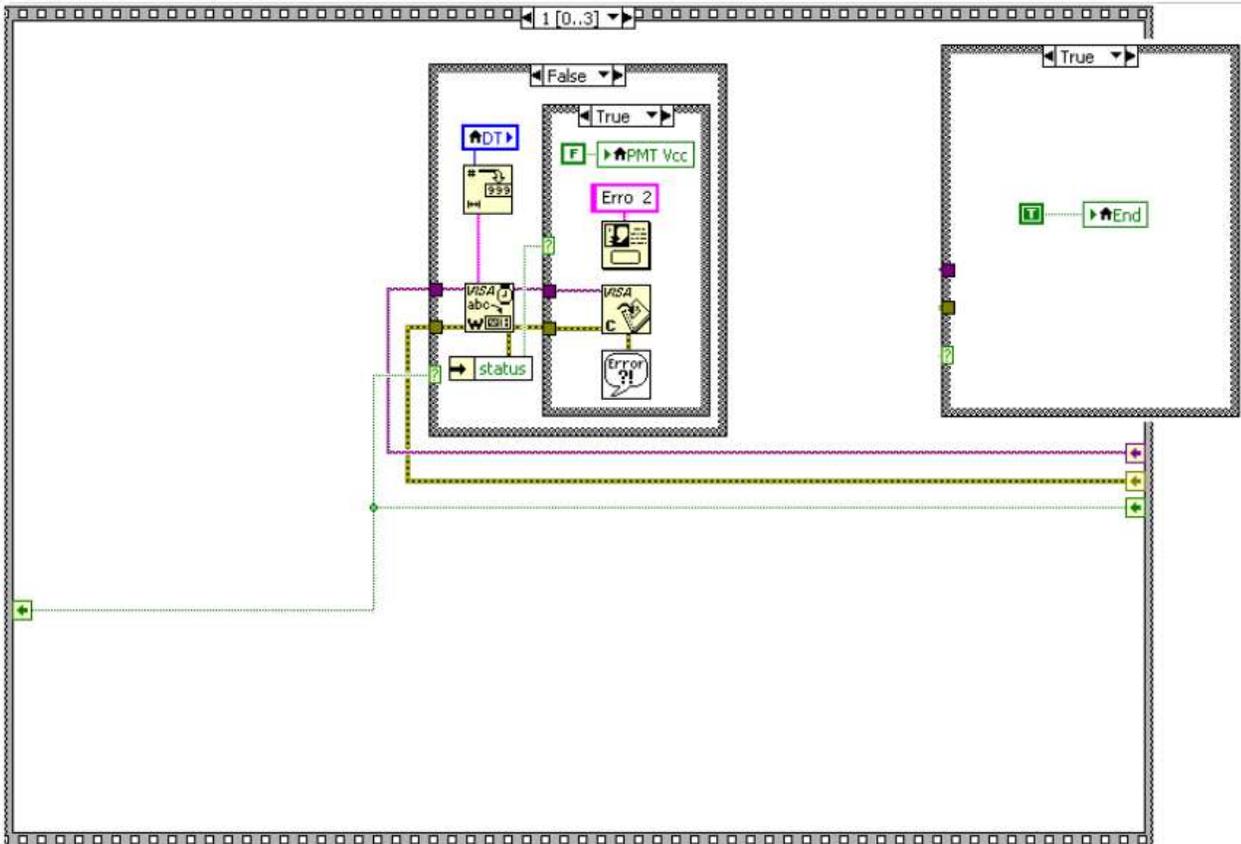


Figura D.9 – Estado *Start* da máquina de estados, quadro 1 da sequência.

No diagrama em blocos da Figura D.10 é iniciada a leitura dos dados de contagem.

Uma estrutura de repetição constituída de um *While-Loop* aninhado dentro de um *For-Loop* repetindo *Loop* vezes, o número de pontos dado por *Nr. Ptos*, é executado até que o número total de pontos da aquisição sejam recebidos via interface serial provenientes da placa microcontrolada, ou caso as repetições sejam interrompidas pelo usuário pelo controle *End*. Além dos dados de contagem, são também recebidos os dados do sensor de temperatura e apresentados no painel frontal atualizado a cada 3,5 segundos, isto caso o controle *Ler ADC* esteja selecionado.

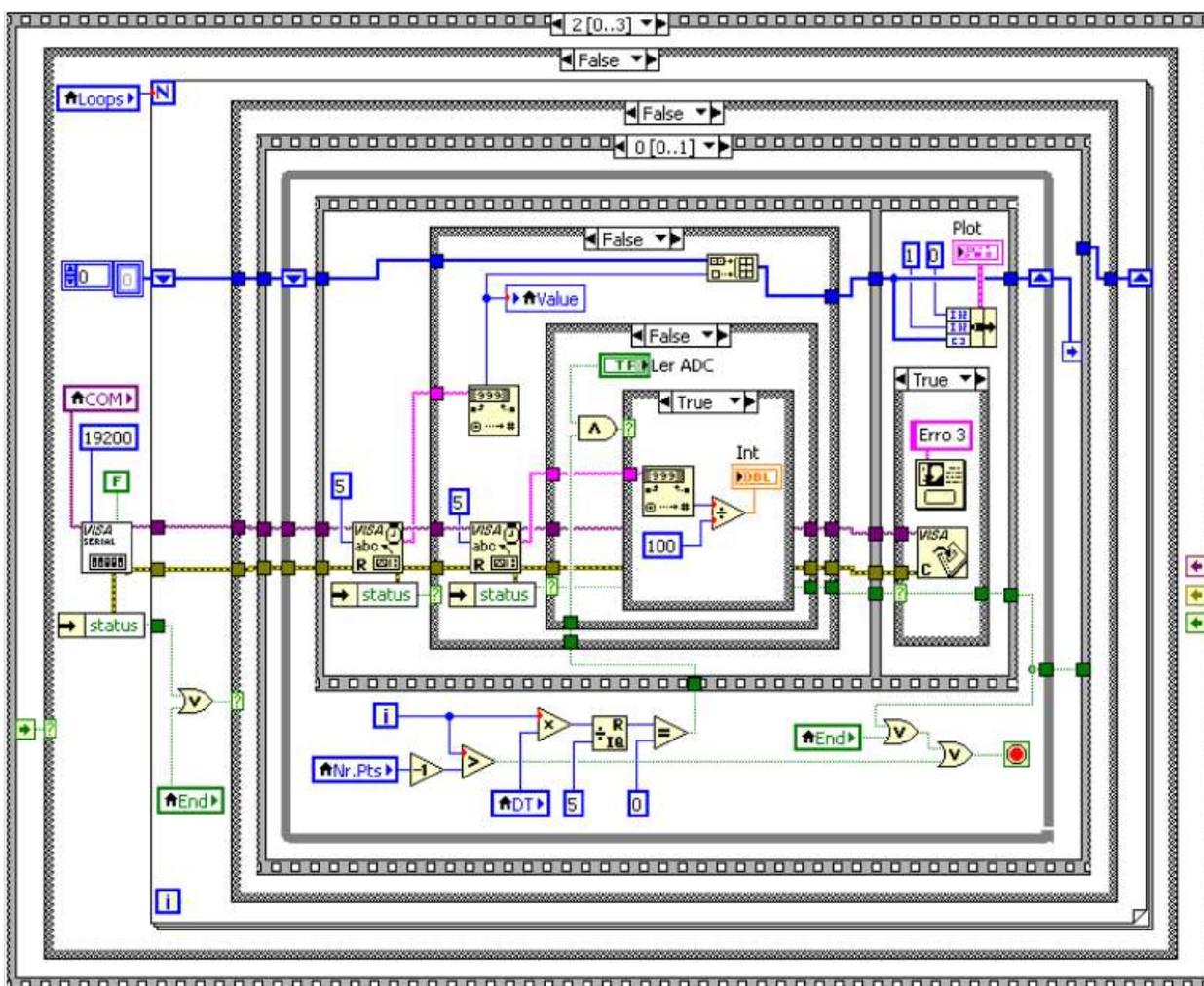


Figura D.10 – Estado *Start* da máquina de estados, quadro 2 da sequência.

No diagrama em blocos da Figura D.11 ocorre o salvamento automático dos dados de contagem adquiridos a cada *Loop*. O salvamento dos dados ocorre de forma incremental (opção *append*) no mesmo arquivo de dados cujo nome e diretório de destino foram previamente estabelecidos pelos campos do painel frontal: *Dir* e *Descrição*.

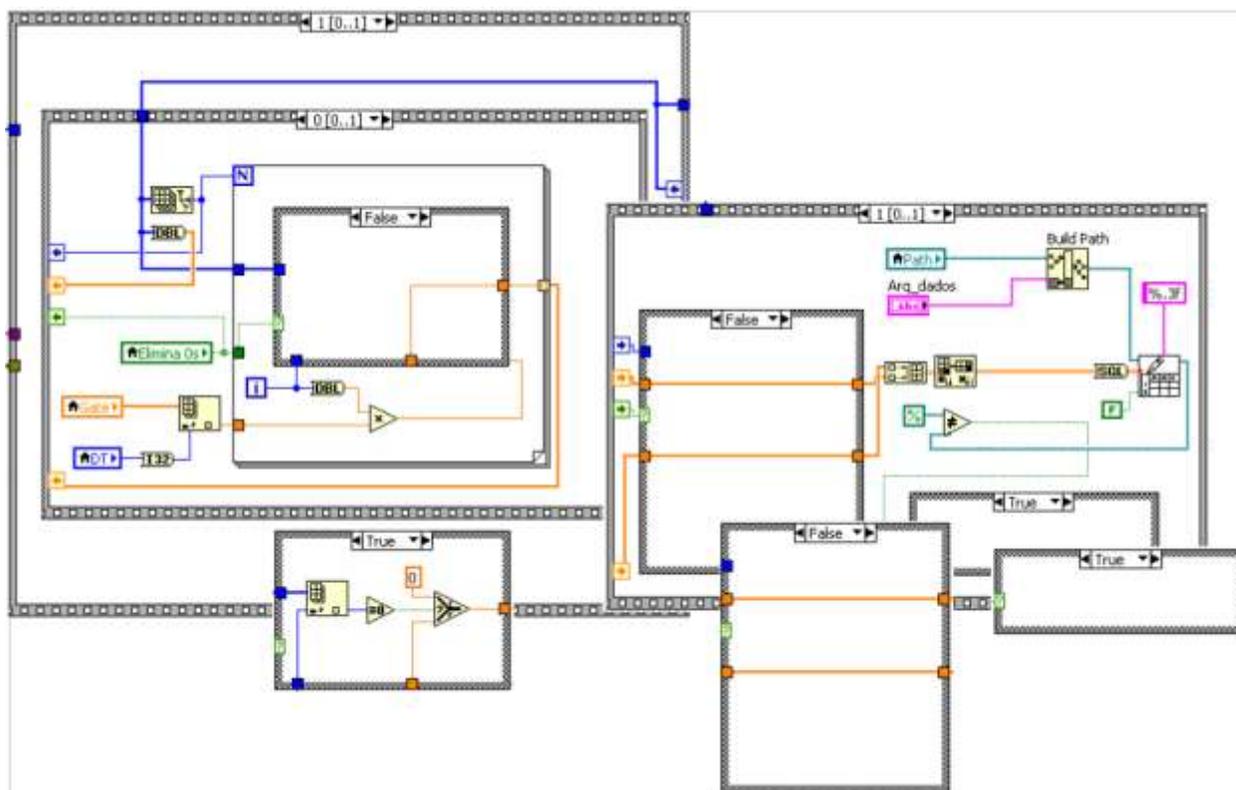


Figura D.11 – Estado *Start* da máquina de estados, quadro 2 da sequência (continuação).

D.4 Estado *Stop* da máquina de estados

A estrutura do estado *Stop* que finaliza o programa pode ser vista na Figura D.12.

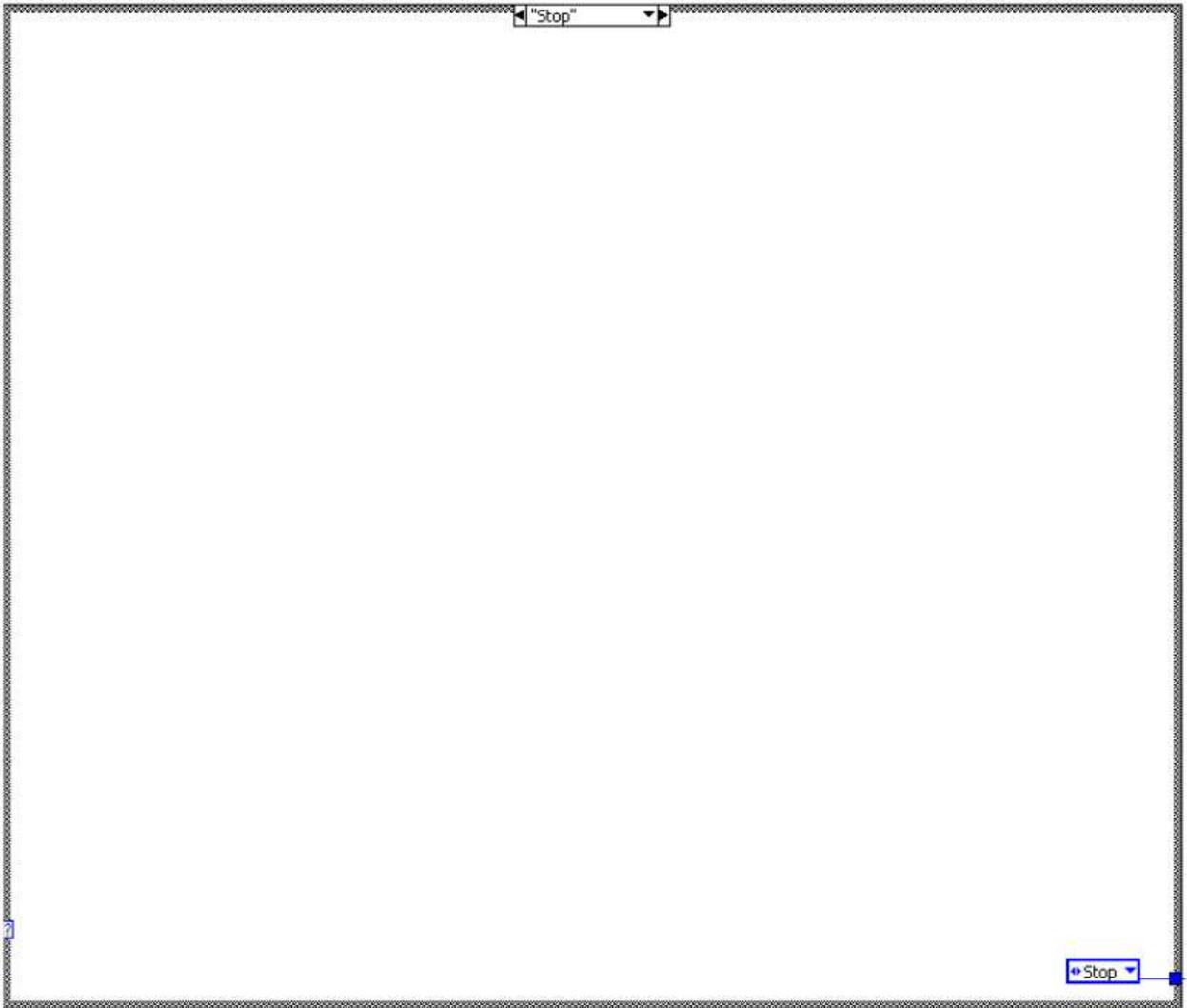


Figura D.12 – Estado *Stop* da máquina de estados.

APÊNDICE E – Publicações

I. Artigo em revista

BERTOOGNA, E.; BEZERRA, J.; CONFORTI, E.; GALLEP, C. M. Acute stress in seedlings detected by ultra-weak photon emission. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B, Biology**, v. 118, p. 74-76, 2013.

II. Artigos em congressos

1. BERTOOGNA, E.; SANTOS, Samuel Ricardo dos; CONFORTI, Evandro; GALLEP, Cristiano de Mello. On-time evaluation of seedlings growth in stressing solutions by ultra-weak light detection setup. In: SETAC ASIA/PACIFIC 2012, 2012, Kumamoto. **Anais**, 2012.
2. BERTOOGNA, E.; SANTOS, Samuel Ricardo dos; CONFORTI, E.; GALLEP, C. M.. Compact, Automatic Set-Up for Ultra-Weak Photon Emission Measurements in Organisms. In: INTERNATIONAL MICROWAVE AND OPTOELECTRONICS CONFERENCE - IMOC 2011. **Anais**, 2011, Natal/RN.
3. BERTOOGNA, E.; MORAES, T. A.; CONFORTI, E.; GALLEP, C. M.. Periodic Time-Components in Spontaneous Ultra-Weak Photon Emission of Wheat Seedlings in Stressing Solutions. In: THE LATIN AMERICA OPTICS AND PHOTONICS CONFERENCE 2010. **Proceedings of The Latin America Optics and Photonics Conference 2010**, 2010, Recife.
4. BERTOOGNA, E.; BEZERRA, J.; CONFORTI, E.; GALLEP, C. M.. Simultaneous Biophoton Measurement of Control and Fluoride Stressed Seedlings Samples. In: INTERNATIONAL MICROWAVE AND OPTOELECTRONICS CONFERENCE - IMOC 2013, submetido em 11/03/2013.

III. Pedidos de patentes e registro de software

1. GALLEP, C. M.; CONFORTI, E.; BERTOOGNA, E.. MÉTODO PARA ANÁLISE DE VIGOR DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI018120026694, data de depósito: 27/07/2012, título: "MÉTODO PARA ANÁLISE DE VIGOR DE GERMINA-

ÇÃO DE SEMENTES", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

2. GALLEP, C. M.; CONFORTI, E.; BERTOGNA, E.. IVSMB. 2011. Patente: Programa de Computador. Número do registro: PI018120032720, título: "IVSMB", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.