



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FÍSICA
UNIDADE ACADÊMICA DE FÍSICA

Carlos Eduardo Rufino da Silva

A espectroscopia fotoacústica como ferramenta para o estudo de biomoléculas

Campina Grande, Paraíba, Brasil

Setembro de 2021

Carlos Eduardo Rufino da Silva

A espectroscopia fotoacústica como ferramenta para o estudo de biomoléculas

Dissertação realizada sob orientação dos Professores Dr. Rodrigo José da Silva Lima e Dr. José Suassuna Filho, apresentada à Unidade Acadêmica de Física em complementação aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Professor Dr. Rodrigo José da Silva Lima

Coorientador: Professor Dr. José Suassuna Filho

Campina Grande, Paraíba, Brasil

Setembro de 2021

S586e Silva, Carlos Eduardo Rufino da.
A espectroscopia fotoacústica como ferramenta para o estudo de biomoléculas / Carlos Eduardo Rufino da Silva. – Campina Grande, 2021.
140 f.: il. : color.

Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2021.
"Orientação: Prof. Dr. Rodrigo José da Silva Lima;
Coorientação: Prof. Dr. José Suassuna Filho".
Referências.

1. Espectroscopia. 2. Fotoacústica. 3. Biomoléculas. 4. Python. 5. Método da Segunda Derivada. 6. Método da Fase. I. Lima, Rodrigo José da Silva. II. Suassuna Filho, José. III. Título.

CDU 543.42(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM FISICA
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

CARLOS EDUARDO RUFINO DA SILVA

A espectroscopia fotoacústica como ferramenta para o estudo de biomoléculas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Física.

Aprovada em: 01/09/2021

Rodrigo José da Silva Lima
Presidente da Comissão e Orientador

José Suassuna
Coorientador

Renilton Correia da Costa
Examinador Interno

Mauro Luciano Baesso
Examinador Externo



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Luciano Baesso, Usuário Externo**, em 01/09/2021, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **RODRIGO JOSE DA SILVA LIMA, FISICO**, em 01/09/2021, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **RENILTON CORREIA DA COSTA, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/09/2021, às 16:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOSE SUASSUNA FILHO, Usuário Externo**, em 17/09/2021, às 10:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1735171** e o código CRC **91BB419B**.

Dedico este trabalho ao meu pai e à minha mãe, cujos exemplos fizeram de mim quem sou.

Agradecimentos

- A Deus pelo dom da vida e por tudo que Ele graciosamente tem-me concedido.
- Aos meus pais, Edvaldo Rufino da Silva (“Seu Edvaldo”) e Maria José Clemente da Silva (“Dona Lia”), por acreditarem em mim, pelo apoio, por se fazerem presentes em todos os momentos, pelas orações, e por tudo que eles têm sido para mim.
- Aos Professores Dr. Rodrigo José da Silva Lima e Dr. José Suassuna Filho por acreditarem em meu potencial, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica, pela orientação, pelos estímulos em meio às dificuldades, pelas sugestões, pelas várias discussões que em muito agregaram ao meu conhecimento, pelo companheirismo que muito me inspira e ensina, pelo exemplo de ambos e pela competência com que conduziram este trabalho.
- À Emily Natália pela amizade, por cada conversa, pela presença apesar da distância e pelo precioso tempo gasto comigo.
- A Matheus Guimarães pela colaboração com as simulações TDDFT.
- Ao Pr. Edivaldo Barbosa e sua esposa Josefa Pereira (“Dona Zéza”) pelo apoio e pelas orações.
- Ao amigo Professor Geraldo Caetano (*in memoriam*) pelo apoio a mim demonstrado e pelos muitos conselhos.
- A Leonardo Augusto pela amizade e pelas orações.
- A todos os membros do Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica a saber, Vítor Alexandre, Matheus Guimarães, Diego Giraldo, Kennedy Agra e Renilton Correia.
- A todos os professores que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação.
- Aos meus colegas de pós-graduação.
- Aos funcionários da Unidade Acadêmica de Física pela grata convivência durante a minha permanência nessa unidade.
- À CAPES pelo suporte financeiro.
- Aos integrantes da banca examinadora pelas preciosas considerações.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

«Καὶ ἐὰν ἔχω προφητείαν καὶ εἶδῶ τὰ μυστήρια πάντα καὶ
πᾶσαν τὴν γνῶσιν καὶ ἐὰν ἔχω πᾶσαν τὴν πίστιν ὥστε ὄρη
μεθιστάναι, ἀγάπην δὲ μὴ ἔχω, οὐθέν εἰμι.»
(ΠΑΥΛΟΣ Ο ΤΑΡΣΕΥΣ)

“E se [eu] tiver o dom de profecia e souber os mistérios todos e
todo o conhecimento e se tiver toda fé ao ponto de transportar
montes, mas amor não tiver, nada serei.”
(PAULO DE TARSO, tradução livre)

Resumo

As biomoléculas estão diretamente ligadas com o metabolismo energético dos seres vivos e portanto sua manutenção no organismo é indispensável para conservação de uma boa saúde. Essas biomoléculas, em sua maioria, estão disponíveis em diversos materiais como frutas, verduras e vegetais, os quais estão associados com diversas propriedades, dentre as mais importantes podemos citar as farmacológicas, como agente antioxidante, agente redutor e agente anti-inflamatório que são de muito valor à saúde humana. Isso tem motivado diversas pesquisas científicas no intuito de melhor caracterizar essas matérias e diferenciar os entes que os tornam multifuncionais, dentre os quais as biomoléculas representam o interesse deste trabalho. Ademais, essas pesquisas, por sua vez, são realizadas por meio de técnicas que exigem que métodos de extração sejam aplicados ao material de interesse com o fim de extrair as biomoléculas para que as mesmas possam ser estudadas. Isso acaba por mudar as condições naturais daquelas moléculas tornando o resultado diferente do esperado. Este trabalho tem como objetivo utilizar a espectroscopia fotoacústica como ferramenta de estudo de biomoléculas e de caracterização óptica de materiais orgânicos tendo em vista sua capacidade de sondá-los sem a necessidade primária da realização de um procedimento de extração. Para tanto foram desenvolvidos novos sistemas e métodos computacionais que permitiram a execução, automatização dos hardwares, aquisição de dados do experimento e uma melhor interpretação dos mesmos. Esses métodos foram aplicados e testados em materiais que contêm biomoléculas e que são de fácil acesso à população brasileira, como frutas e vegetais. As amostras de interesse foram estudadas por espectroscopia fotoacústica, e os resultados foram analisados utilizando o método da segunda derivada e do método da fase. As técnicas de UV-Vis e simulações computacionais TDDFT também foram aplicadas como ferramentas de comparação aos resultados da espectroscopia fotoacústica. Os resultados se mostraram promissores e diversas facetas da espectroscopia fotoacústica foram exploradas. Sua capacidade de sondar sistemas físicos orgânicos em forma cristalina, líquida, sólida e *in natura* foram demonstradas com êxito neste trabalho.

Palavras-chave: Espectroscopia. Fotoacústica. Biomoléculas. Python. Método da segunda derivada. Método da fase.

Abstract

The biomolecules are directly linked to the energy metabolism of living beings and therefore their maintenance in the body is essential for the conservation of good health. These biomolecules, mostly, are present in several materials like fruits, greens and vegetables, which are associated with many properties, among the most important ones we may mention the pharmacological properties, like antioxidant agent, reducing agent and anti-inflammatory agent that are of great value to human health. This has motivated several scientific researches with the aim of better characterize these materials and differentiate the entities that make them multifunctional, among which the biomolecules represent the interest of this work. Furthermore, these studies are performed through techniques that require extraction methods to be applied to the interest material in order to extract the biomolecules so that they may be studied. This ends up changing the natural conditions of those molecules making the result different from the expected. This work aims to use photoacoustic spectroscopy as a tool for studying biomolecules and optical characterization of organic materials in view of their ability to probe materials without the primary need to perform an extraction procedure. To this end, new systems and methods were developed that allowed the execution, hardware automation, data acquisition from the experiment and a better interpretation of them. These methods were applied and tested on materials that contain biomolecules and that are easily accessible to the Brazilian population, such as fruits and vegetables. The samples of interest were characterized by photoacoustic spectroscopy, and the results were analyzed using the second derivative and phase methods. The UV-Vis spectroscopy and TDDFT computer simulations techniques were used as a comparative background to the photoacoustic's results as well. The results were promising and several facets of the photoacoustic spectroscopy were studied showing its ability to probe organic physical systems in a crystalline, liquid, solid and *in natura* form.

Keywords: Spectroscopy. Photoacoustic. Biomolecules. Python. Second derivative method. Phase method.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Diagrama de blocos da detecção sensível à fase. $V_{in}(t)$ é o sinal de interesse que será estudado, $V_R(t)$ é o sinal de referência e V_{rec} é o sinal recuperado.	30
Figura 2 – Diagrama de blocos do amplificador <i>lock-in</i> de duas fases. $V_{in}(t)$ é o sinal de interesse que será estudado, X_{rec} é o componente “em fase” do sinal recuperado, $V_R(t)$ é o sinal de referência, R é o módulo do sinal recuperado, ϑ é a diferença de fase entre o sinal de interesse e a referência, e Y_{rec} é o componente “em quadratura” do sinal recuperado.	32
Figura 3 – Decomposição do sinal de interesse no plano complexo. \vec{Z} é o vetor complexo composto pelo componente “em fase”, X_{rec} , e “em quadratura”, Y_{rec} , do sinal de interesse. R é o módulo do sinal de interesse e ϑ é a fase entre o sinal de interesse e a referência.	33
Figura 4 – Diagrama do filtro passa-baixa passivo de primeira ordem.	35
Figura 5 – Gráfico da tensão sobre o capacitor em função do tempo, $V_C(t)$, de acordo com a Equação 2.48, onde $V_C(0) = 0$, $\vartheta = \varphi = 0$, $W = 2\Omega$ e $\Theta = 0$ com $\vartheta_0 = \vartheta_{ref} = 0$	37
Figura 6 – Amplitude normalizada do tempo de acordo com a Equação 2.20 e domínio das variáveis A e B para um erro percentual ≤ 0.2	39
Figura 7 – Gráfico do ganho à saída do filtro-passa baixa de primeira ordem em função da frequência de acordo com a Equação 2.22 e destaque ao ganho na frequência de corte. O eixo das abscissas foi normalizado pela frequência de corte do filtro, ω_c	40
Figura 8 – Diagrama do filtro passa-baixa de ordem n com seguidor de tensão em cada estágio para evitar os efeitos de carga.	41
Figura 9 – Gráfico do ganho à saída do filtro passa-baixa de ordem n para $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau$ em função da frequência de acordo com a Equação 2.25. O eixo das abscissas foi normalizado pela frequência de corte do filtro, ω_c	42
Figura 10 – Gráfico do ganho à saída do filtro passa-baixa de ordem n para $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau\sqrt{2^{1/n} - 1}$ em função da frequência de acordo com a Equação 2.27. O eixo das abscissas foi normalizado pela frequência de corte do filtro, ω_c	43
Figura 11 – Série temporal do ruído branco gaussiano gerado numericamente com 2^{16} pontos à esquerda e histograma em azul com ajuste da distribuição gaussiana da sua amplitude em vermelho à direita.	44

Figura 12 – Gráfico da autocorrelação numérica da série temporal do ruído branco, apresentado na Figura 11, em azul, e ajuste teórico dado pela Equação 2.32 em vermelho.	45
Figura 13 – Gráfico de simulação, realizada no LTspice, da densidade espectral do ruído térmico no circuito da Figura 4 em vermelho e ajuste teórico dado pela Equação 2.38 em azul. Foi usado $R = 1 \text{ k}\Omega$, $C = 10 \text{ nF}$ e $T = 300.15 \text{ K}$	47
Figura 14 – Decomposição do sinal de interesse no plano complexo, com a contribuição de dois centros de absorção, pelo componente “em fase”, X_{rec} , e pelo “em quadratura”, Y_{rec} , do sinal de interesse. \vec{Z} é o vetor complexo composto pela soma vetorial do vetor \vec{Z}_0 e do vetor \vec{Z}_1 associados ao seu respectivo centro de absorção.	49
Figura 15 – Solução numérica da recuperação das amplitudes de um sinal misto na forma da Equação 2.41 realizada através do método Runge–Kutta–Fehlberg de ordem 5 à saída do filtro passa-baixa de primeira ordem. As curvas pontilhadas são o resultado numérico. As curvas contínuas são o ajuste teórico dado pela Equação 2.49 para V_0 e pela Equação 2.50 para V_1 . Finalmente as curvas tracejadas são o valor teórico esperado para V_0 (Equação 2.45), V_1 (Equação 2.45), e R (Equação 2.44).	52
Figura 16 – Representação da montagem experimental usada por Bell para intensificar o efeito “fotofônico”.	55
Figura 17 – Representação da montagem experimental do Espectrofone.	56
Figura 18 – Representação em corte transversal de uma câmara fotoacústica.	58
Figura 19 – Representação do elemento de volume dV através do qual passa um fluxo de calor $\vec{\varphi}(\vec{r}, t)$ e no qual há uma fonte de calor $f(\vec{r}, t)$	59
Figura 20 – Representação em corte transversal de uma câmara fotoacústica cilíndrica segundo o modelo Rosencwaig-Gersho.	61
Figura 21 – Distribuição espacial, dependente do tempo, da temperatura dentro da camada limite de gás adjacente à superfície da amostra conforme a Equação 3.13.	64
Figura 22 – Espectro fotoacústico de referência da lâmpada de arco de xenônio obtido com o Negro de Fumo.	66
Figura 23 – Diagrama de blocos da configuração experimental do espectrômetro fotoacústico.	70
Figura 24 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico P.A. misturado com o espectro de emissão da lâmpada.	73
Figura 25 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico P.A. recuperado através da normalização pelo espectro de referência.	74

Figura 26 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico com remoção do <i>Background</i> em vermelho, com filtro gaussiano para remoção do ruído branco em preto, com curva da segunda derivada em azul, destaque aos pontos de mínimo marcados com um \times e aplicação do fator de corte. A constante σ , escolhida arbitrariamente, representa o desvio padrão para o <i>kernel</i> gaussiano.	75
Figura 27 – Interface gráfica do <i>software</i> de aquisição de dados do espectrômetro fotoacústico.	77
Figura 28 – Interface em ASCII para o pacote de tratamento de dados fotoacústicos.	78
Figura 29 – Espectro de absorção UV-Vis do ácido ascórbico P.A diluído em água apresentado na curva azul e diluído em etanol apresentado na curva vermelha. Espectro UV-Vis calculado através do método TDDFT usando o funcional B3LYP apresentado na curva magenta, adicionando-se o método de solvatação IPCM em água apresentado na curva laranja, usando o funcional CAMB3LYP e o método de solvatação IPCM em água apresentado na curva verde e usando o funcional CAMB3LYP e o método de solvatação SMD em etanol apresentado na curva preta. Os espectros experimentais foram deslocados no eixo das ordenadas por um fator constante para facilitar a comparação entre os resultados experimentais e os calculados.	80
Figura 30 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico P.A. em vermelho com barras de desvio padrão em cinza. Centros de absorção obtidos com auxílio do método da segunda derivada e ajustados através de funções gaussianas em amarelo e azul. Curva de ajuste composta pela soma dos centros de absorção ajustados através de funções gaussianas em preto.	81
Figura 31 – Espectro de absorção UV-Vis dos extratos de folha de pitanga em etanol em verde, de feofitina A em vermelho e de clorofila B em azul. Combinação linear dos espectros de absorção de feofitina A e de clorofila B em preto e diferença entre o espectro do extrato de folha de pitanga e a combinação linear em amarelo. Os espectros de feofitina A e de clorofila B foram retirados do trabalho de H. K. Lichtenthaler [83].	83
Figura 32 – Espectro fotoacústico para a folha de pitanga diluída em etanol em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos nove centros de absorção, na forma de funções gaussianas, obtidos com o auxílio do método da segunda derivada.	84

Figura 33 – Espectro fotoacústico do papel contendo as biomoléculas extraídas pelo etanol da folha de pitanga em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos cinco centros de absorção, na forma de curvas gaussianas, obtidos com auxílio do método da segunda derivada.	86
Figura 34 – Espectro fotoacústico da folha de pitanga <i>in natura</i> em azul e barras de desvio padrão em cinza.	88
Figura 35 – Espectro fotoacústico de fase da folha de pitanga <i>in natura</i> em azul e espectro de fase com aplicação do filtro digital Savitzky-Golay para redução do ruído em preto. Destaque à fase do sinal fotoacústico na região onde espera-se observar absorção das biomoléculas feofitina A e clorofila B.	89
Figura 36 – Espectro fotoacústico resolvido na fase da folha de pitanga <i>in natura</i> em vermelho, obtido com o deslocamento computacional da fase de referência, ϑ_{ref} , por um ângulo de 15° . A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos sete centros de absorção, na forma de curvas gaussianas, obtidos com auxílio do método da segunda derivada.	90
Figura 37 – Espectros de absorção UV-Vis calculados em TDDFT usando-se o funcional CAMB3LYP das biomoléculas cianidina-3-glicosídeo na curva ciano, cianidina-3-malonilglucosídeo na curva laranja, pelargonidina-3-glicosídeo na curva verde, pelargonidina-3-arabinosídeo na curva vinho e pelargonidina-3-galactosídeo na curva magenta.	92
Figura 38 – Espectro fotoacústico do morango <i>in natura</i> em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos catorze centros de absorção, na forma de curvas gaussianas, obtidos com auxílio do método da segunda derivada.	93
Figura 39 – Espectro fotoacústico da uva <i>red globe in natura</i> em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos cinco centros de absorção, na forma de funções gaussianas, obtidos com o auxílio do método da segunda derivada.	94
Figura 40 – Espectro fotoacústico de fase da uva <i>red globe in natura</i> em azul, barras de desvio padrão em cinza e espectro de fase com aplicação do filtro digital Savitzky-Golay para redução do ruído em preto. Destaque à região onde espera-se observar os principais centros de absorção para essa fruta na região visível.	96
Figura 41 – Espectro fotoacústico resolvido na fase da uva <i>red globe in natura</i> com um deslocamento computacional da fase de referência por um ângulo $\vartheta_{ref} = -31^\circ$. Destaque à larga banda de absorção centrada em 551 nm.	96

Figura 42 – Diagrama de blocos da fonte de radiação do espectrômetro fotoacústico com destaque ao espelho e seus parafusos de ajuste.	134
Figura 43 – Diagrama representando a posição ideal do espelho côncavo através da projeção dos arcos em um anteparo.	135
Figura 44 – Diagrama de blocos do aparato experimental com destaque à projeção do arco da lâmpada sobre a grade de difração depois do alinhamento das lentes do caminho óptico.	136
Figura 45 – Diagrama de blocos do aparato experimental utilizado na calibração do motor.	137
Figura 46 – Comprimento de onda λ medido quando o motor anda N Passos. O ajuste da reta foi utilizado no programa para controlar a posição da grade de difração.	138
Figura 47 – Diagrama de blocos da montagem experimental utilizada para realizar a calibração das curvas de frequência do modulador óptico OC-4000.	139
Figura 48 – Frequência do modulador, f , em função da tensão de entrada, U , para a chave seletora na primeira posição e ajuste linear dos dados experimentais.	140
Figura 49 – Frequência do modulador, f , em função da tensão de entrada, U , para a chave seletora na segunda posição e ajuste linear dos dados experimentais.	140

Lista de tabelas

Tabela 1 – Catalogação do centros de absorção observados nos extratos de folha de pitanga, feofitina A e clorofila B.	84
Tabela 2 – Catalogação dos centros de absorção observados no extrato de folha de pitanga em etanol através da técnica de espectroscopia fotoacústica e tentativa de identificação dos mesmos.	85
Tabela 3 – Catalogação dos centros de absorção observados no extrato de folha de pitanga em etanol depositado em papel branco através da técnica de espectroscopia fotoacústica e tentativa de identificação dos mesmos.	87
Tabela 4 – Catalogação dos centros de absorção observados na folha de pitanga <i>in natura</i> através da técnica de espectroscopia fotoacústica e tentativa de identificação dos mesmos.	90
Tabela 5 – Principais biomoléculas previstas para o morango e seus respectivos comprimentos de onda máximo de absorção [97].	91
Tabela 6 – Agrupamento dos máximos de absorção do morango em função das bandas de absorção.	93
Tabela 7 – Catalogação dos centros de absorção observados na uva <i>red globe in natura</i> através da técnica de espectroscopia fotoacústica com o auxílio do método da segunda derivada e dos principais picos de absorção das biomoléculas cianidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo observadas na literatura através da técnica de HPLC-DAD-ESI/MS.	95

Sumário

1	INTRODUÇÃO	25
2	O AMPLIFICADOR <i>LOCK-IN</i>	29
2.1	Detecção sensível à fase	30
2.2	O filtro passa-baixa	35
2.2.1	A constante de tempo, τ , e o <i>lock-in</i>	37
2.2.2	Função de transferência	39
2.2.3	O ruído térmico	43
2.3	O método da fase	49
3	A ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA	53
3.1	História da espectroscopia fotoacústica	55
3.2	O efeito fotoacústico	58
3.3	A equação de difusão de calor	59
3.4	O modelo unidimensional Rosencwaig-Gersho	61
3.5	O sinal fotoacústico	64
3.5.1	Importância da normalização do sinal fotoacústico	66
4	METODOLOGIA	69
4.1	Materiais	69
4.2	Instrumentos	69
4.3	Métodos	72
4.3.1	Método de preparação das amostras estudadas <i>in natura</i>	72
4.3.2	Método de extração das moléculas das folhas de pitanga	72
4.3.2.1	Método de evaporação do solvente	72
4.3.3	Método de análise numérica utilizando o módulo PAS-AjusteGauss	72
4.3.4	Simulações com o GAUSSIAN 09	74
5	RESULTADOS	77
5.1	Ácido ascórbico P.A.	80
5.2	Folha de Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>)	82
5.2.1	Diluída em etanol	83
5.2.2	Extrato em etanol depositado sobre papel branco	86
5.2.3	<i>In natura</i>	88
5.3	Morango (<i>Fragaria spp.</i>) <i>in natura</i>	91
5.4	Uva <i>red globe</i> (<i>Vitis vinifera</i> “<i>Red Globe</i>”) <i>in natura</i>	94

6	CONCLUSÕES	97
7	PERSPECTIVAS	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICES	111
	APÊNDICE A – PAS 1.0.7	113
	APÊNDICE B – PAS-AJUSTEGAUSS	127
	APÊNDICE C – CALIBRAÇÃO DO EXPERIMENTO E INTEGRA- ÇÃO DO <i>SOFTWARE</i> PAS 1.0.7 COM O MESMO	133
C.1	Alinhamento do espelho	134
C.2	Alinhamento das lentes	136
C.3	Integração do <i>software de controle e aquisição de dados</i>	137
C.3.1	Calibração do motor	137
C.3.2	Calibração do modulador óptico	138

1 Introdução

Atualmente é bem conhecido da comunidade científica que as biomoléculas são parte fundamental dos organismos vivos, estando presentes na composição celular e representando papel importante no auxílio de diversos processos químicos que ocorrem nas células [1]. Sua importância é tamanha que tem motivado a comunidade científica no estudo das mesmas e das suas propriedades que são de muito valor para a saúde humana [2, 3, 4, 5]. Elas são compostas principalmente por carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, fósforo e enxofre.

As biomoléculas estão diretamente ligadas com o metabolismo energético dos seres vivos e portanto sua manutenção no organismo é indispensável para conservação de uma boa saúde. As antocianinas, por exemplo, são um grupo de biomoléculas cuja presença num vegetal é caracterizada pela coloração que pode variar do vermelho ao violeta. Devido às suas propriedades antioxidantes que atuam contra os radicais livres, as antocianinas são aliadas importantes na prevenção de doenças cardiovasculares [6]. Outro grupo muito importante é o dos carotenoides, responsável pela coloração alaranjada em muitos vegetais e frutos. Os carotenoides também são agentes antioxidantes e seu consumo está associado à prevenção de doenças do câncer [7].

Diversas técnicas, como a espectroscopia Raman [8], de ressonância magnética nuclear (RMN) [9], de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR na sigla em inglês) [10], de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC na sigla em inglês) [11], dentre outras, vêm sendo utilizadas no estudo de biomoléculas, cada uma delas fornecendo um conjunto característico de informações. Contudo, todas essas técnicas apresentam algo em comum: a necessidade imprescindível da realização de uma preparação anterior ao experimento, ou seja, é necessário realizar algum procedimento de extração [12], alguns dos quais laboriosos, antes que o experimento possa ser realizado. Isso, por vezes, torna o resultado diferente do esperado, visto que as condições naturais da amostra em estudo foram alteradas quando da preparação.

Pensando nisso, este trabalho tem como objetivo a realização do estudo de alguns materiais como frutas e vegetais, que contêm biomoléculas, por meio da espectroscopia fotoacústica para identificação dessas biomoléculas. A espectroscopia fotoacústica tem se consolidado no meio científico como uma técnica que permite o estudo de diversos materiais de forma não destrutiva, em um amplo intervalo espectral e sem a necessidade primária de efetuar uma preparação prévia das amostras [13]. A abrangência da fotoacústica se estende desde a capacidade de se obter diretamente espectros de absorção óptica até a possibilidade de medição de parâmetros ópticos e térmicos associados ao material em

análise [14, 15, 16].

Diante disso, a motivação deste estudo repousa na caracterização de materiais que, em sua maioria, são comuns ao dia a dia de muitas pessoas como vegetais e frutas que comumente estão presentes em suas dietas alimentares. Também se fundamenta na veracidade de que os resultados aqui obtidos podem futuramente servir como base para novos estudos que influenciarão positivamente a qualidade de vida dessas pessoas.

Para a concretização desse estudo foi necessária a implementação de *softwares*, utilizando o Python¹, que otimizaram a realização, execução e obtenção dos dados do espectrômetro fotoacústico da Unidade Acadêmica de Física da Universidade Federal de Campina Grande. Isso tornou possível que a aquisição de dados fosse feita de forma totalmente automatizada, reduzindo possíveis erros resultantes da interferência humana quando da aquisição. Além disso, ferramentas de análise de dados foram criadas utilizando o Python para proporcionar um estudo mais completo dos dados experimentais obtidos, facilitando a interpretação dos mesmos.

Essas ferramentas, juntamente com o fato de a espectroscopia fotoacústica ser capaz de realizar um ensaio sem a necessidade de preparar a amostra, permitiram que fosse feito o importante estudo *in natura* de alguns materiais, sem o risco de eliminar ou alterar qualquer biomolécula quando dos processos de extração, preservando a real configuração do sistema. Dessa forma, foram estudados os espectros fotoacústicos de absorção com e sem a dependência da fase com o intuito de melhor caracterizar as bandas de absorção, esses resultados foram comparados com resultados da espectroscopia UV-Vis, de simulações usando a teoria da densidade funcional dependente do tempo e da literatura.

Este trabalho é composto por sete capítulos, sendo o primeiro deles esta introdução, e três apêndices. O **Capítulo 2**, intitulado O amplificador *lock-in*, descreve os princípios de funcionamento dessa importante ferramenta, detalhando a técnica de detecção sensível à fase, o filtro passa-baixa e o método da fase. O **Capítulo 3**, intitulado A Espectroscopia Fotoacústica, descreve a gênese da espectroscopia fotoacústica e apresenta a descrição teórica de Rosencwaig-Gersho para o efeito fotoacústico. O **Capítulo 4**, intitulado Metodologia, contém informações detalhadas sobre os materiais e métodos utilizados, assim como do aparato experimental e seu funcionamento. O **Capítulo 5**, intitulado Resultados, contém a apresentação e discussão dos dados experimentais obtidos. O **Capítulo 6**, intitulado Conclusões, finaliza o trabalho e contém as considerações finais acerca dos resultados obtidos. O **Capítulo 7**, intitulado Perspectivas, contém os anseios resultantes desta pesquisa. O **Apêndice A**, intitulado PAS 1.0.7, contém o código fonte do programa de controle e aquisição de dados PAS 1.0.7. O **Apêndice B**, intitulado PAS-AjusteGauss, contém o código fonte do pacote de tratamento de dados PAS-AjusteGauss. O **Apêndice C**, intitulado Calibração do experimento e integração do *software* PAS 1.0.7 com o mesmo,

¹ <<https://www.python.org>>

contém informações mais detalhadas sobre o experimento e sua integração com o *software* de controle e aquisição de dados.

2 O amplificador *lock-in*

Os sinais elétricos estão presentes em quase todas as partes de nosso cotidiano, eles estão nas tomadas, nos rádios, nos *smartphones* e em muitos outros aparelhos. No contexto da ciência experimental esses sinais são portadores de informações associadas aos sistemas físicos. O conhecimento e o domínio de técnicas que permitam quantificar esses sinais são de extrema importância para que o sistema físico correspondente seja devidamente caracterizado.

O conjunto de tais técnicas constitui o processamento de sinais e nada mais é do que a coleção de ferramentas eletrônicas e matemáticas que permitem a aquisição e manipulação desses sinais com o objetivo de torná-los mais apropriados para determinados fins. Essas ferramentas têm permitido que aqueles sinais que se caracterizam por sua baixa amplitude sejam descobertos e estudados, revelando segredos que por muito tempo estiveram ocultos.

O amplificador *lock-in* sensível à fase é basicamente um voltímetro AC (*alternating current*) aprimorado que recebe como entrada, além do sinal de interesse, um sinal de referência conhecido. O *lock-in* retorna como saída apenas a parte do sinal que está sincronizada com a referência e despreza todo o resto, sendo assim possível medir sinais de alguns nanovolts imersos em sinais milhares de vezes maiores [17].

Seu uso é de suma importância em diversos ramos da ciência experimental, que trabalham com sinais de pequena amplitude imersos em ruído, como é o caso da espectroscopia fotoacústica [18], tema central deste trabalho.

2.1 Detecção sensível à fase

Existem dois tipos de amplificador *lock-in*, o de uma fase e o de duas fases. O primeiro fornece como resposta um sinal totalmente dependente da fase do sinal da referência, o que é muito útil quando se deseja estudar um sinal que não muda sua fase ao longo do tempo, enquanto que o segundo oferece independência da fase [19], embora também forneça um componente dependente da fase como será visto adiante.

Na Figura 1 é apresentado o diagrama de blocos do amplificador *lock-in* de uma fase.

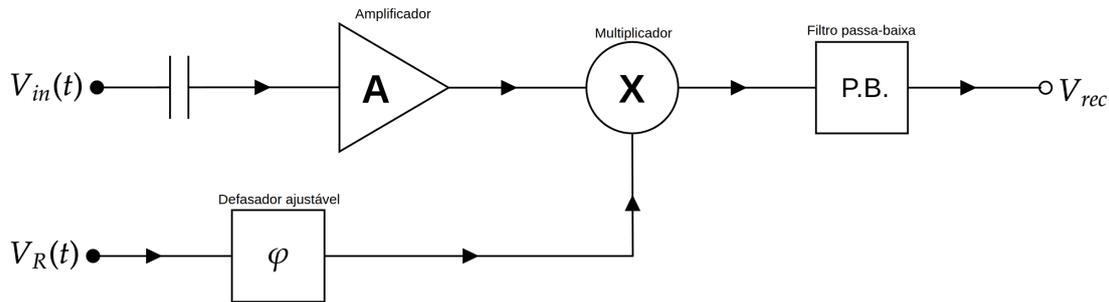


Figura 1 – Diagrama de blocos da detecção sensível à fase. $V_{in}(t)$ é o sinal de interesse que será estudado, $V_R(t)$ é o sinal de referência e V_{rec} é o sinal recuperado.

Fonte: Autoria própria

O princípio de funcionamento do *lock-in* é relativamente simples e será descrito a seguir, o mesmo recebe como entrada dois sinais, o primeiro é o sinal de interesse, $V_{in}(t)$, o qual deseja-se estudar e o segundo consiste de um sinal totalmente conhecido, o sinal de referência, $V_R(t)$. O sinal de interesse inicialmente passa por um capacitor que atua como filtro com o objetivo de remover qualquer componente DC (*direct current*) presente no sinal, deseja-se trabalhar apenas com o componente AC do sinal. Geralmente o sinal de interesse é muito pequeno e é conveniente amplificá-lo antes de realizar operações com o mesmo. O sinal de referência passa através de um defasador ajustável para que a diferença de fase, φ , possa ser adequadamente ajustada. Os dois sinais são então multiplicados e qualquer componente DC resultante, V_{rec} , é extraída através de um filtro passa-baixa.

Deseja-se medir a amplitude desconhecida, V_0 , de um sinal de interesse muito pequeno que tem a forma

$$V_{in}(t) = V_0 \sin(\omega_0 t + \vartheta_0),$$

onde $\omega_0 = 2\pi f_0$ é sua frequência angular e f_0 sua frequência natural. Arbitrariamente aplica-se um fator de amplificação, G , ao sinal de interesse de modo que ele assume a forma

$$V_{in}(t) = GV_0 \sin(\omega_0 t + \vartheta_0). \quad (2.1)$$

Seja também um sinal de referência na forma

$$V_R(t) = V_{ref} \sin(\Omega t + \vartheta_{ref}), \quad (2.2)$$

onde V_{ref} é sua amplitude, $\Omega = 2\pi f_{ref}$ sua frequência angular e f_{ref} sua frequência natural. Defasando o sinal de referência por uma fase φ com relação ao sinal de interesse vem que,

$$V_R(t) = V_{ref} \sin(\Omega t + \vartheta_{ref} + \varphi). \quad (2.3)$$

O produto do sinal de interesse, [Equação 2.1](#), e da referência, [Equação 2.3](#), é

$$V_{in}(t)V_R(t) = GV_0 \sin(\omega_0 t + \vartheta_0)V_{ref} \sin(\Omega t + \vartheta_{ref} + \varphi),$$

que usando a identidade trigonométrica $\sin(a)\sin(b) = \frac{1}{2}(\cos(a-b) - \cos(a+b))$ pode ser reescrito como

$$V_{in}(t)V_R(t) = \frac{GV_0V_{ref}}{2} \left[\cos((\omega_0 - \Omega)t + \vartheta - \varphi) - \cos((\omega_0 + \Omega)t + \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi) \right], \quad (2.4)$$

onde $\vartheta = \vartheta_0 - \vartheta_{ref}$ é a diferença de fase entre o sinal de interesse e a referência.

Se o sinal de interesse possui frequência, f_0 , distinta da frequência de referência, f_{ref} , então o produto $V_{in}(t)V_R(t)$ oscila no tempo com média temporal nula,

$$\begin{aligned} \langle V_{in}(t)V_R(t) \rangle &= \frac{GV_0V_{ref}}{2} \left[\langle \cos((\omega_0 - \Omega)t + \vartheta - \varphi) \rangle - \langle \cos((\omega_0 + \Omega)t + \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi) \rangle \right] \\ &= 0. \end{aligned}$$

Se o sinal de interesse possui frequência igual à frequência de referência, $\omega_0 = \Omega$, então a [Equação 2.4](#) se torna

$$V_{in}(t)V_R(t) = \frac{GV_0V_{ref}}{2} \left[\cos(\vartheta - \varphi) - \cos(2\Omega t + \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi) \right], \quad (2.5)$$

com média temporal

$$\begin{aligned} \langle V_{in}(t)V_R(t) \rangle &= \frac{GV_0V_{ref}}{2} \left[\langle \cos(\vartheta - \varphi) \rangle - \langle \cos(2\Omega t + \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi) \rangle \right] \\ &= \frac{GV_0V_{ref}}{2} \cos(\vartheta - \varphi) \equiv V_{rec}, \end{aligned} \quad (2.6)$$

onde V_{rec} é a amplitude recuperada.

A [Equação 2.6](#) nada mais é que a parte DC da [Equação 2.5](#). Ajustando-se adequadamente o ganho, G , a amplitude do sinal de referência, V_{ref} , e a fase, φ , ter-se-á uma medida direta da amplitude do sinal de interesse, V_{in} , e a quantidade V_0 será recuperada. Assim, ajustando-se o experimento para que a frequência de referência oscile na mesma frequência do sinal de interesse, é garantido que sinais indesejados em outras frequências sejam rejeitados. Mesmo ruídos que oscilem com a mesma frequência do sinal

de referência, mas possuem uma fase dependente do tempo terão uma média temporal nula e não terão influência significativa sobre a medida.

Na [Figura 2](#) é apresentado o diagrama de blocos do *lock-in* de duas fases.

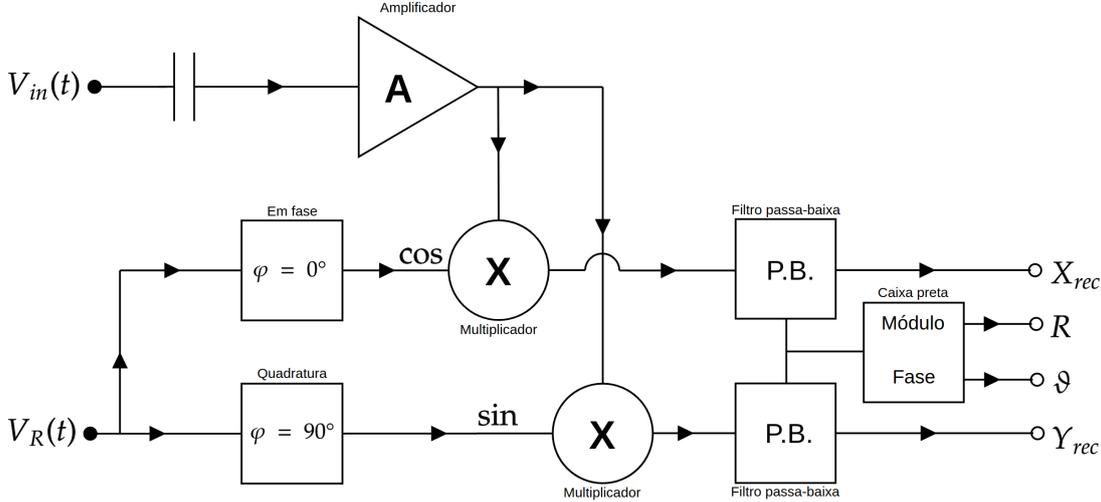


Figura 2 – Diagrama de blocos do amplificador *lock-in* de duas fases. $V_{in}(t)$ é o sinal de interesse que será estudado, X_{rec} é o componente “em fase” do sinal recuperado, $V_R(t)$ é o sinal de referência, R é o módulo do sinal recuperado, ϑ é a diferença de fase entre o sinal de interesse e a referência, e Y_{rec} é o componente “em quadratura” do sinal recuperado.

Fonte: Autoria própria

Seu princípio de funcionamento é análogo ao *lock-in* de uma fase, apresentado anteriormente, sendo ele mesmo uma evolução daquele. O *lock-in* de uma fase geralmente trabalha como uma defasagem de fase, φ , arbitrária que é ajustada conforme a necessidade. Por outro lado, o amplificador *lock-in* de duas fases trabalha com suas fases fixas e retorna dois componentes do sinal recuperado. A primeira defasagem é de $\varphi = 0^\circ$ e portanto diz-se que está “em fase”. A segunda defasagem é de $\varphi = 90^\circ$ e diz-se que está “em quadratura”. Depois de passar pelo amplificador, uma amostra do sinal de interesse é multiplicada pelo sinal de referência defasado em $\varphi = 0^\circ$, passa então pelo filtro passa-baixa e resulta no componente “em fase”, X_{ref} . De forma análoga, uma amostra do sinal de interesse é multiplicada, depois de passar pelo amplificador, pelo sinal de referência defasado em $\varphi = 90^\circ$, passa pelo filtro passa-baixa e resulta no componente “em quadratura”, Y_{ref} . No bloco rotulado de caixa preta são realizadas operações matemáticas com os componentes “em fase” e “em quadratura” com o fim de calcular o módulo do sinal de interesse, R , e a diferença de fase entre o sinal de interesse e a referência, ϑ .

Fazendo $\varphi = 0^\circ$ na [Equação 2.6](#) obtém-se que

$$\langle V_{in}(t)V_R(t) \rangle = \frac{GV_0V_{ref}}{2} \cos(\vartheta) \equiv X_{rec}, \quad (2.7)$$

analogamente, fazendo $\varphi = 90^\circ$ na [Equação 2.6](#) obtém-se que

$$\begin{aligned} \langle V_{in}(t)V_R(t) \rangle &= \frac{GV_0V_{ref}}{2} \cos(\vartheta - 90^\circ) \\ &= \frac{GV_0V_{ref}}{2} \sin(\vartheta) \equiv Y_{rec}, \end{aligned} \quad (2.8)$$

onde foi usada a identidade trigonométrica $\cos(a - b) = \cos(a)\cos(b) + \sin(a)\sin(b)$.

É conveniente tratar esses componentes no plano complexo definindo-se o vetor complexo, \vec{Z} , como

$$\vec{Z} = X_{rec} + iY_{rec}, \quad (2.9)$$

onde X_{rec} é a parte real e Y_{rec} é a parte complexa de \vec{Z} .

Na [Figura 3](#) é apresentada a decomposição dos componentes real e imaginário do sinal de interesse no plano complexo, com módulo, R , e fase, ϑ .

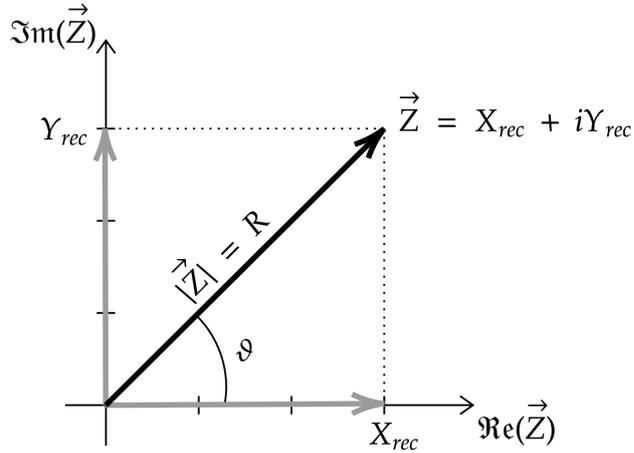


Figura 3 – Decomposição do sinal de interesse no plano complexo. \vec{Z} é o vetor complexo composto pelo componente “em fase”, X_{rec} , e “em quadratura”, Y_{rec} , do sinal de interesse. R é o módulo do sinal de interesse e ϑ é a fase entre o sinal de interesse e a referência.

Fonte: Autoria própria

O módulo da [Equação 2.9](#) é dado por

$$\begin{aligned} |\vec{Z}| &= \sqrt{Y_{rec}^2 + X_{rec}^2} \\ &= \sqrt{\left(\frac{GV_0V_{ref}}{2}\right)^2 \cos^2(\vartheta) + \left(\frac{GV_0V_{ref}}{2}\right)^2 \sin^2(\vartheta)} \\ &= \sqrt{\left(\frac{GV_0V_{ref}}{2}\right)^2 (\cos^2(\vartheta) + \sin^2(\vartheta))} \\ &= \frac{GV_0V_{ref}}{2} \equiv R, \end{aligned} \quad (2.10)$$

onde R representa o módulo do sinal recuperado.

Da Figura 3 tem-se que a fase, ϑ , é dada por

$$\vartheta = \arctan2(Y_{rec}, X_{rec}), \quad (2.11)$$

onde a função $\arctan2(y, x)$ é definida como

$$\arctan2(y, x) = \begin{cases} \arctan\left(\frac{y}{x}\right) & \text{se } x > 0, \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) + \pi & \text{se } x < 0 \text{ e } y \geq 0, \\ \arctan\left(\frac{y}{x}\right) - \pi & \text{se } x < 0 \text{ e } y < 0, \\ +\frac{\pi}{2} & \text{se } x = 0 \text{ e } y > 0, \\ -\frac{\pi}{2} & \text{se } x = 0 \text{ e } y < 0, \\ \text{indefinida} & \text{se } x = 0 \text{ e } y = 0. \end{cases}$$

Com o amplificador *lock-in* de duas fases é possível realizar a medida direta do módulo amplificado do sinal de interesse, R , sem a dependência da fase, além de medir a diferença de fase, ϑ , entre o sinal de interesse e a referência. Essas características conferem muita versatilidade ao amplificador e o torna uma ferramenta útil na elaboração de muitos experimentos.

2.2 O filtro passa-baixa

O filtro passa-baixa é a montagem eletrônica que permite a passagem das baixas frequências enquanto atenua as altas.

Na [Figura 4](#) é apresentado o diagrama do filtro passa-baixa passivo de primeira ordem formado por um resistor de resistência R , e um capacitor de capacitância C .

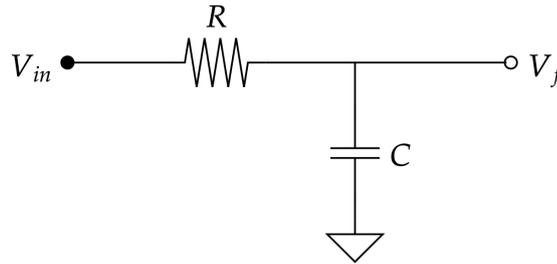


Figura 4 – Diagrama do filtro passa-baixa passivo de primeira ordem.

Fonte: Autoria própria

A equação que descreve a dinâmica do circuito da [Figura 4](#) é

$$RI(t) + \frac{q(t)}{C} = V_{in}(t), \quad (2.12)$$

onde $I(t)$ é a corrente que passa através do resistor, $q(t)$ é a carga acumulada no capacitor e $V_{in}(t)$ é uma fonte arbitrária.

A tensão sobre o capacitor é $V_C(t) = q(t)/C$, então a carga pode ser reescrita como

$$q(t) = CV_C(t). \quad (2.13)$$

Usando a [Equação 2.13](#) e considerando que a corrente, $I(t)$, nada mais é que a taxa de variação da carga, $q(t)$, então a [Equação 2.12](#) pode ser reescrita como

$$\frac{d}{dt}V_C(t) + \frac{V_C(t)}{\tau} = \frac{V_{in}(t)}{\tau}, \quad (2.14)$$

onde $\tau = RC$ é a constante de tempo do filtro.

Fazendo a mudança de variável $y(t) = e^{t/\tau}V_C(t)$ a [Equação 2.14](#) obtém a forma

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left(y(t)e^{-t/\tau} \right) + \frac{y(t)e^{-t/\tau}}{\tau} &= \frac{V_{in}(t)}{\tau} \\ \Rightarrow \frac{d}{dt}y(t) &= \frac{e^{-t/\tau}V_{in}(t)}{\tau}, \end{aligned}$$

com solução geral

$$\begin{aligned} y(t) &= y(0) + \frac{1}{\tau} \int_0^t e^{t'/\tau} V_{in}(t') dt' \\ \Rightarrow V_C(t) &= V_C(0)e^{-t/\tau} + \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \int_0^t e^{t'/\tau} V_{in}(t') dt'. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Considere uma fonte arbitrária, $V_{in}(t)$, na forma da [Equação 2.5](#)

$$V_{in}(t) = \mathfrak{A} \left[\cos(\vartheta - \varphi) - \cos(Wt + \Theta) \right],$$

onde $\mathfrak{A} = \frac{GV_0 V_{ref}}{2}$, $W = 2\Omega$ e $\Theta = \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi$, então a tensão sobre o capacitor será descrita pela [Equação 2.15](#) como

$$\begin{aligned} V_C(t) &= V_C(0)e^{-t/\tau} + \frac{\mathfrak{A}e^{-t/\tau}}{\tau} \int_0^t e^{t'/\tau} \left[\cos(\vartheta - \varphi) - \cos(Wt' + \Theta) \right] dt' \\ &= V_C(0)e^{-t/\tau} + \frac{\mathfrak{A}e^{-t/\tau}}{\tau} \left[\cos(\vartheta - \varphi) \int_0^t e^{t'/\tau} dt' - \int_0^t e^{t'/\tau} \cos(Wt' + \Theta) dt' \right] \\ &= V_C(0)e^{-t/\tau} + \frac{\mathfrak{A}e^{-t/\tau}}{\tau} \left[\cos(\vartheta - \varphi) \left[\tau e^{t/\tau} - \tau \right] - \int_0^t e^{t'/\tau} \cos(Wt' + \Theta) dt' \right]. \end{aligned} \quad (2.16)$$

A integral da [Equação 2.16](#) pode ser resolvida usando-se a notação complexa como segue:

$$\begin{aligned} \int_0^t e^{t'/\tau} \cos(Wt' + \Theta) dt' &= \Re \left\{ \int_0^t e^{t'/\tau + (Wt' + \Theta)j} dt' \right\} \\ &= \Re \left\{ e^{j\Theta} \int_0^t e^{(1/\tau + jW)t'} dt' \right\} \\ &= \Re \left\{ \tau e^{j\Theta} \left[\frac{e^{(1/\tau + jW)t} - 1}{1 - jW\tau} \right] \right\} \\ &= \frac{\left(W\tau^2 \sin(Wt + \Theta) + \tau \cos(Wt + \Theta) \right) e^{t/\tau}}{W^2\tau^2 + 1} - \frac{W\tau^2 \sin(\Theta) + \tau \cos(\Theta)}{W^2\tau^2 + 1}, \end{aligned}$$

e a [Equação 2.16](#) pode ser reescrita, usando o resultado anterior, como

$$\begin{aligned} V_C(t) &= V_C(0)e^{-t/\tau} + \mathfrak{A} \left[\cos(\vartheta - \varphi) \left[1 - e^{-t/\tau} \right] \right. \\ &\quad \left. - \frac{W\tau \sin(Wt + \Theta) + \cos(Wt + \Theta)}{W^2\tau^2 + 1} + \frac{\left[W\tau \sin(\Theta) + \cos(\Theta) \right] e^{-t/\tau}}{W^2\tau^2 + 1} \right]. \end{aligned} \quad (2.17)$$

Na [Figura 5](#) é apresentado o gráfico da [Equação 2.48](#), considerando que $V_C(0) = 0$, $\vartheta = \varphi = 0$, $W = 2\Omega$ e $\Theta = 0$ com $\vartheta_0 = \vartheta_{ref} = 0$.

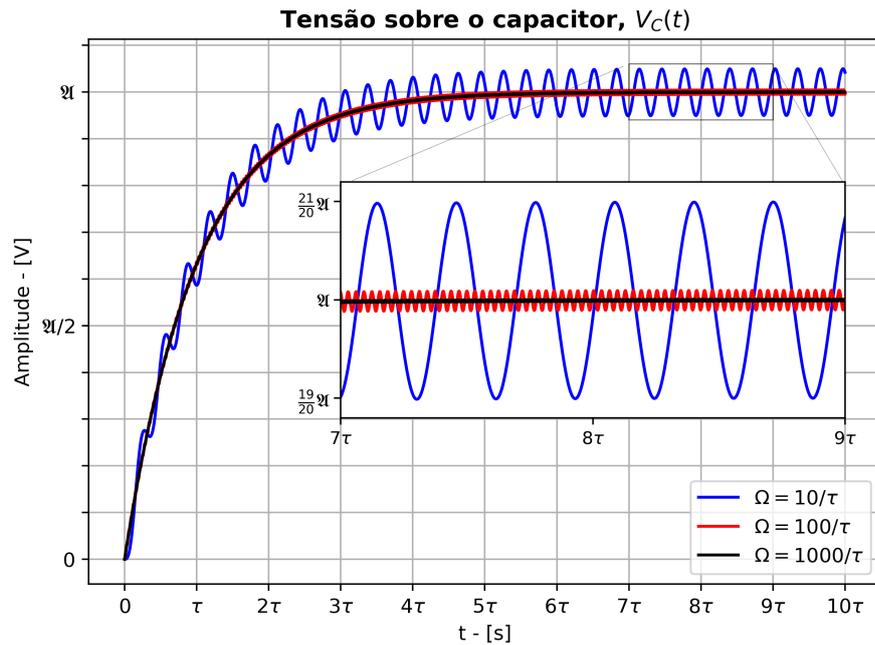


Figura 5 – Gráfico da tensão sobre o capacitor em função do tempo, $V_C(t)$, de acordo com a Equação 2.48, onde $V_C(0) = 0$, $\vartheta = \varphi = 0$, $W = 2\Omega$ e $\Theta = 0$ com $\vartheta_0 = \vartheta_{ref} = 0$.

Fonte: Autoria própria

Como o sinal de entrada estava em fase com a referência e não houve defasagem dessa, obteve-se a máxima recuperação da amplitude \mathfrak{A} dentro dos limites de atenuação para frequências superiores à frequência de corte do filtro usado.

2.2.1 A constante de tempo, τ , e o *lock-in*

A constante de tempo, τ , é um parâmetro muito importante que deve ser observado na construção do filtro RC pois está diretamente relacionado com a frequência de corte do mesmo e com a estabilização do sinal à saída do filtro. Essa última característica é de importância fundamental quando pretende-se realizar medidas à saída do filtro como é o caso do amplificador *lock-in*. A confiabilidade dessas medidas tem alta correlação com a observância da constante de tempo utilizada no experimento. Sua inobservância introduzirá erros às medidas que poderão comprometer toda a análise posterior.

Para melhor compreensão da significância da observação da constante de tempo durante a aquisição de dados à saída do filtro RC é conveniente estudar a resposta desse à uma função degrau que representa uma súbita mudança na amplitude do sinal de entrada em $t = 0$,

$$V_{in}(t) = \begin{cases} A & \text{se } t < 0, \\ B & \text{se } t \geq 0, \end{cases} \quad (2.18)$$

onde A e B são constantes.

Aplicando a [Equação 2.18](#) à [Equação 2.15](#) e fazendo as devidas adaptações, obtém-se para $t < 0$

$$\begin{aligned} V_C(t) &= \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \int_{-\infty}^t e^{t'/\tau} A dt' \quad , t < 0 \\ &= A, \quad t < 0, \end{aligned}$$

resultado esperado dado que a amplitude de entrada sempre foi A . Analogamente, para $t \geq 0$ tem-se que

$$\begin{aligned} V_C(t) &= \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \left[\int_{-\infty}^0 e^{t'/\tau} A dt' + \int_0^t e^{t'/\tau} B dt' \right], \quad t \geq 0 \\ &= \frac{e^{-t/\tau}}{\tau} \left[\tau A + \tau B (e^{t/\tau} - 1) \right], \quad t \geq 0 \\ &= (A - B)e^{-t/\tau} + B, \quad t \geq 0. \end{aligned} \tag{2.19}$$

Deseja-se encontrar o tempo, t , decorrido desde que houve a súbita mudança na amplitude do sinal à entrada do filtro para que a sua saída retorne um valor aceitável da nova amplitude desse sinal. O quão aceitável será esse valor dependerá do grau de precisão requerido pelo experimento.

Suponha que ε seja o erro fracionário máximo tolerado para um dado experimento, logo

$$\begin{aligned} \left| \frac{V_C(t) - B}{B} \right| &\leq \varepsilon, \quad t \geq 0 \\ \Rightarrow \left| \frac{A - B}{B} \right| e^{-t/\tau} &\leq \varepsilon, \quad t \geq 0. \\ &\Rightarrow t \geq \tau \ln \left| \frac{A - B}{\varepsilon B} \right|, \quad t \geq 0. \end{aligned} \tag{2.20}$$

A [Equação 2.20](#) determina o tempo de espera, t , necessário até que a tensão no capacitor esteja estabilizada de modo a se obter uma medida dentro dos limites da precisão desejada. Na [Figura 6](#) são apresentados a amplitude normalizada do tempo, t , que deve ser esperado para que o sistema evolua até alcançar um erro fracionário $\leq \varepsilon$ e o domínio das variáveis A e B para que a desigualdade da [Equação 2.20](#) seja satisfeita.

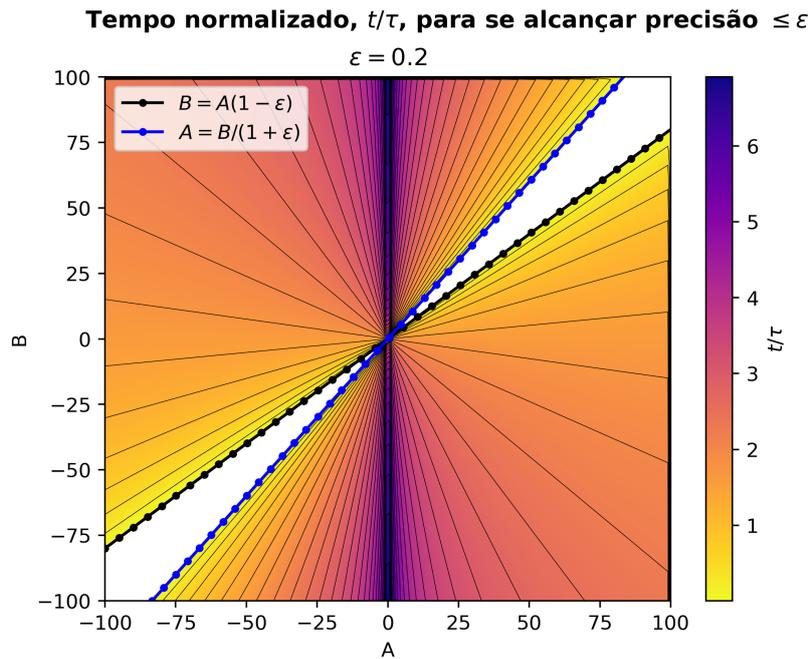


Figura 6 – Amplitude normalizada do tempo de acordo com a [Equação 2.20](#) e domínio das variáveis A e B para um erro percentual ≤ 0.2 .

Fonte: Autoria própria

É conveniente analisar a [Equação 2.20](#) no limite em que $B \gg A$, nesse limite o tempo de espera será de aproximadamente $t \geq \tau \ln(1/\varepsilon)$. Se o erro fracional máximo desejado for de 0.006, então o tempo de espera será de aproximadamente $t \geq 5\tau$.

2.2.2 Função de transferência

Aplicando a primeira lei de Kirchhoff ao circuito da [Figura 4](#) obtém-se a relação complexa

$$\begin{aligned} \frac{V_{in} - V_f}{Z_R} &= \frac{V_f}{Z_C} \\ \Rightarrow \frac{V_{in}}{Z_R} &= V_f \left(\frac{Z_R + Z_C}{Z_R Z_C} \right) \\ \Rightarrow \frac{V_f}{V_{in}} &= \frac{Z_C}{Z_R + Z_C}, \end{aligned} \quad (2.21)$$

onde Z_R e Z_C são as impedâncias do resistor, R , e do capacitor, C , respectivamente.

A [Equação 2.21](#) é a função de transferência complexa do filtro passa baixa. Assumindo-se que os componentes que compõem o filtro são ideais, sua função de transferência pode ser reescrita como

$$\frac{V_f}{V_{in}} = \frac{X_C}{R + X_C},$$

onde $X_C = \frac{1}{j\omega C}$, e seu módulo é dado por

$$\left| \frac{V_f}{V_{in}} \right| = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}}, \quad (2.22)$$

onde foi usado que $\tau = RC$.

A frequência de corte, f_c , é definida como sendo a frequência para qual o filtro retorna um ganho de $-3dB$. Aplicando essa definição na [Equação 2.22](#) obtém-se a frequências de corte para o filtro passa-baixa

$$\begin{aligned} \frac{1}{\sqrt{2}} &= \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega_c\tau)^2}} \\ \Rightarrow 2 &= 1 + (\omega_c\tau)^2 \\ \Rightarrow \omega_c &= \frac{1}{\tau} \Leftrightarrow f_c = \frac{1}{2\pi\tau}, \end{aligned} \quad (2.23)$$

onde foi usado que $\omega_c = 2\pi f_c$.

Na [Figura 7](#) é apresentado o ganho à saída do filtro passa baixa de primeira ordem de acordo com a [Equação 2.22](#) com destaque ao ganho da frequência de corte, $-3dB$.

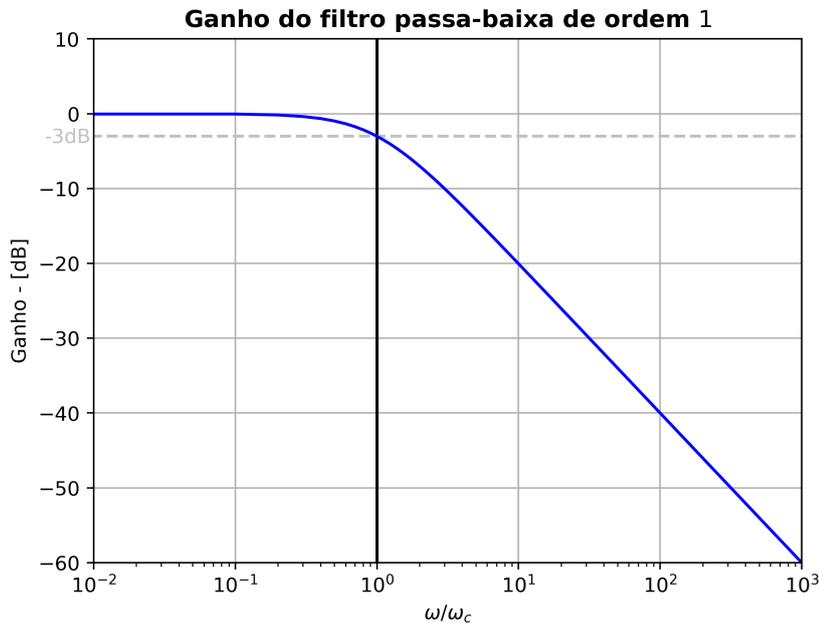


Figura 7 – Gráfico do ganho à saída do filtro-passa baixa de primeira ordem em função da frequência de acordo com a [Equação 2.22](#) e destaque ao ganho na frequência de corte. O eixo das abscissas foi normalizado pela frequência de corte do filtro, ω_c .

Fonte: Autoria própria

Em muitas situações o filtro passa-baixa de primeira ordem não é capaz de atenuar significativamente as frequências indesejadas que estão misturadas ao sinal de interesse,

especialmente se essas forem próximas da frequência de corte, com o fim de atenuar essas frequências é adequado o uso de um filtro de ordem superior que pode ser obtido adicionando-se novos estágios em cascata ao filtro de primeira ordem. O filtro resultante é de análise tediosa, portanto é conveniente, neste trabalho, adicionar um seguidor de tensão [20] unitário entre cada estágio do filtro conforme a [Figura 8](#) e assim evitar os efeitos de carga.

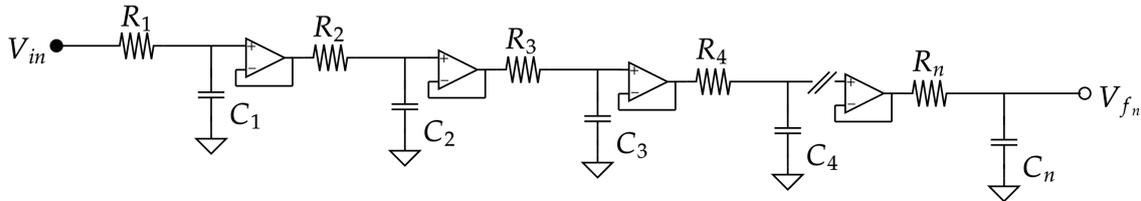


Figura 8 – Diagrama do filtro passa-baixa de ordem n com seguidor de tensão em cada estágio para evitar os efeitos de carga.

Fonte: Autoria própria

A função de transferência do circuito da [Figura 8](#) é dado pelo produto da função de transferência de cada estágio singular, na forma da [Equação 2.22](#), como

$$\left| \frac{V_f^n}{V_{in}} \right| = \prod_{i=1}^n \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau_i)^2}}, \quad (2.24)$$

onde $\tau_i = R_i C_i$.

É conveniente, neste trabalho, estudar o caso em que cada estágio do filtro possui a mesma constante de tempo, $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau$, então a [Equação 2.24](#) assume a forma

$$\left| \frac{V_f^n}{V_{in}} \right| = \frac{1}{\sqrt[n]{1 + (\omega\tau)^2}}, \quad (2.25)$$

e a frequência de corte é dada por

$$\begin{aligned} \frac{1}{\sqrt{2}} &= \frac{1}{\sqrt[n]{1 + (\omega_c^n \tau)^2}} \\ \Rightarrow 2^{1/n} &= 1 + (\omega_c^n \tau)^2 \\ \Rightarrow \omega_c^n &= \frac{\sqrt{2^{1/n} - 1}}{\tau} \Leftrightarrow f_c^n = \frac{\sqrt{2^{1/n} - 1}}{2\pi\tau}. \end{aligned} \quad (2.26)$$

Na [Figura 9](#) é apresentado o ganho à saída do filtro passa-baixa de ordem n, considerando que cada estágio tem a mesma constante de tempo, de acordo com a [Equação 2.25](#).

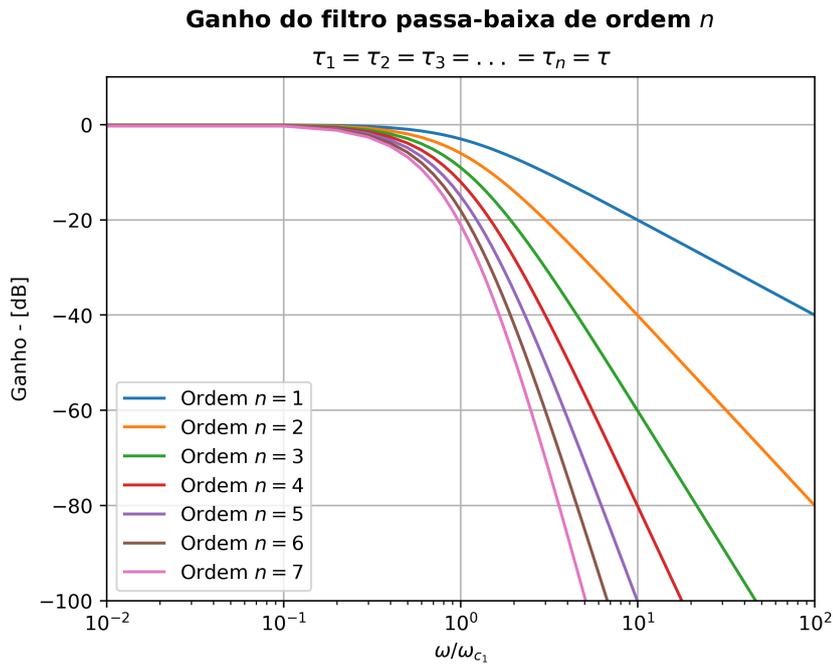


Figura 9 – Gráfico do ganho à saída do filtro passa-baixa de ordem n para $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau$ em função da frequência de acordo com a [Equação 2.25](#). O eixo das abscissas foi normalizado pela frequência de corte do filtro, ω_c .

Fonte: Autoria própria

É fácil demonstrar que fixando-se a constante de tempo, τ , para o filtro equivalente então a constante de tempo de cada estágio do filtro será dada por $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau\sqrt{2^{1/n} - 1}$, sendo n a ordem do filtro, portanto a função de transferência do filtro equivalente será dada por

$$\left| \frac{V_f^n}{V_{in}} \right| = \frac{1}{\sqrt[n]{1 + (\omega\tau_n)^2}} \quad (2.27)$$

e sua frequência de corte por

$$\omega_c^n = \frac{1}{\tau} \Leftrightarrow f_c^n = \frac{1}{2\pi\tau}.$$

Na [Figura 10](#) é apresentado o ganho à saída do filtro passa-baixa de ordem n , para $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau\sqrt{2^{1/n} - 1}$, de acordo com a [Equação 2.27](#).

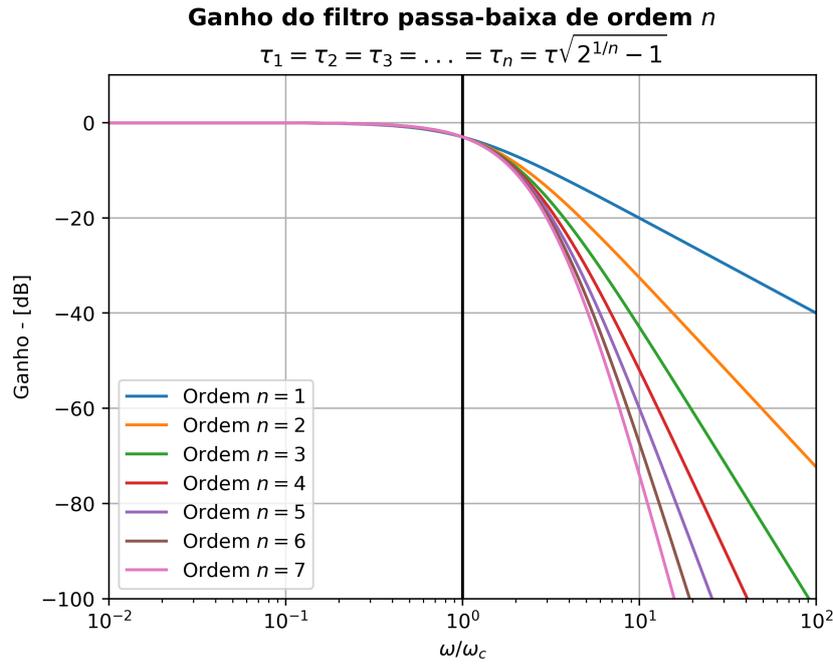


Figura 10 – Gráfico do ganho à saída do filtro passa-baixa de ordem n para $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_n = \tau\sqrt{2^{1/n} - 1}$ em função da frequência de acordo com a [Equação 2.27](#). O eixo das abscissas foi normalizado pela frequência de corte do filtro, ω_c .

Fonte: Autoria própria

2.2.3 O ruído térmico

Segundo o teorema da equipartição [21] a energia média, acumulada no capacitor, no equilíbrio térmico é dada por

$$\left\langle \frac{CV_C^2(t)}{2} \right\rangle = \frac{1}{2}k_B T, \quad (2.28)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura.

A equação que descreve a dinâmica do circuito da [Figura 4](#) alimentado por uma fonte de ruído $V_{in}(t) = f(t)$ é dado pela [Equação 2.14](#) como

$$\frac{d}{dt}V_C(t) + \frac{V_C(t)}{\tau} = \frac{f(t)}{\tau}, \quad (2.29)$$

tem solução geral

$$V_C(t) = V_C(0)e^{-t/\tau} + \frac{1}{\tau} \int_0^t e^{-(t-s)/\tau} f(s) ds \quad (2.30)$$

e sua função de autocorrelação média, desprezando-se os transientes, é

$$\langle V_C(t')V_C(t) \rangle = \frac{1}{\tau^2} \int_0^t \int_0^{t'} e^{-(t-s)/\tau} e^{-(t'-s')/\tau} \langle f(s')f(s) \rangle ds ds'. \quad (2.31)$$

Assumindo que a fonte de ruído, $f(t)$, fornece ruído branco gaussiano com média nula, $\langle f(t) \rangle = 0$, implica que o ruído seja delta-correlacionado

$$\langle f(t')f(t) \rangle = \sigma^2 \delta(t' - t), \quad (2.32)$$

onde o fator σ^2 é a variância do ruído dado que sua média é nula. Sua densidade espectral é dada pela transformada de Fourier, usando-se as relações de Wiener-Khintchine [21], da Equação 2.32:

$$\begin{aligned} J_{\text{ruído}}(\omega) &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \langle f(t+s)f(t) \rangle e^{-j\omega s} ds \\ &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \sigma^2 \delta(s) e^{-j\omega s} ds \\ &= \frac{\sigma^2}{2\pi}, \end{aligned} \quad (2.33)$$

onde foi usada a mudança de variável $t' - t = s$ e tem unidade de $\frac{V^2}{\text{rad/s}}$. Esse resultado significa que esse processo tem densidade espectral constante para todas as frequências, daí o nome “ruído branco” em analogia à luz branca.

Na Figura 11 é apresentado a série temporal, gerada numericamente através do módulo Numpy¹ do Python, do ruído branco, assim como seu histograma com ajuste gaussiano da sua distribuição de amplitude

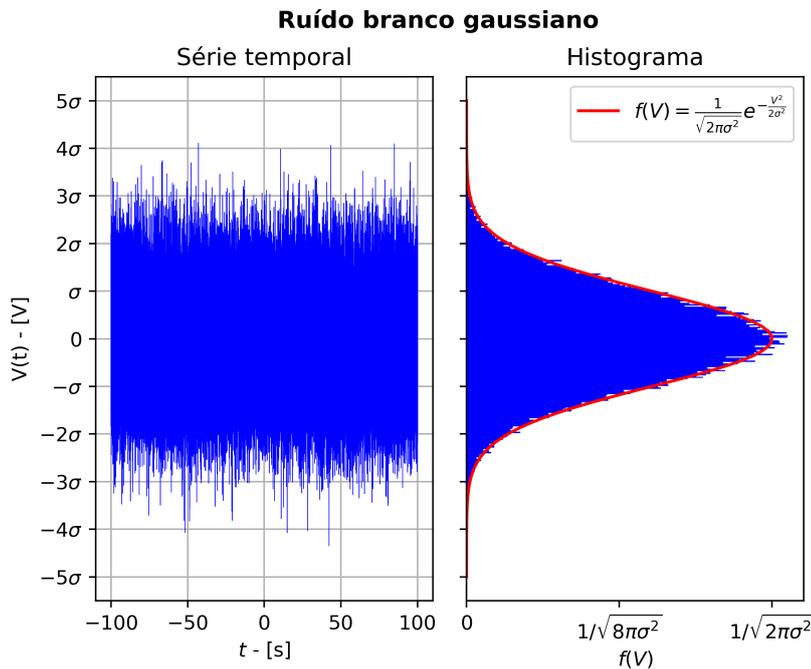


Figura 11 – Série temporal do ruído branco gaussiano gerado numericamente com 2^{16} pontos à esquerda e histograma em azul com ajuste da distribuição gaussiana da sua amplitude em vermelho à direita.

Fonte: Autoria própria

e na Figura 12 é apresentada a sua autocorrelação com ajuste dado pela Equação 2.32.

¹ <<https://numpy.org/>>

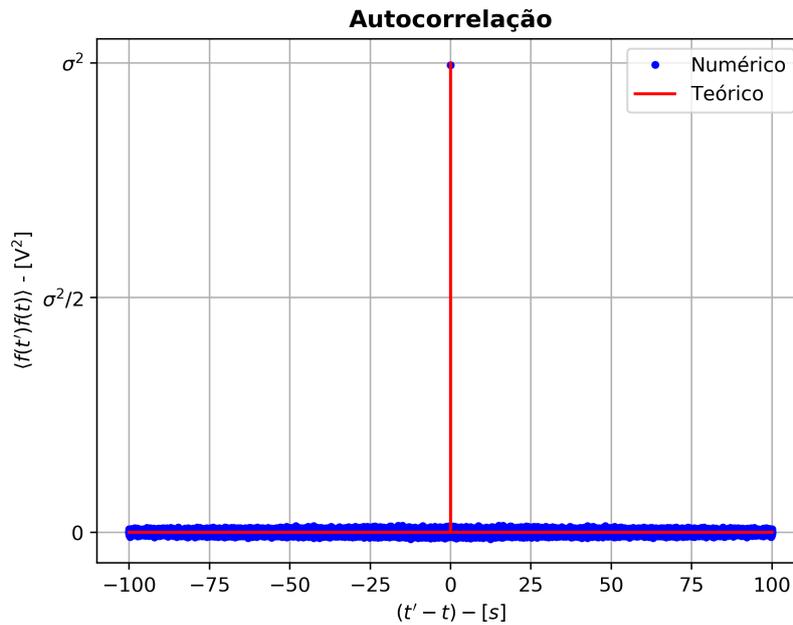


Figura 12 – Gráfico da autocorrelação numérica da série temporal do ruído branco, apresentado na Figura 11, em azul, e ajuste teórico dado pela Equação 2.32 em vermelho.

Fonte: Autoria própria

A Equação 2.31 pode ser reescrita, usando a definição da Equação 2.32, como

$$\begin{aligned}
 \langle V_C(t')V_C(t) \rangle &= \frac{\sigma^2}{\tau^2} \int_0^{t'} \int_0^t e^{(s-t)/\tau} e^{(s'-t')/\tau} \delta(s' - s) ds ds' \\
 &= \frac{\sigma^2 e^{-(t+t')/\tau}}{\tau^2} \int_0^{t'} e^{2s'/\tau} ds' \\
 &= \frac{\sigma^2 e^{-(t+t')/\tau}}{\tau} \left(\frac{e^{2t'/\tau} - 1}{2} \right) \\
 &= \frac{\sigma^2}{2\tau} \left(e^{-(t-t')/\tau} - e^{-(t+t')/\tau} \right),
 \end{aligned}$$

se $t' > t$ e $t + t' \gg \tau$ então a função de autocorrelação da tensão sobre o capacitor se torna

$$\langle V_C(t')V_C(t) \rangle = \frac{\sigma^2}{2\tau} e^{-(t'-t)/\tau}, \quad (2.34)$$

onde o módulo garante que a correlação irá diminuir conforme a distância entre t e t' aumentar. No limite $t' = t$ vem que

$$\langle V_C^2(t) \rangle = \frac{\sigma^2}{2\tau}. \quad (2.35)$$

Comparando a Equação 2.35 com a Equação 2.28 obtém-se que a constante de

correlação, σ^2 , é

$$\begin{aligned}\sigma^2 &= \frac{2\tau k_B T}{C} \\ &= 2Rk_B T,\end{aligned}\tag{2.36}$$

onde foi usado que $\tau = RC$.

Finalmente, calculando a transformada de Fourier da [Equação 2.34](#), usando a mudança de variável $t' - t = s$, obtém-se a densidade espectral do processo estacionário randômico $V_C(t)$

$$\begin{aligned}J(\omega) &= \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \langle V_C(t+s)V_C(t) \rangle e^{-j\omega s} ds \\ &= \frac{k_B T}{2\pi C} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-|s|/\tau} e^{-j\omega s} ds \\ &= \frac{k_B T}{2\pi C} \left[\int_{-\infty}^0 e^{s/\tau} e^{-j\omega s} ds + \int_0^{\infty} e^{-s/\tau} e^{-j\omega s} ds \right] \\ &= \frac{k_B T}{2\pi C} \frac{2\tau}{1 + (\omega\tau)^2} \\ &= \frac{1}{\pi} \frac{k_B T R}{1 + (\omega\tau)^2}.\end{aligned}\tag{2.37}$$

É fisicamente conveniente tratar apenas das frequências positivas já que essas são as quantidades mensuráveis no dia a dia, portanto, usando-se as propriedades da transformada de Fourier, a densidade espectral para frequências positivas é dada por

$$\begin{aligned}J_+(\omega) &= 2J(\omega) \\ &= \frac{2}{\pi} \frac{k_B T R}{1 + (\omega\tau)^2}.\end{aligned}\tag{2.38}$$

A tensão média quadrática total sobre o capacitor é obtida integrando-se a densidade espectral $J_+(\omega)$, [Equação 2.38](#), em todas as frequências e está em total acordo com a [Equação 2.28](#):

$$\begin{aligned}\langle V_C^2(t) \rangle &= \int_0^{\infty} J_+(\omega) d\omega \\ &= \frac{2k_B T R}{\pi} \int_0^{\infty} \frac{1}{1 + (\omega\tau)^2} d\omega \\ &= \frac{k_B T}{C},\end{aligned}\tag{2.39}$$

onde foi usado que $\tau = RC$.

Na [Figura 13](#) é apresentada a densidade espectral obtida através da simulação do circuito da [Figura 4](#) no LTspice² e o ajuste teórico dado pela [Equação 2.38](#).

² <<https://www.analog.com/en/design-center/design-tools-and-calculators/ltspice-simulator.html>>

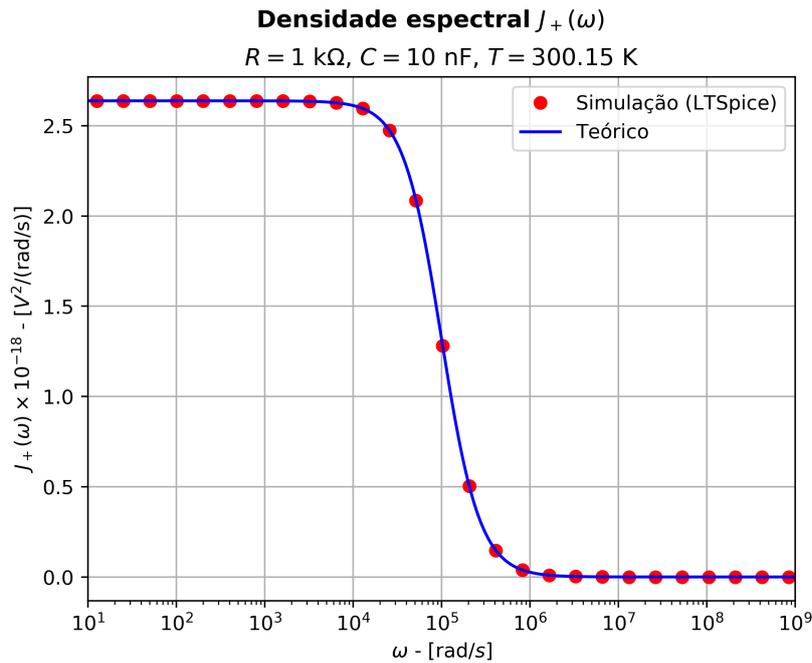


Figura 13 – Gráfico de simulação, realizada no LTSpice, da densidade espectral do ruído térmico no circuito da Figura 4 em vermelho e ajuste teórico dado pela Equação 2.38 em azul. Foi usado $R = 1 \text{ k}\Omega$, $C = 10 \text{ nF}$ e $T = 300.15 \text{ K}$.

Fonte: Autoria própria

É importante ressaltar que o ruído branco gaussiano é um processo aleatório com densidade espectral constante para todas as frequências conforme a Equação 2.33. Dessa forma, a tensão média quadrática total desse ruído é dada integrando-se sua densidade espectral na frequência como segue:

$$\begin{aligned}
 \langle V_{\text{ruído}}^2(t) \rangle &= \lim_{\beta \rightarrow \infty} \int_{-\beta}^{\beta} J_{\text{ruído}}(\omega) d\omega \\
 &= \lim_{\beta \rightarrow \infty} \frac{\sigma^2}{2\pi} \int_{-\beta}^{\beta} d\omega \\
 &= \lim_{\beta \rightarrow \infty} \frac{\sigma^2 \beta}{\pi} \\
 &= \infty.
 \end{aligned} \tag{2.40}$$

A Equação 2.40 é um resultado não físico pois implica em uma fonte com potência infinita, consequentemente o ruído branco é um processo impraticável fisicamente. No entanto, o ruído branco é um bom modelo para se estudar sistemas cujo ruído apresenta densidade espectral constante para uma dada largura de banda. Suponha que o ruído esteja limitado à uma largura de banda $\omega - \Delta\omega \leq \omega \leq \omega + \Delta\omega$ então sua tensão média

quadrática total será dada por

$$\begin{aligned}\langle V_{ruído}^2(t) \rangle &= \int_{-\infty}^{\infty} J_{ruído}(\omega') d\omega' \\ &= \frac{\sigma^2}{2\pi} \int_{\omega-\Delta\omega}^{\omega+\Delta\omega} d\omega' \\ &= \frac{\sigma^2 \Delta\omega}{\pi}.\end{aligned}$$

Semelhantemente, pode-se calcular a tensão média quadrática sobre o filtro passa-baixa de primeira ordem limitado à uma dada largura de banda $\omega - \Delta\omega \leq \omega \leq \omega + \Delta\omega$ como

$$\begin{aligned}\langle V_C^2(t) \rangle &= \int_{\omega-\Delta\omega}^{\omega+\Delta\omega} J_+(\omega') d\omega' \\ &= \frac{2k_B T R}{\pi} \int_{\omega-\Delta\omega}^{\omega+\Delta\omega} \frac{1}{1 + (\omega'\tau)^2} d\omega' \\ &= \frac{2k_B T}{\pi C} \left[\arctan(RC(\omega + \Delta\omega)) - \arctan(RC(\omega - \Delta\omega)) \right],\end{aligned}$$

onde foi usado que $\tau = RC$.

2.3 O método da fase

O método da fase consiste em uma aplicação direta das operações matemáticas realizadas pelo amplificador *lock-in* e são de extrema utilidade na recuperação de sinais sobrepostos que possuem fase característica. Esse método tem sido amplamente utilizado na espectroscopia fotoacústica [22, 23, 24, 25, 26] para separar as contribuições de diferentes centros de absorção óptica em um espectro.

Para melhor compreender esse método será estudada a decomposição de um sinal, \vec{Z} , composto pela soma vetorial de outros dois sinais, \vec{Z}_0 e \vec{Z}_1 , com suas fases características conforme representado na Figura 14.

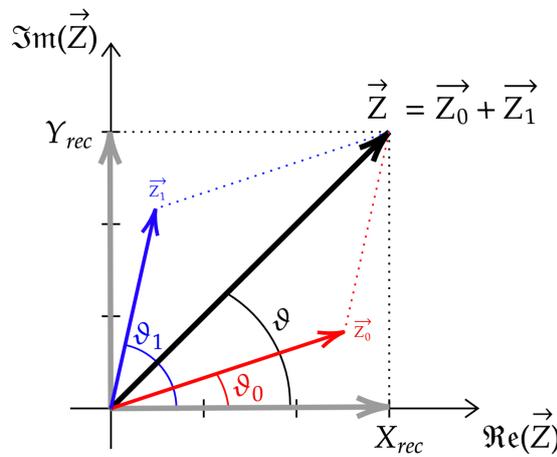


Figura 14 – Decomposição do sinal de interesse no plano complexo, com a contribuição de dois centros de absorção, pelo componente “em fase”, X_{rec} , e pelo “em quadratura”, Y_{rec} , do sinal de interesse. \vec{Z} é o vetor complexo composto pela soma vetorial do vetor \vec{Z}_0 e do vetor \vec{Z}_1 associados ao seu respectivo centro de absorção.

Fonte: Autoria própria

Suponha que o sinal de entrada do *lock-in* tenha a forma

$$V_{sinal}(t) = G[V_0 \sin(\omega t + \vartheta_0) + V_1 \sin(\omega t + \vartheta_1)] \quad (2.41)$$

e a referência seja dada pela Equação 2.3. É fácil mostrar que, se $\omega = \Omega$, então os componentes do sinal “em fase” e “em quadratura” serão dados por

$$X_{rec} = \frac{GV_{ref}}{2} \left[V_0 \cos(\vartheta_0 - \vartheta_{ref}) + V_1 \cos(\vartheta_1 - \vartheta_{ref}) \right] \quad (2.42)$$

e por

$$Y_{rec} = \frac{GV_{ref}}{2} \left[V_0 \sin(\vartheta_0 - \vartheta_{ref}) + V_1 \sin(\vartheta_1 - \vartheta_{ref}) \right]. \quad (2.43)$$

O módulo, R , é facilmente obtido da [Equação 2.42](#) e da [Equação 2.43](#) como sendo

$$R = \frac{GV_{ref}}{2} \sqrt{V_0^2 + V_1^2 + 2V_0V_1 \cos(\vartheta_0 - \vartheta_1)}. \quad (2.44)$$

Da [Equação 2.44](#) é imediato que o módulo do sinal à saída do *lock-in* é independente da fase do sinal de referência, ϑ_{ref} . Portanto, em medições onde apenas o módulo da soma de todas as contribuições é de interesse, não há necessidade de calibração da fase de referência.

Ajustando-se adequadamente a fase da referência, ϑ_{ref} , na [Equação 2.42](#) é possível isolar a contribuição dos centros de absorção e determinar uma expressão que convenientemente descreva suas intensidades:

$$\begin{aligned} X_{ref}(\vartheta_{ref} = \vartheta_1 - 90) &= \frac{GV_{ref}}{2} V_0 \cos(\vartheta_0 - \vartheta_1 + 90) \\ &= \frac{GV_{ref}}{2} V_0 \sin(\vartheta_1 - \vartheta_0) \\ \Rightarrow V_0 &= \frac{2}{GV_{ref}} \frac{X_{ref}(\vartheta_{ref} = \vartheta_1 - 90)}{\sin(\vartheta_1 - \vartheta_0)}, \end{aligned} \quad (2.45)$$

analogamente, obtém-se que

$$V_1 = \frac{2}{GV_{ref}} \frac{X_{ref}(\vartheta_{ref} = \vartheta_0 - 90)}{\sin(\vartheta_0 - \vartheta_1)}. \quad (2.46)$$

Para um sistema físico composto por duas fases, como no exemplo anterior, é relativamente simples determinar a fase de cada contribuição usando-se o amplificador *lock-in* de uma fase. Contudo, sistemas compostos por várias fases são tediosos de resolver e se faz conveniente o uso de um *lock-in* de duas fases para explicitar a fase de cada parte do espectro de interesse, facilitando assim sua análise posterior.

É conveniente estudar a resposta teórica do filtro passa-baixa para um sinal de entrada na forma $V_{in} = V_{sinal}V_R$, onde V_{sinal} é dado pela [Equação 2.41](#) e V_R pela [Equação 2.3](#), logo

$$\begin{aligned} V_{in} &= GV_{ref} \left[V_0 \sin(\Omega t + \vartheta_0) + V_1 \sin(\Omega t + \vartheta_1) \right] \sin(\Omega t + \vartheta_{ref} + \varphi) \\ &= \mathfrak{A} \left[\cos(\vartheta_0 - \vartheta_{ref} - \varphi) - \cos(2\Omega t + \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi) \right] \\ &\quad + \mathfrak{B} \left[\cos(\vartheta_1 - \vartheta_{ref} - \varphi) - \cos(2\Omega t + \vartheta_1 + \vartheta_{ref} + \varphi) \right], \end{aligned} \quad (2.47)$$

onde $\mathfrak{A} = \frac{GV_0V_{ref}}{2}$ e $\mathfrak{B} = \frac{GV_1V_{ref}}{2}$.

A tensão sobre o capacitor é dada pela [Equação 2.15](#) e substituindo a fonte, V_{in} , pela [Equação 2.47](#) obtém-se facilmente que a equação que descreve a tensão à saída do

capacitor para um sinal de entrada na forma da [Equação 2.47](#) é

$$\begin{aligned}
V_C(t) = & V_C(0)e^{-t/\tau} + \mathfrak{A} \left[\cos(\vartheta_0 - \vartheta_{ref} - \varphi) \left[1 - e^{-t/\tau} \right] \right. \\
& \left. - \frac{W\tau \sin(Wt + \Theta_0) + \cos(Wt + \Theta_0)}{W^2\tau^2 + 1} + \frac{[W\tau \sin(\Theta_0) + \cos(\Theta_0)]e^{-t/\tau}}{W^2\tau^2 + 1} \right] \\
& + \mathfrak{B} \left[\cos(\vartheta_1 - \vartheta_{ref} - \varphi) \left[1 - e^{-t/\tau} \right] \right. \\
& \left. - \frac{W\tau \sin(Wt + \Theta_1) + \cos(Wt + \Theta_1)}{W^2\tau^2 + 1} + \frac{[W\tau \sin(\Theta_1) + \cos(\Theta_1)]e^{-t/\tau}}{W^2\tau^2 + 1} \right],
\end{aligned} \tag{2.48}$$

onde $W = 2\Omega$, $\Theta_0 = \vartheta_0 + \vartheta_{ref} + \varphi$ e $\Theta_1 = \vartheta_1 + \vartheta_{ref} + \varphi$.

A recuperação da amplitude de cada componente de V_{sinal} em função do tempo é facilmente obtida como

$$V_0(t) = \frac{2}{GV_{ref}} \frac{V_C(t, \vartheta_{ref} = \vartheta_1 - 90)}{\sin(\vartheta_1 - \vartheta_0)} \tag{2.49}$$

e

$$V_1(t) = \frac{2}{GV_{ref}} \frac{V_C(t, \vartheta_{ref} = \vartheta_0 - 90)}{\sin(\vartheta_0 - \vartheta_1)}. \tag{2.50}$$

Na [Figura 15](#) é apresentada a recuperação do módulo, R , e da amplitude dos sinais que compõem o sinal de entrada da [Equação 2.41](#), V_0 e V_1 , à saída do amplificador *lock-in* com filtro de ordem 1. A recuperação das amplitudes foi obtida através da solução numérica, usando-se o método Runge–Kutta–Fehlberg de ordem 5 (RKF5) [27], da [Equação 2.14](#). O ajuste teórico para V_0 foi dado pela [Equação 2.49](#) e para V_1 foi dado pela [Equação 2.50](#). Finalmente o valor esperado foi dado pela [Equação 2.45](#) para V_0 , pela [Equação 2.46](#) para V_1 e pela [Equação 2.44](#) para R .

Recuperação das amplitudes que compõem o sinal de entrada

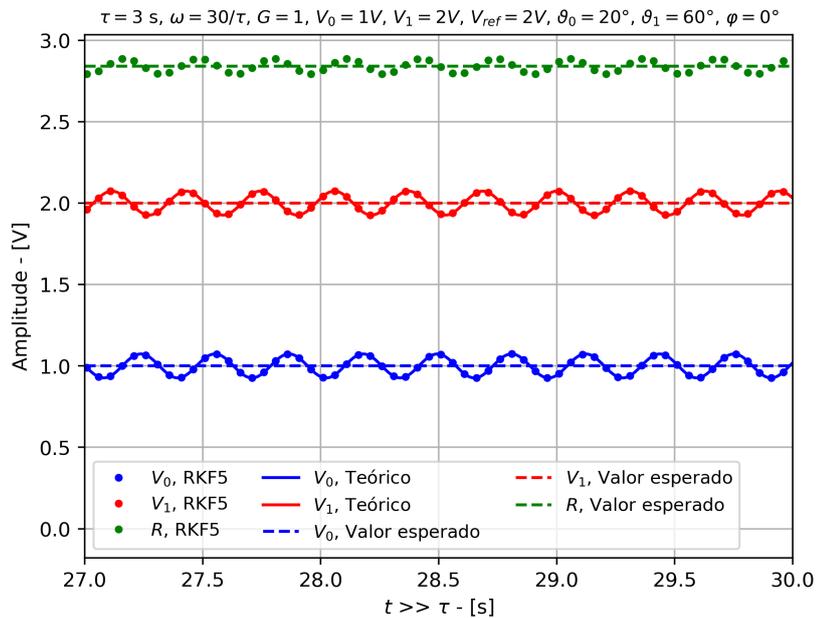


Figura 15 – Solução numérica da recuperação das amplitudes de um sinal misto na forma da [Equação 2.41](#) realizada através do método Runge–Kutta–Fehlberg de ordem 5 à saída do filtro passa-baixa de primeira ordem. As curvas pontilhadas são o resultado numérico. As curvas contínuas são o ajuste teórico dado pela [Equação 2.49](#) para V_0 e pela [Equação 2.50](#) para V_1 . Finalmente as curvas tracejadas são o valor teórico esperado para V_0 ([Equação 2.45](#)), V_1 ([Equação 2.45](#)), e R ([Equação 2.44](#)).

Fonte: Autoria própria

3 A espectroscopia fotoacústica

A espectroscopia representa parte significativa e um dos mais antigos ramos da física experimental. Ela é a parte da física que estuda os efeitos da interação da luz com a matéria para realizar a caracterização de um dado material. Esse estudo contempla desde a região das mais baixas energias da luz como a ressonância magnética nuclear, observada na região de MHz, até as de mais altas energias como a espectroscopia de raios x, observada na região de EHz [28].

O marco inicial da espectroscopia se deu com a publicação, em 1704, da obra intitulada *Opticks: or, A Treatise of the Reflexions, Refractions, Inflexions and Colours of Light* [29], na qual Isaac Newton estuda a natureza da luz por meio de alguns experimentos de óptica como difração e refração por exemplo. Newton demonstrou que a luz branca pode ser separada em várias componentes de cor quando atravessa um prisma e que essas componentes podem ser novamente reunidas para formar a luz branca. Experimentos posteriores deram os primeiros indícios de que os espectros observados por meio dos primas estavam associados com a composição química dos materiais em análise quando sais foram adicionados ao álcool em chamas [30].

Ao interagir com a matéria, os fótons de luz podem ser transmitidos, absorvidos ou espalhados pela mesma. Para estudar esses efeitos a espectroscopia óptica se valia de dois ramos: a espectroscopia de transmissão e a espectroscopia de reflexão. Na espectroscopia de transmissão são estudados os fótons da luz incidente que não interagem com o material, ou seja, os fótons que são transmitidos através do material. Na espectroscopia de reflexão são estudados os fótons que são refletidos ou espalhados por um dado material, ou seja, é estudada parte da luz incidente que interage com o material. Nota-se contudo que a parte absorvida, que representa uma parcela de grande interesse na caracterização de muitos materiais, não pode ser detectada diretamente por essas técnicas. Além disso, alguns materiais não podem ser estudados com essas técnicas por serem transparentes demais e envolverem a detecção de um sinal muito pequeno, por serem opacos demais e não produzirem variação nenhuma de sinal óptico ou mesmo por espalharem fortemente a luz.

Ao longo dos anos os cientistas buscaram meios de contornar essas dificuldades e desenvolveram técnicas que os ajudavam a transpor as mesmas. Dentre essas técnicas a espectroscopia fotoacústica se destaca por ser capaz de estudar a parte que a espectroscopia óptica convencional não contemplou, a parte de luz absorvida pelo material e por trabalhar em um amplo intervalo de energia.

A espectroscopia fotoacústica consiste em um das mais belas técnicas experimentais

da ciência moderna. De forma simples, e até poética, a fotoacústica consiste na arte de ouvir o som que a luz causa ao interagir com um material qualquer. Cada material responderá de forma diferente às cores da luz incidente, ou seja, ao se realizar uma varredura em função da cor (comprimento de onda) da luz incidente, haverá como produto um espectro característico desse material.

Nesses últimos 50 anos a espectroscopia fotoacústica tem se tornado uma técnica bastante útil. Alguns dos fatores dominantes para seu crescimento foram o avanço da eletrônica, com o desenvolvimento de microfones de alta sensibilidade, do amplificador *lock-in* [31] e a descrição teórica, realizada por Rosencwaig-Gersho [13] em 1976, que conferiu à espectroscopia fotoacústica o potencial de sondar amostras no estado gasoso ou condensado de forma não invasiva. Sua desenvoltura na sondagem de materiais orgânicos (*in vivo* ou *in natura*) [32, 33, 34, 35] permitiu que a fotoacústica rapidamente cruzasse as fronteiras da física e adentrasse naturalmente às outras áreas do conhecimento humano, tal como estudos recentes que têm adaptado essa bela técnica para aplicações médicas [33] dentre as quais, por exemplo, o efeito fotoacústico tem sido usado na obtenção não invasiva de imagens fotoacústica [36, 37] de tecidos, órgãos, veias e artérias, utilizadas nos métodos clínicos e pré-clínicos com o objetivo de melhorar o diagnóstico.

Dentre as várias vantagens da espectroscopia fotoacústica encontram-se a capacidade de sondar materiais sem a necessidade primária de realizar uma preparação anterior, ou seja, o material pode ser estudado em seu estado de origem, *in natura*. Ela não requer grandes quantidades de material para realizar um experimento, isto é, com uma pequena amostra já é possível se obter um espectro. Ela fornece um espectro similar ao espectro de absorção óptica para qualquer tipo de material. A luz espalhada no material não irá influenciar, dado que apenas a luz absorvida será convertida em calor. Materiais opticamente opacos podem ser estudados por essa técnica. Ela permite que o perfil de profundidade do material seja estudado, obtendo-se as propriedades ópticas e térmicas do mesmo. Permite também o estudo de materiais compostos de camadas mistas através do estudo da fase do sinal fotoacústico.

3.1 História da espectroscopia fotoacústica

Em meados de 1880, Graham Bell publicava as mais recentes descobertas que empreendera com o Sr. Sumner Tainter, mediante sua invenção, o fotofone, foram capazes de transmitir som por meio da luz que refletia de um espelho móvel até um receptor, uma célula solar de selênio. Baseados no fato, então já bem conhecido, de que distúrbios moleculares causados, em uma massa de ferro, por influência magnetizante de uma corrente intermitente poderia gerar som, pressupuseram que os distúrbios causados no selênio cristalino por um feixe de luz intermitente deveriam ser também audíveis como aqueles. Muitos experimentos foram realizados no intuito de comprovar essa teoria, mas sem êxito a princípio. O comportamento anômalo do anteparo de borracha dura, percebido outrora nos experimentos com o selênio, suscitou o pensamento de que ela deveria ser testada: Bell segurou uma folha de borracha próximo ao seu ouvido enquanto um feixe de luz intermitente era focalizado, com o auxílio de lentes, sobre ela e imediatamente foi capaz de ouvir uma distinta nota musical. Com o fim de intensificar o efeito, arranjaram a folha de borracha em forma de diafragma e, conforme a [Figura 16](#), acoplaram-na em um tubo auditivo [38].

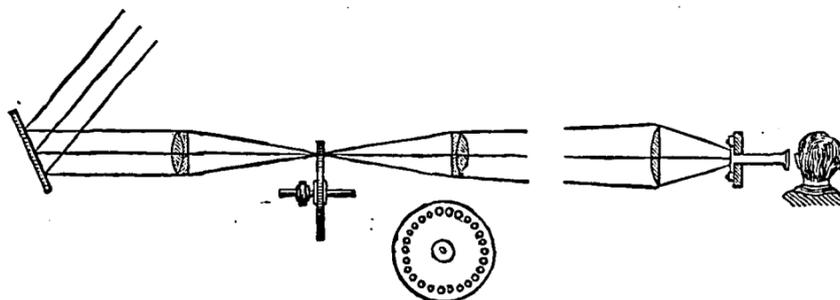


Figura 16 – Representação da montagem experimental usada por Bell para intensificar o efeito “fotofônico”.

Fonte: [38]

Bell acreditava que os distúrbios moleculares produzidos pela luz era uma ação principalmente superficial, isso explicava o fato de que, dadas as circunstâncias dos experimentos anteriores, alguns materiais falharam em emitir algum som. Seguiu-se logicamente a necessidade de verificar a proposição de que a sonoridade, sob a influência da luz intermitente, é uma propriedade comum à toda matéria. Para tal, Bell desenvolveu um experimento no qual várias substâncias e materiais diversos poderiam ser testados; esse consistia em um recipiente transparente constituído de algum material que, como o vidro, é transparente à luz, mas opaco ao som: um tubo de ensaio. O som permaneceria confinado dentro desse recipiente e poderia ser ouvido através de um tubo auditivo. Assim, alguns experimentos preliminares foram realizados, em Paris, para verificar essa ideia,

produzindo resultados promissores. Em 02 de Novembro de 1880, Bell, que estava em Paris, escreve ao Sr. Tainter, participa-lhe as novas descobertas e sugere que esse, que está em Washington, repita os experimentos, devido à melhor intensidade da luz solar local, e amplie os resultados. Esses experimentos levaram à conclusão de que o algodão, a lã e materiais fibrosos em geral produziam sons muito mais intensos do que corpos rígidos ou diafragmas que haviam sido testados anteriormente, além disso, o Sr. Tainter percebeu rapidamente que as tonalidades mais escuras produziam os melhores efeitos. Experimentos realizados para investigação da audibilidade de várias substâncias, ao longo do espectro, sucederam esses acontecimentos e levaram à construção de um novo instrumento, mostrado na Figura 17, o Espectrofone, que nada mais é do que um espectroscópio com adaptações [39]. A fotoacústica começava assim, de forma modesta, a revelar-se para a ciência moderna.

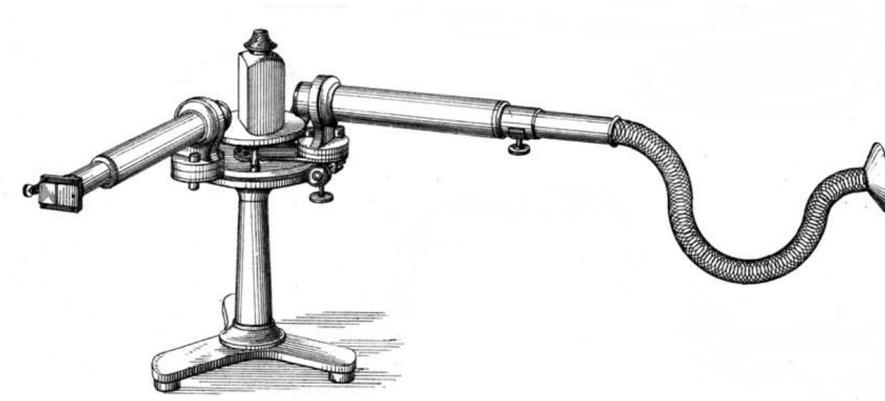


Figura 17 – Representação da montagem experimental do Espectrofone.

Fonte: [39]

Surgiam, em 1881, as primeiras teorias que tentavam explicar como o efeito fotofônico (assim era chamado o efeito fotoacústico naqueles dias) era gerado. Lord Rayleigh demonstrou matematicamente que vibrações com amplitude suficiente para produzir som audível eram resultado de contrações e descontrações da amostra devido ao calor gerado pela luz intermitente [40]. Preece, por outro lado, acreditava que esse efeito era gerado pela contração e descontração dos gases contidos no volume devido à luz intermitente [41].

Naqueles dias, todavia, ainda não existia a instrumentação necessária para que medidas quantitativas pudessem ser realizadas a fim de compreender melhor tal efeito, foram os avanços eletrônicos, como a invenção do microfone, que permitiram que o efeito fotoacústico, outrora efeito fotofônico e mais tarde optoacústico, lentamente caminhasse no estudo dos gases [42]. Kerr e Atwood, em 1968, utilizando um laser como fonte de luz, conseguiram medir um fraco espectro de uma linha de vapor do H_2O , fora a primeira vez que o laser foi usado como fonte de luz nos experimentos de fotoacústica [43].

Não obstante, foi em meados da década de 1970 que, juntamente com a instrumentação moderna, a descrição teórica do efeito fotoacústico tornara possível que a fotoacústica voltasse a calcorrear por entre os corredores da ciência moderna. Parker propôs, em 1973, que o efeito fotoacústico era gerado devido à uma fina camada absorvedora responsável por transformar a luz em calor, que por sua vez era difundido ao gás por condução térmica [44]. Em 1976 Rosencwaig e Gersho viriam a propor um modelo que, em concordância com a teoria de Parker, revolucionaria para sempre a história da espectroscopia fotoacústica, esse conferia à fotoacústica o potencial de sondar amostras, estejam no estado gasoso ou condensado, de forma não invasiva, ampliando sua utilidade às mais diversas áreas de pesquisa [13]. Desde então, essa técnica tem sido amplamente usada no estudo de gases, cristais, fluidos magnéticos, plantas e tantos outros materiais.

3.2 O efeito fotoacústico

O efeito fotoacústico é gerado pela interação de um feixe intermitente de luz com a matéria [13, 38, 39, 40, 41]. O material a ser analisado encontra-se geralmente, conforme a Figura 18, confinado em uma câmara fechada preenchida com um gás arbitrário.



Figura 18 – Representação em corte transversal de uma câmara fotoacústica.

Fonte: Autoria própria

Ao interagir com a matéria, dependendo do nível energético da luz incidente, haverá a excitação dos níveis eletrônicos do material de análise através do mecanismo de absorção de fótons. Naturalmente, após a excitação, o sistema físico voltará ao seu estado fundamental e através do processo de relaxação não radioativa será gerado calor no interior do material. O calor gerado se difundirá até atingir a superfície da amostra e será conduzido para o gás. Dado que a fonte da excitação é intermitente, o fluxo de calor na amostra também será e portanto haverá a produção de ondas de pressão no interior da câmara, devido à compressão e à descompressão do gás, causadas pelo fluxo de calor intermitente [13].

3.3 A equação de difusão de calor

Quando a luz é absorvida pela matéria, parcialmente ou em sua totalidade, ela pode ser convertida em calor pelos processos de relaxação não radioativa [13]. Esse calor se difunde através da amostra até alcançar sua superfície quando sua interação com o gás adjacente causará uma variação de pressão no interior da câmara fotoacústica. Por isso é de suma importância a compreensão do processo de difusão de calor para o entendimento global do efeito fotoacústico.

Suponha um elemento de volume dV , conforme a Figura 19, contido em um volume isotrópico arbitrário com capacidade calorífica, c , e densidade de massa, ρ , pelo qual atravessa um fluxo de calor $\vec{\varphi}(\vec{r}, t)$ e no qual há uma fonte de calor $f(\vec{r}, t)$. Assuma que suas laterais sejam termicamente isoladas e que apenas as extremidades são expostas.

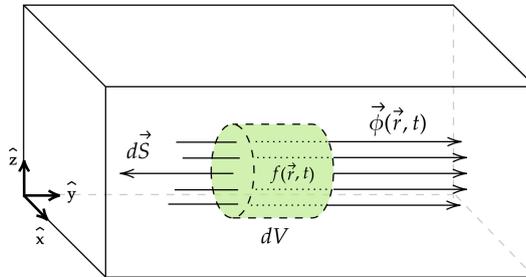


Figura 19 – Representação do elemento de volume dV através do qual passa um fluxo de calor $\vec{\varphi}(\vec{r}, t)$ e no qual há uma fonte de calor $f(\vec{r}, t)$.

Fonte: Autoria própria

O fluxo de calor, $\vec{\varphi}(\vec{r}, t)$, em um ponto qualquer do volume dV é descrito pela Lei de Fourier [45, 46]:

$$\vec{\varphi}(\vec{r}, t) = -k\vec{\nabla}T(\vec{r}, t), \quad (3.1)$$

onde o sinal negativo indica que o fluxo tem sentido oposto ao crescimento do gradiente, k é a condutividade térmica do material e $T(\vec{r}, t)$ é uma função dependente do tempo, t , que descreve a temperatura no ponto $\vec{r} = x\hat{x} + y\hat{y} + z\hat{z}$.

A diferencial da energia térmica [47] depositada no volume, à pressão constante, de acordo com a primeira lei da termodinâmica é definida como:

$$dQ = \iiint_V c\rho dT dV,$$

onde, do volume, c é a capacidade calorífica, ρ a densidade de massa e $T = T(\vec{r}, t)$ é a

temperatura, assim:

$$\begin{aligned} dQ(\vec{r}, t) &= \iiint_V c\rho dT(\vec{r}, t) dV \\ \Rightarrow \frac{\partial}{\partial \vec{r}} Q(\vec{r}, t) d\vec{r} + \frac{\partial}{\partial t} Q(\vec{r}, t) dt &= \iiint_V c\rho \left(\frac{\partial}{\partial \vec{r}} T(\vec{r}, t) d\vec{r} + \frac{\partial}{\partial t} T(\vec{r}, t) dt \right) dV, \end{aligned}$$

como as variáveis r e t são independentes, a variação temporal da energia térmica depositada no volume é:

$$\frac{\partial}{\partial t} Q(\vec{r}, t) = \iiint_V c\rho \frac{\partial}{\partial t} T(\vec{r}, t) dV. \quad (3.2)$$

Pelo princípio da conservação de energia a variação da energia térmica no volume é igual à soma entre a taxa de geração de calor e fluxo que entra ou sai do mesmo:

$$\frac{\partial}{\partial t} Q(\vec{r}, t) = \iiint_V f(\vec{r}, t) dV - \iint_S \vec{\varphi}(\vec{r}, t) \cdot d\vec{S}. \quad (3.3)$$

Comparando a [Equação 3.2](#) com a [Equação 3.3](#) obtém-se:

$$- \iint_S \vec{\varphi}(\vec{r}, t) \cdot d\vec{S} = \iiint_V \left(c\rho \frac{\partial}{\partial t} T(\vec{r}, t) - f(\vec{r}, t) \right) dV,$$

que pode ser reescrita usando o teorema da divergência como:

$$- \iiint_V \vec{\nabla} \cdot \vec{\varphi}(\vec{r}, t) dV = \iiint_V \left(c\rho \frac{\partial}{\partial t} T(\vec{r}, t) - f(\vec{r}, t) \right) dV, \quad (3.4)$$

e portanto, substituindo a [Equação 3.1](#) na [Equação 3.4](#), tem-se finalmente a equação de difusão de calor:

$$\left(\vec{\nabla}^2 - \frac{1}{\alpha} \frac{\partial}{\partial t} \right) T(\vec{r}, t) = -F(\vec{r}, t), \quad (3.5)$$

onde $\alpha = k/(c\rho)$ é a difusividade térmica do material e $F(\vec{r}, t) = f(\vec{r}, t)/k$ é a fonte de calor.

A solução da equação de difusão de calor, [Equação 3.5](#), fornece uma descrição dependente do tempo e do espaço para a distribuição de temperatura em uma dada região de um material cujos parâmetros físicos são conhecidos, tais como a distribuição inicial da temperatura na região e em suas fronteiras, e a difusividade térmica da mesma. O laplaciano, $\vec{\nabla}^2 T(\vec{r}, t)$, fornece o quanto a temperatura em um ponto varia com relação à temperatura média dos pontos circundantes. A derivada, $\frac{\partial}{\partial t} T(\vec{r}, t)$, fornece a taxa com a qual a temperatura varia no tempo. A constante de difusibilidade térmica, α , representa a taxa com a qual o calor é transferido de uma região quente para uma fria em um dado material.

3.4 O modelo unidimensional Rosencwaig-Gersho

O modelo unidimensional Rosencwaig-Gersho [13] considera, conforme a Figura 20, uma câmara fotoacústica cilíndrica de comprimento L e diâmetro D . É assumido que o comprimento L é pequeno quando comparado com o comprimento de onda do sinal acústico. A amostra em forma de disco, com diâmetro D e espessura l , é apoiada sobre um suporte, mau condutor térmico, de espessura l_s de forma que sua superfície esteja em contato com o gás dentro da câmara e seja perpendicular à luz incidente. A altura da coluna de gás dentro da câmara é l_g . É assumido que tanto o gás como o suporte são materiais não absorvedores de luz.

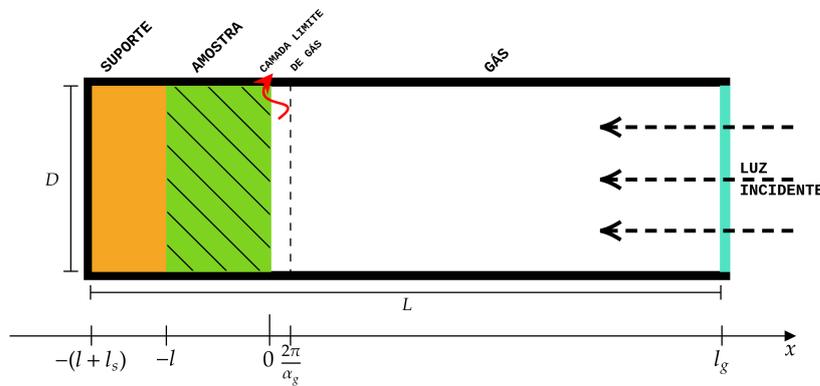


Figura 20 – Representação em corte transversal de uma câmara fotoacústica cilíndrica segundo o modelo Rosencwaig-Gersho.

Fonte: Autoria própria

Suponha uma fonte de luz incidente monocromática, com comprimento de onda λ , modulada sinusoidalmente e de intensidade

$$I(t) = \frac{1}{2} I_0 (1 + e^{j\omega t}),$$

onde I_0 é o fluxo de luz monocromática incidente (expresso em W/cm^2), $j = \sqrt{-1}$ é a unidade imaginária e ω a frequência de modulação.

Assumindo a existência de absorção de luz em algum ponto da amostra com reflexão nula e aplicando a lei de Bouguer [48, 49] para a mesma, tem-se que a quantidade de calor gerada devido à luz absorvida tem a forma:

$$I_{abs}(x, t) = I(t) (1 - e^{\beta x}),$$

onde β é o coeficiente de absorção óptica da amostra para um comprimento de onda λ e x assume valores negativos desde que a amostra está definida no intervalo $-l \leq x \leq 0$ com a luz incidindo na mesma em $x = 0$, conforme a Figura 20. Portanto, a densidade de

calor produzida, $\frac{\partial}{\partial x} I_{abs}(x, t)$, em um ponto x qualquer devido à luz absorvida, dá origem à fonte de calor:

$$f_x(x, t) = \frac{\partial}{\partial x} I_{abs}(x, t) = -\frac{1}{2} \beta I_0 e^{\beta x} (1 + e^{j\omega t}) \quad (3.6)$$

A equação de difusão de calor, [Equação 3.5](#), pode ser reescrita para o caso unidimensional como:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha} \frac{\partial}{\partial t} \right) T(x, t) = -\frac{f_x(x, t)}{k}, \quad (3.7)$$

substituindo a [Equação 3.6](#) na [Equação 3.7](#) tem-se finalmente que a equação de difusão de calor na amostra tem a forma:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_a} \frac{\partial}{\partial t} \right) T_a(x, t) = A e^{\beta x} (1 + e^{j\omega t}), \quad -l \leq x \leq 0, \quad (3.8)$$

onde o subíndice a indica que o parâmetro está associado com o material “Amostra”, $A = \frac{\beta I_0 \eta}{2k_a}$ e η é a eficiência com a qual a luz absorvida no comprimento de onda λ é convertida em calor pelos processos de relaxação não radioativa. É razoável usar $\eta = 1$ para a maioria dos sólidos em temperatura ambiente [13].

Foi assumido que tanto o gás como o suporte são materiais não absorvedores de luz, por conseguinte não existem fontes de calor presentes nessas regiões, logo, a equação de difusão de calor para o gás é da forma:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_g} \frac{\partial}{\partial t} \right) T_g(x, t) = 0, \quad 0 \leq x \leq l_g, \quad (3.9)$$

onde o subíndice g indica que o parâmetro está associado com o material “Gás”. E a equação de difusão de calor para o suporte é da forma:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha_s} \frac{\partial}{\partial t} \right) T_s(x, t) = 0, \quad -(l + l_s) \leq x \leq -l, \quad (3.10)$$

onde o subíndice s indica que o parâmetro está associado com o material “Suporte”.

A distribuição física da temperatura no interior da câmara, $\mathfrak{T}_i(x, t)$, será representada pela componente real das soluções da [Equação 3.8](#) à [Equação 3.10](#) e tem a forma:

$$\mathfrak{T}_i(x, t) = \Re\{T_i(x, t)\} + \vartheta_0, \quad i = \{a, g, s\}$$

onde ϑ_0 é a temperatura ambiente.

A solução geral da equação de difusão no modelo Rosencwaig-Gersho, desprezando-se os transientes, é dada por:

$$\begin{cases} T_s = (1/l_s)(x + l + l_s)W_0 + W e^{(\sigma_s(x+l)+j\omega t)}, & -(l + l_s) \leq x \leq -l, \\ T_a = e_1 + e_2 x + d e^{\beta x} + (U e^{\sigma_a x} + V e^{-\sigma_a x} - E e^{\beta x}) e^{j\omega t}, & -l \leq x \leq 0, \\ T_g = (1 - x/l_g)\vartheta_0 + \vartheta e^{(\sigma_g x + j\omega t)}, & 0 \leq x \leq l_g, \end{cases} \quad (3.11)$$

onde W, U, V, E e $\vartheta \in \mathbb{C}$, e_1, e_2, d, W_0 e $\vartheta_0 \in \mathbb{R}$ e $\sigma_i = (1 + j)a_i$ com $a_i = (\omega/2\alpha_i)^{1/2}$.

Aplicando as condições de continuidade e fluxo de Rosencwaig-Gersho [13] na Equação 3.11, tem-se que a solução explícita para a amplitude complexa da temperatura na interface amostra-gás é dada por:

$$\vartheta = \frac{\beta I_0}{2k_s(\beta^2 - \sigma_s^2)} \left(\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right), \quad (3.12)$$

onde $b = \frac{k_b a_b}{k_s a_s}$, $g = \frac{k_g a_g}{k_s a_s}$, $r = (1-j)\beta/(2a_s)$ e $\sigma_s = (1+j)a_s$.

3.5 O sinal fotoacústico

A principal fonte do sinal fotoacústico é a flutuação de temperatura que ocorre na interface amostra-gás devido ao processo de difusão de calor ocorrido na amostra. Dado que o processo de difusão ocorre de forma periódica, ele resultará em uma variação periódica de temperatura no gás dada pela componente alternada (AC) da solução da [Equação 3.9](#):

$$T_{gAC}(x, t) = \vartheta e^{-\sigma_g x - j\omega t},$$

cujas partes real, que representa a variação física de temperatura no gás, é

$$\Re\{T_{gAC}(x, t)\} = e^{-a_g x} \vartheta_1 \cos(\omega t - a_g x), \quad (3.13)$$

com ϑ_1 sendo a parte real da [Equação 3.12](#) e é representada pela [Figura 21](#).

Distribuição espacial da temperatura na camada limite de gás
(Componente AC)

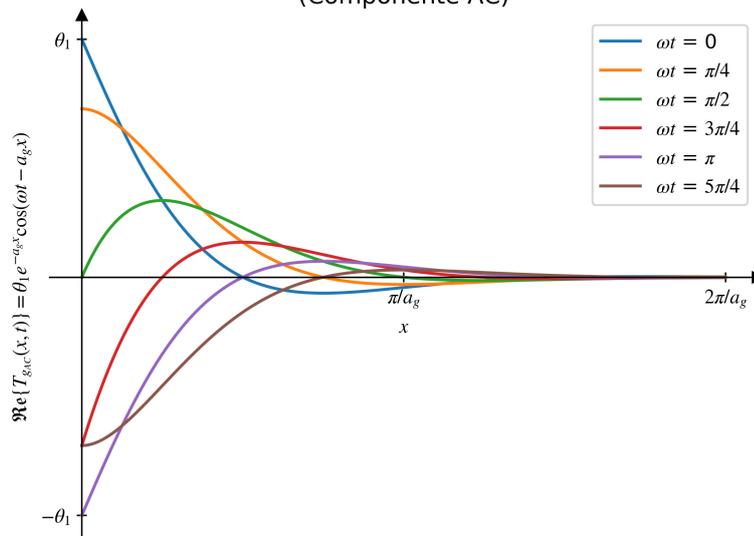


Figura 21 – Distribuição espacial, dependente do tempo, da temperatura dentro da camada limite de gás adjacente à superfície da amostra conforme a [Equação 3.13](#).

Fonte: Autoria própria

Como pode ser notado na [Figura 21](#), da [Equação 3.13](#), a componente real da temperatura tende a zero muito rapidamente conforme aumenta-se a distância à superfície da amostra. À distância de $x = 2\pi/a_g = 2\pi\mu_g$ (≈ 1 mm para $\omega/(2\pi) = 100$ Hz), onde μ_g é o comprimento de difusão térmica do gás, a variação da temperatura já é efetivamente desprezível. Logo, a camada limite de gás, que representa uma boa aproximação para a região onde haverá variação de temperatura no mesmo, conforme a [Figura 20](#), pôde ser fisicamente definida.

Rosencwaig-Gersho argumentou que, devido ao aquecimento periódico da camada limite de gás, haverá a expansão e a contração periódica do mesmo [13]. Assim, a camada limite de gás funciona como um pistão para o restante da coluna de gás, produzindo um sinal de pressão acústica que viaja por toda essa.

A temperatura média, dependente do tempo, dentro da camada limite de gás é dada pela expressão:

$$\begin{aligned}\bar{T}(t) &= \frac{1}{2\pi\mu_g} \int_0^{2\pi\mu_g} T_{gAC}(x, t) dx \\ &\cong \frac{\vartheta}{2\pi\sqrt{2}} e^{j(\omega t - \pi/4)},\end{aligned}$$

onde a aproximação $e^{-2\pi} \ll 1$ foi usada.

O deslocamento desse pistão de gás, devido ao aquecimento periódico, pode ser estimado usando-se a lei do gás ideal:

$$\delta x(t) = 2\pi\mu_g \frac{\bar{T}(t)}{T_0} = \frac{\vartheta\mu_g}{T_0\sqrt{2}} e^{j(\omega t - \pi/4)}, \quad (3.14)$$

onde foi definido que a temperatura média da camada de gás é igual à temperatura média da superfície da amostra, $T_0 = T + \vartheta_0$.

Se for assumido que a coluna de gás remanescente responde aos estímulos do pistão de gás de forma adiabática, então a pressão acústica na coluna de gás será derivada da lei do gás adiabático:

$$PV^\gamma = \text{const},$$

onde P é a pressão, V é o volume na câmara e γ é o coeficiente de expansão adiabática. Assim, o incremento de pressão é:

$$\delta P(t) = \frac{\gamma P_0}{V_0} \delta V = \frac{\gamma P_0}{l_g} \delta x(t), \quad (3.15)$$

onde P_0 e V_0 são a pressão ambiente e o volume respectivamente. Comparando a [Equação 3.15](#) com a [Equação 3.14](#) obtém-se:

$$\delta P(t) = Q e^{j(\omega t - \pi/4)}, \quad (3.16)$$

onde $Q = \frac{\gamma P_0 \vartheta}{l_g a_g T_0 \sqrt{2}}$ e representa a envelope sinusoidal da variação de pressão e pode ser escrita explicitamente, usando a [Equação 3.12](#), como:

$$Q = \frac{\beta I_0 \gamma P_0}{2k_s l_g a_g T_0 \sqrt{2} (\beta^2 - \sigma_s^2)} \left(\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right) \quad (3.17)$$

Finalmente, a variação física de pressão na coluna de gás será representada pela parte real de δP como:

$$\Delta P(t) = \Re\{\delta P(t)\} = Q_1 \cos(\omega t - \pi/4), \quad (3.18)$$

onde Q_1 representa a parte real de Q .

3.5.1 Importância da normalização do sinal fotoacústico

Segundo Rosencwaig o sinal fotoacústico sempre será linearmente proporcional à potência do feixe de fótons incidente e essa dependência é válida para qualquer amostra e para qualquer geometria da câmara fotoacústica [50]. Em outras palavras, a amostra só será capaz de absorver, no máximo, a intensidade de luz incidente. Isso pode ser expresso matematicamente como:

$$S_F \propto S_I, \quad (3.19)$$

onde S_F é o sinal fotoacústico captado pelo microfone do espectrômetro fotoacústico e S_I é o espectro de luz incidente que é obtido através do espectro do Negro de Fumo (ver seção 4.1). O espectro de luz incidente é característico de cada fonte de luz e pode ter seu perfil alterado ao percorrer o caminho óptico de acordo com os parâmetros de transmissividade e refletividade das lentes, espelhos e grade de difração usados para realizar o experimento. O espectro da luz incidente em todo o intervalo de interesse, ou espectro fotoacústico de referência, utilizado neste trabalho é apresentado abaixo na Figura 22.

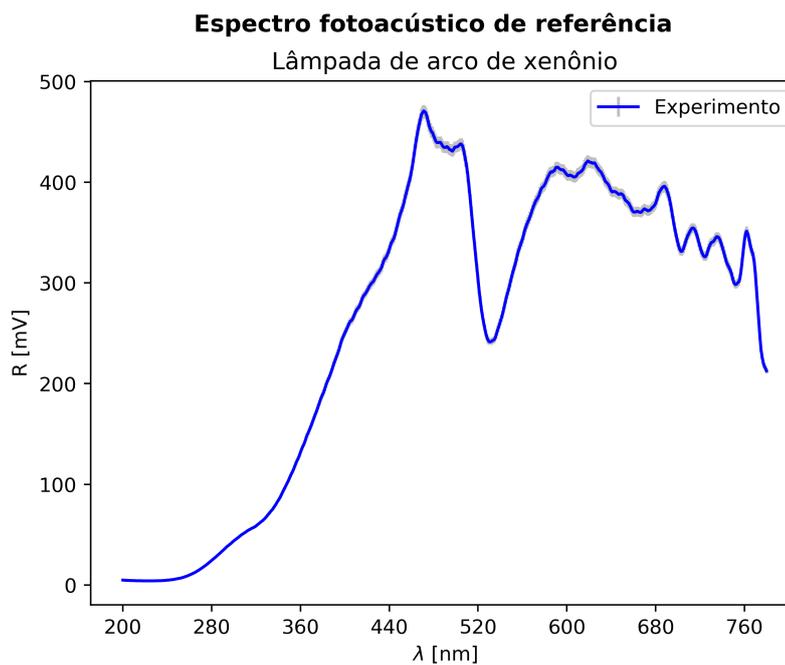


Figura 22 – Espectro fotoacústico de referência da lâmpada de arco de xenônio obtido com o Negro de Fumo.

Fonte: Autoria própria

A Equação 3.19 pode ser reescrita como:

$$S_F = S_A \cdot S_I, \quad (3.20)$$

onde S_A é uma constante de proporcionalidade e é definida como a potência do feixe de luz absorvido pela amostra, ou seja, é o sinal absorvido.

A recuperação do sinal absorvido é feita normalizando-se o sinal fotoacústico, S_F , pelo sinal incidente, S_I , e da [Equação 3.20](#) obtém-se:

$$S_A = \frac{S_F}{S_I}.$$

É fundamental, para uma boa interpretação dos dados, que seja realizada a normalização dos espectros medidos para a recuperação do sinal absorvido pela amostra. Isso evitará que o intérprete seja induzido ao erro pela mistura dos sinais.

4 Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Espectroscopia Fotoacústica da Unidade Acadêmica de Física da UFCG.

4.1 Materiais

- Etanol - (Toscano, lote: 259);
- tubo de ensaio de vidro de 10 mL;
- copo *becker* de vidro de 250 mL;
- seringa convencional de 3 mL;
- tesoura;
- gral de vidro para maceração;
- pistilo de porcelana;
- negro de fumo (*Carbon Black*) em pó - (Sigma-Aldrich);
- ácido ascórbico P.A. (Neon Commercial, 176.12 g/Mol, 99%);
- folhas verdes de pitanga (*Eugenia uniflora*) colhidas nas dependências da Universidade Federal de Campina Grande;
- uva *Red Globe* (*Vitis vinifera* “*Red Globe*”) comprada em supermercado;
- papel *sulfite* A4 branco (COPIMAX);
- toalhas de papel.

4.2 Instrumentos

Na [Figura 23](#) é apresentado o diagrama de blocos do experimento no qual o sinal fotoacústico foi medido.

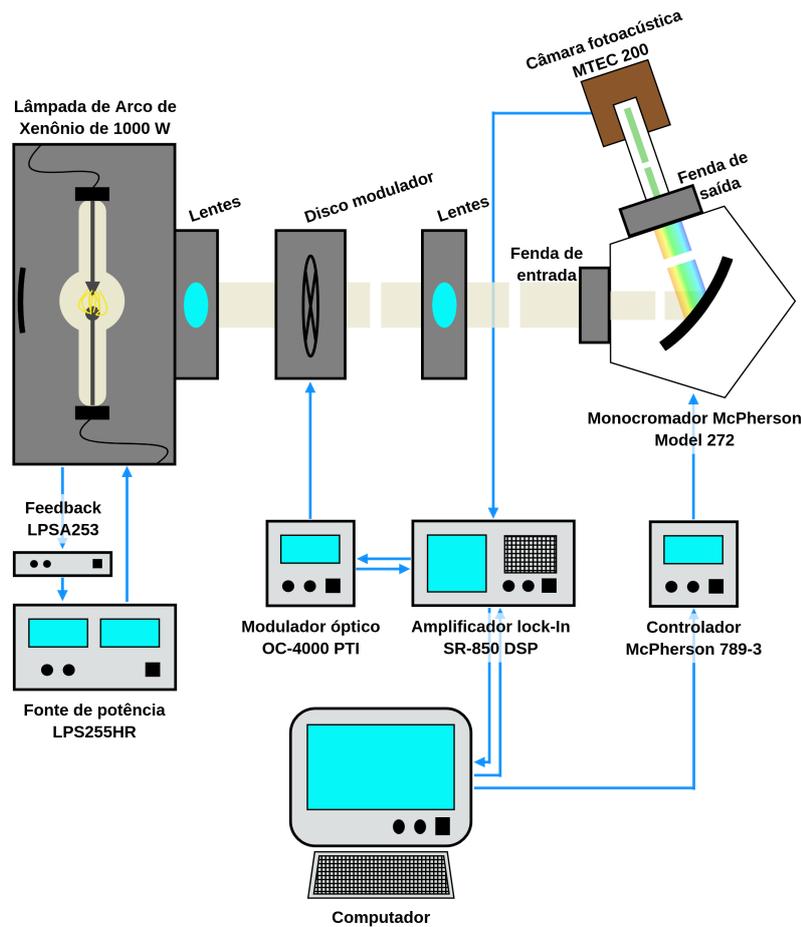


Figura 23 – Diagrama de blocos da configuração experimental do espectrômetro fotoacústico.

Fonte: Autoria própria

Segue-se uma breve descrição da função exercida por cada instrumento no experimento:

- A lâmpada de arco de xenônio de 1000 W foi utilizada para realizar a excitação óptica da amostra devido à sua boa emissão na região UV-Vis do espectro eletromagnético.
- A fonte de potência LPS255HR acoplada ao sistema de *feedback* Spectral Energy LPSA253 foi utilizada para alimentação da lâmpada. O sistema de *feedback* ajuda a amenizar as oscilações da lâmpada.
- Foi utilizado um conjunto de lentes e espelhos não absorvedores na região UV-Vis para colimação da luz pelo caminho óptico.
- O modulador óptico OC-4000 PTI foi utilizado para modulação do feixe de luz. Esse modulador possui uma faixa de atuação que varia no intervalo de 1 Hz a 2 kHz.

- O monocromador McPherson Model 272 foi utilizado para separar os componentes monocromáticos da luz proveniente da lâmpada de arco de xenônio. O monocromador McPherson Model 272 está equipado com uma grade de difração reflexiva e côncava de 2280 linhas/mm que fornece uma resolução espectral de 0.7 nm (em 312.6 nm) e uma dispersão linear recíproca de 2 nm/mm. Ele também conta com dois sistemas micrométricos (a fenda de entrada e a fenda de saída) para ajuste de largura do feixe de luz.
- O controlador McPherson 789-3 foi utilizado para controlar o monocromador McPherson Model 272.
- O Negro de Fumo foi utilizado para obter o espectro de referência da lâmpada e consiste de um material altamente absorvedor, aproximando-se de um absorvedor perfeito.
- A câmara fotoacústica MTEC 200 foi utilizada para realização dos experimentos, nela as amostras são confinadas e excitadas. A câmara fotoacústica MTEC 200 conta com um microfone Brüel & Kjaer TYPE 4189 o qual possui sensibilidade de 50mV/Pa, frequência útil de 6.3 Hz à 20 KHz e faixa dinâmica de 14.6 à 146 dB. Ela também conta com um pré-amplificador variável de alto ganho.
- O amplificador *lock-in* de duas fases SR-850 DSP foi utilizado para recuperação da magnitude e fase do sinal fotoacústico.

O *software* PAS 1.0.7 e o módulo PAS-AjusteGauss foram escritos em Python para um computador sob a plataforma do Windows 7 para auxiliar durante a execução dos experimentos e a interpretação dos dados.

O *software* PAS 1.0.7, [Apêndice A](#), foi utilizado para automatização do processo de controle e aquisição de dados. Sua interface foi desenvolvida usando-se o módulo PyQt5¹. A comunicação entre o computador e os instrumentos foram mediadas por meio do módulo Visa, disponibilizado pelo pacote PyVisa, que funciona sobre a biblioteca NI-VISA fornecida pela National Instruments. A comunicação com o amplificador *lock-In* foi feita por meio do protocolo GPIB enquanto que com o controlador McPherson 789-3 foi realizada usando o protocolo serial.

O módulo PAS-AjusteGauss, [Apêndice B](#), tem como função o tratamento dos dados através do método da segunda derivada [51, 52, 53, 54] e foi desenvolvido tendo como base os módulos Matplotlib², Numpy³ e Scipy⁴ além de algumas condições de contorno para

¹ <<https://www.riverbankcomputing.com/static/Docs/PyQt5/>>

² <<https://matplotlib.org/>>

³ <<https://numpy.org/>>

⁴ <<https://scipy.org/>>

otimização dos resultados. Essas condições de contorno evitam que o programa encontre soluções matemáticas que não são fisicamente aceitas para a interpretação do espectro, como a presença de absorção negativa por exemplo.

O espectrômetro UV-Vis Varian Cary 50 Bio foi utilizado para obter espectros de absorção de algumas amostras para fins de comparação e auxílio à técnica de espectroscopia fotoacústica.

4.3 Métodos

As amostras foram devidamente preparadas e estudadas conforme descrito adiante.

4.3.1 Método de preparação das amostras estudadas *in natura*

As amostras estudadas *in natura* foram lavadas com água corrente, com o objetivo de eliminação das impurezas superficiais, e secas com o auxílio de toalhas de papel, em seguida foram cortadas em forma de disco com diâmetro de aproximadamente 7 mm e espessura de aproximadamente 2 mm (no caso de amostras mais volumosas) de forma a serem posicionadas no porta amostras da câmara fotoacústica.

4.3.2 Método de extração das moléculas das folhas de pitanga

As folhas de pitanga foram inicialmente lavadas com água corrente, com o objetivo de eliminação das impurezas superficiais, e secas com o auxílio de toalhas de papel. As folhas foram devidamente cortadas em pequenos pedaços e maceradas no gral, em seguida foram imersas [55] em etanol em um tudo de ensaio e deixadas de repouso por vinte e quatro horas antes da realização do experimento.

4.3.2.1 Método de evaporação do solvente

Com objetivo de eliminar o solvente utilizado no procedimento anterior, 1 ml de solução contendo biomoléculas extraídas da folha de pitanga foi depositado sobre a folha de papel *sulfite* A4 branco e deixada em repouso até a total evaporação do solvente antes da realização do experimento.

4.3.3 Método de análise numérica utilizando o módulo PAS-AjusteGauss

Os espectros obtidos das amostras foram submetidos ao módulo de tratamento de dados, PAS-AjusteGauss, no qual foi obedecido a seguinte ordem de procedimentos, exemplificada com o espectro de absorção do ácido ascórbico P.A da [Figura 24](#):

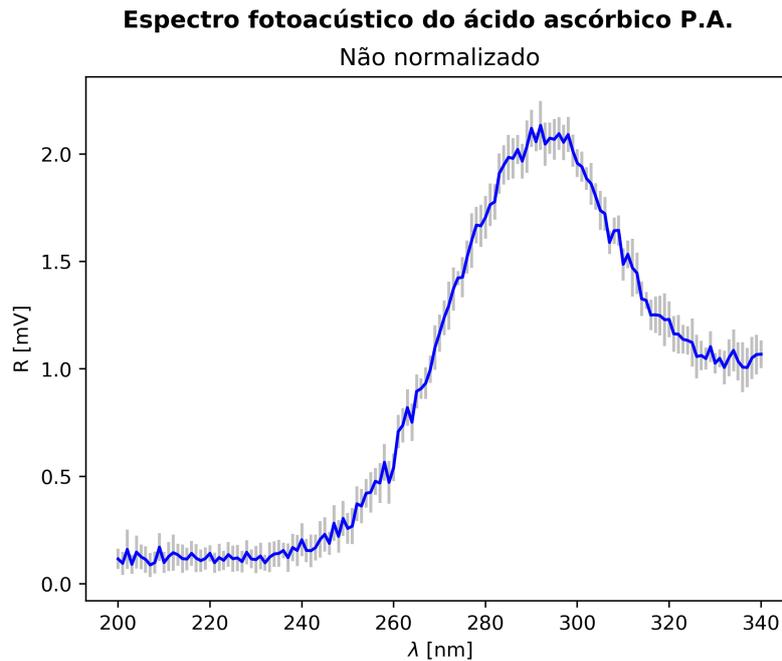


Figura 24 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico P.A. misturado com o espectro de emissão da lâmpada.

Fonte: Autoria própria

- Normalização do espectro medido pelo espectro fotoacústico de referência, conforme a [Figura 25](#), para recuperação do sinal associado à amostra, S_A .
- Remoção do *Background* para melhor apresentação do espectro quando necessário.
- Aplicação de um filtro gaussiano [56], fornecido pelo módulo Scipy, conforme a [Figura 26](#), para remoção do ruído branco presente no espectro. É importante que esta etapa seja realizada antes da aplicação do método da segunda derivada para evitar o aparecimento de picos relacionados ao ruído.
- Aplicação do método da segunda derivada, conforme a [Figura 26](#), para identificação das bandas espectroscópicas. Esse método consiste em calcular a segunda derivada do espectro de absorção, já normalizado, e encontrar os picos negativos, que possuem concavidade para baixo, dessa derivada uma vez que esses correspondem aos máximos das bandas de absorção.
- Aplicação de um fator de corte, caso necessário, para remover soluções obtidas a partir do ruído remanescente. Esse fator removerá do espectro ajustado as soluções que apresentam amplitude de segunda derivada menor que uma dada porcentagem, escolhida arbitrariamente, da amplitude máxima.

- Otimização, por meio do método dos mínimos quadrados não lineares [57] fornecido pelo módulo Scipy, das bandas espectroscópicas através dos picos encontrados para ajuste do espectro experimental conforme a Figura 30.

4.3.4 Simulações com o GAUSSIAN 09

As simulações através da teoria da densidade funcional dependente do tempo [58], TDDFT na sigla em inglês, são frutos da colaboração com Matheus Guimarães de Oliveira e foram realizadas no *software* GAUSSIAN 09 [59] com o propósito de possibilitar comparações com os resultados experimentais. Para tanto, os modelos tridimensionais das biomoléculas de interesse foram adquiridos através do banco de dados PubChem⁵, otimizados pelo método da teoria da densidade funcional (DFT na sigla em inglês) e então o espectro UV-Vis associado à cada biomolécula foi calculado através do método TDDFT utilizando-se os funcionais B3LYP [60, 61], CAMB3LYP [62] e a função de base 6-311G [63]. Os espectros obtidos foram arbitrariamente normalizados e apenas as contribuições contidas na região de interesse do espectro eletromagnético foram consideradas.

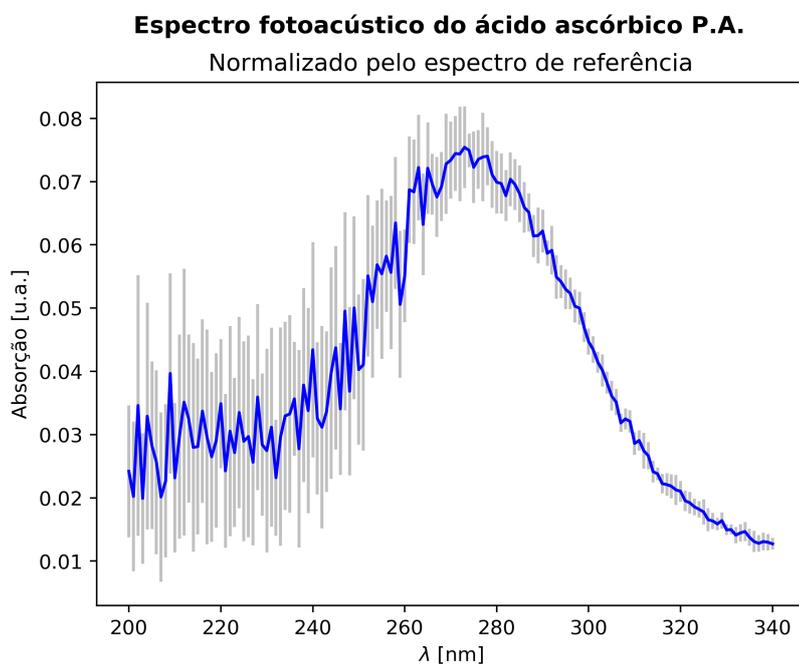


Figura 25 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico P.A. recuperado através da normalização pelo espectro de referência.

Fonte: Autoria própria

⁵ <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

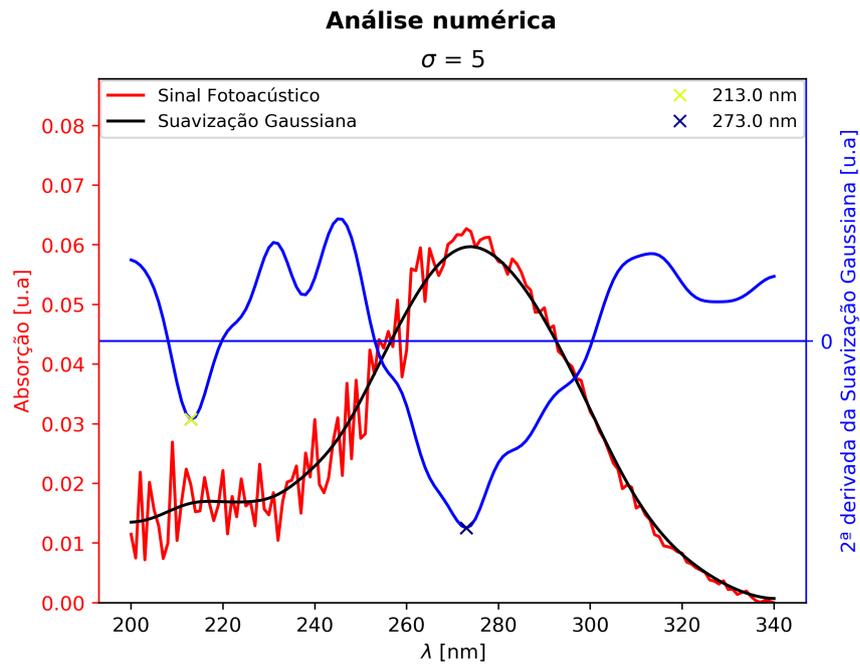


Figura 26 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico com remoção do *Background* em vermelho, com filtro gaussiano para remoção do ruído branco em preto, com curva da segunda derivada em azul, destaque aos pontos de mínimo marcados com um \times e aplicação do fator de corte. A constante σ , escolhida arbitrariamente, representa o desvio padrão para o *kernel* gaussiano.

Fonte: Autoria própria

5 Resultados

O *software* PAS 1.0.7 implementado para aquisição de dados fotoacústicos, cuja interface gráfica é mostrada na [Figura 27](#), se mostrou bastante versátil quando de sua utilização.

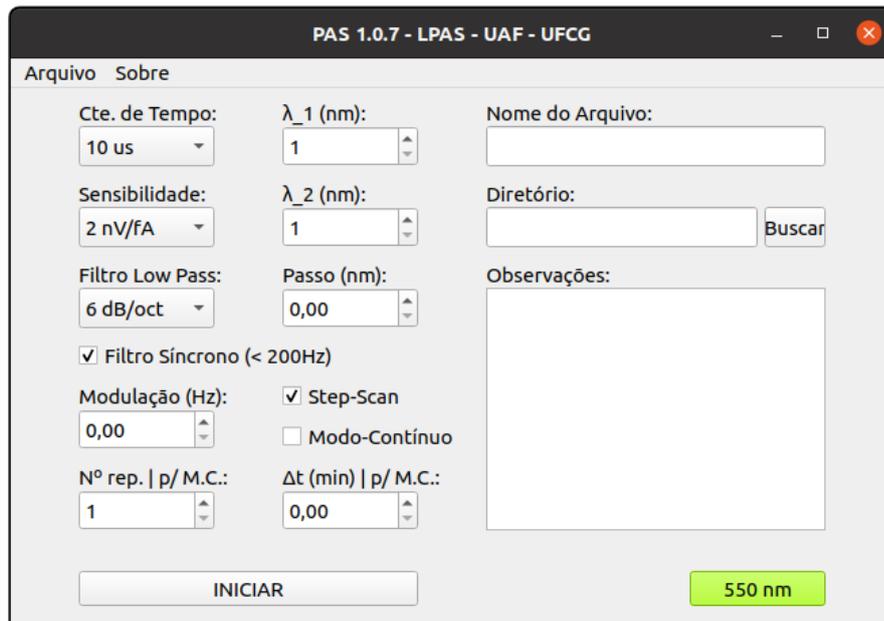


Figura 27 – Interface gráfica do *software* de aquisição de dados do espectrômetro fotoacústico.

Fonte: Autoria própria

O PAS 1.0.7 tem como objetivo realizar o processo de controle e aquisição de dados durante o experimento. Ele é responsável por coordenar as ações, direta ou indiretamente, de todos os equipamentos eletrônicos que compõem o espectrômetro fotoacústico utilizado neste trabalho, com exceção da fonte de potência LPS255HR que trabalha independentemente. Através do PAS 1.0.7 o usuário é capaz de escolher a constante de tempo, a sensibilidade, a ordem do filtro passa-baixa e a ativação do filtro síncrono no amplificador *lock in*. O usuário também poderá escolher entre duas modalidades de aquisição de dados, *Step-Scan* ou Modo-Contínuo. Em ambos os modos o passo e os limites inferiores e superiores do comprimento de onda deverão ser definidos pelo usuário. No caso da escolha do modo-contínuo, o usuário deverá determinar o tempo de duração do experimento assim como o número de repetições desejadas para que o programa possa calcular adequadamente as estatísticas associadas às medidas. Além disso, o usuário poderá definir a frequência do modulador óptico e adicionar comentários ao arquivo de dados que será gerado ao final

do experimento e salvo no diretório indicado pelo mesmo na interface. O botão verde, “550 nm”, tem a finalidade de selecionar o comprimento de onda de 550 nm para que a câmera fotoacústica possa ser ajustada adequadamente em sua posição, o comprimento de onda referido foi escolhido arbitrariamente. O botão INICIAR tem como função iniciar o experimento com os parâmetros definidos na interface.

O módulo de tratamento de dados fotoacústicos através do método da segunda derivada, PAS-AjusteGauss, foi implementado com sucesso e sua interface é apresentada na [Figura 28](#).

```
-----  
0 - 2ª Derivada      1 - Ajustar      2 - Mudar  $\sigma$   
3 - Mudar PerctPico 4 - rmvBg       5 - Calib. X  
6 - Sair  
--- █
```

Figura 28 – Interface em ASCII para o pacote de tratamento de dados fotoacústicos.

Fonte: Autoria própria

O módulo de tratamento de dados possui basicamente seis ferramentas funcionais que são descritas a seguir. Escolhendo-se a entrada “0” o programa irá calcular a derivada segunda para o espectro em análise, discriminar os máximos locais identificados e mostrar na tela o gráfico do espectro, sua derivada segunda e os máximos identificados. Escolhendo-se a entrada “1” o programa irá realizar o ajuste do espectro utilizando funções gaussianas tendo como referência os máximos identificados na entrada “0”. Escolhendo-se a entrada “2” será possível mudar o fator de amortecimento do filtro gaussiano aplicado ao espectro original para eliminação de ruídos indesejáveis. Escolhendo-se a entrada “3” será possível mudar o fator mínimo limitante para que um máximo local identificado seja considerado relevante para o estudo, esse fator limitante é dado como uma porcentagem do máximo local de maior intensidade. Escolhendo-se a entrada “4” o programa irá remover, se existir, o *background* constante do espectro em análise. Escolhendo-se a entrada “5” é possível recalibrar o eixo das coordenadas se, e somente se, necessário. Escolhendo-se a entrada “6” o programa encerrará.

Através dos *softwares* apresentados acima, foi possível obter o espectro fotoacústico e realizar a caracterização de cada material em análise neste trabalho. A seguir são apresentados dados experimentais que têm como objetivo demonstrar quão eficiente a técnica de espectroscopia fotoacústica pode ser no estudo de materiais orgânicos. Através da espectroscopia fotoacústica os materiais analisados puderam ser sondados sem a necessidade primária de performance de técnicas de extração, apresentando um panorama geral dos centros de cor de cada amostra estudada. Além disso, eles atestam a eficiência dos *softwares* implementados como ferramentas metodológicas indispensáveis no controle, aquisição e

tratamento de dados quem reduzem as possibilidades de erros sistemáticos durante o processo experimental.

5.1 Ácido ascórbico P.A.

O ácido L-ascórbico (ácido ascórbico P.A. ou simplesmente vitamina C) é um poderoso antioxidante, agente redutor e um nutriente essencial para os humanos, sendo ativo em vários processos bioquímicos como a síntese do colágeno e a biossíntese da carnitina [64, 65, 66]. Estudos recentes ressaltam que a vitamina C pode matar células cancerígenas do fígado e erradicar as células-tronco do câncer de fígado apoiando-a como um potencial agente quimioterápico para pacientes com câncer [67, 68]. Além disso a vitamina C é associada com a diminuição da proliferação e sobrevivência de células infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV na sigla em inglês) e é tóxica para células HIV positivas *in-vitro* [69].

Na Figura 29 são apresentados os espectros experimentais UV-Vis do ácido ascórbico P.A. diluído em água e etanol além dos espectros calculados usando a teoria da densidade funcional dependente do tempo.

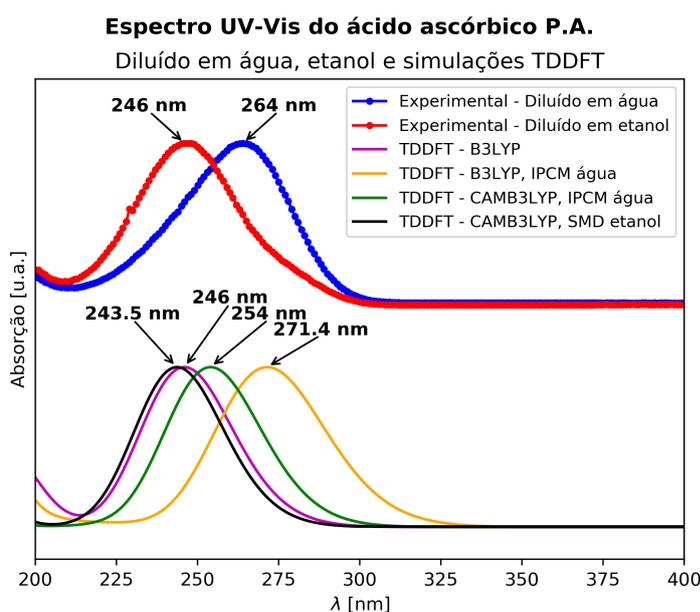


Figura 29 – Espectro de absorção UV-Vis do ácido ascórbico P.A. diluído em água apresentado na curva azul e diluído em etanol apresentado na curva vermelha. Espectro UV-Vis calculado através do método TDDFT usando o funcional B3LYP apresentado na curva magenta, adicionando-se o método de solvatação IPCM em água apresentado na curva laranja, usando o funcional CAMB3LYP e o método de solvatação IPCM em água apresentado na curva verde e usando o funcional CAMB3LYP e o método de solvatação SMD em etanol apresentado na curva preta. Os espectros experimentais foram deslocados no eixo das ordenadas por um fator constante para facilitar a comparação entre os resultados experimentais e os calculados.

Os dados experimentais apresentaram concordância com os espectros calculados. Foi observado que o espectro do soluto diluído em água apresentou um desvio para a região de menor energia quando comparado com a solução em etanol sendo o mesmo efeito observado nos espectros calculados através da teoria da densidade funcional dependente do tempo [70].

Foi realizado o ajuste do espectro fotoacústico do ácido ascórbico através de curvas gaussianas, explicitando-se as curvas, conforme a [Figura 30](#).

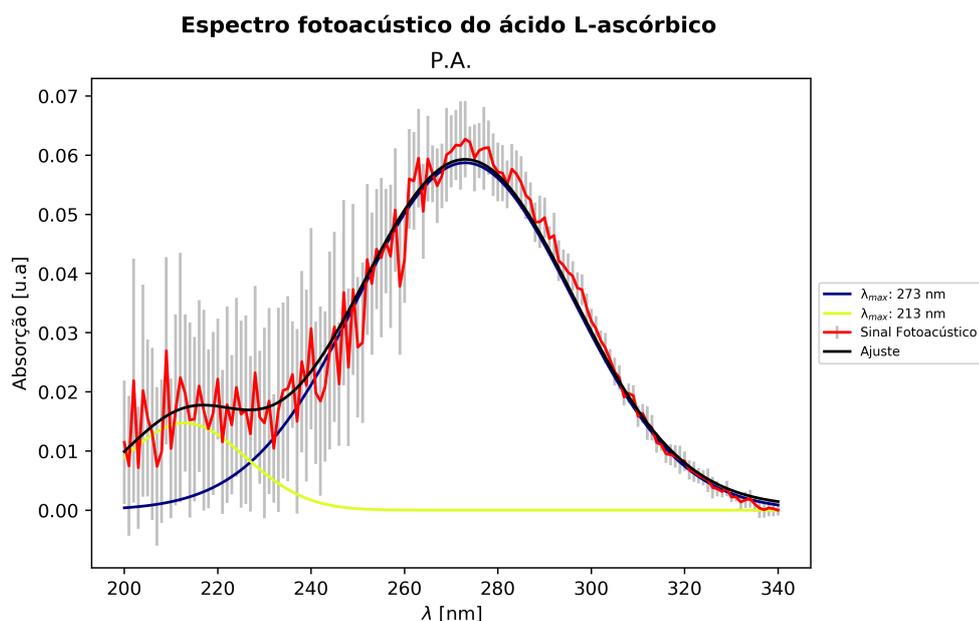


Figura 30 – Espectro fotoacústico do ácido ascórbico P.A. em vermelho com barras de desvio padrão em cinza. Centros de absorção obtidos com auxílio do método da segunda derivada e ajustados através de funções gaussianas em amarelo e azul. Curva de ajuste composta pela soma dos centros de absorção ajustados através de funções gaussianas em preto.

Fonte: Autoria própria

Observa-se, da [Figura 30](#), que o ácido ascórbico em estado sólido possui uma banda de absorção na região de UV médio em torno de 273 nm apresentando concordância com os dados obtidos através do UV-Vis e das simulações usando a teoria da densidade funcional dependente do tempo. A banda em torno de 213 nm, embora seja matematicamente aceitável, encontra-se imersa em ruído devido à pouca intensidade da fonte de radiação utilizada nessa faixa do espectro eletromagnético, portanto, tendo em vista as limitações do experimento, essa região do espectro será reservada à investigações futuras.

5.2 Folha de Pitanga (*Eugenia uniflora*)

A pitangueira (*Eugenia uniflora*) é uma planta bastante conhecida na América do Sul principalmente por seu fruto, a pitanga, que agrada a muitos paladares e tem propriedades farmacológicas [71, 72, 73]. Por outro lado, também têm sido descobertas propriedades farmacológicas muito importantes associadas com a folha da pitangueira. Extratos da folha de pitangueira mostram ação anti-inflamatória significativa [74], efeito hipotensor e vasodilatador [75, 76], ação inibidora ao aumento de glicose no plasma e níveis triglicéridos [77], efeito antibacteriano contra as cepas de *E. aerogenes* e *S. typhimurium* [78], atividades hepatoprotetoras substanciais [79], entre outros efeitos [80, 81, 82].

Neste trabalho a folha da pitangueira foi estudada em três diferentes meios, a saber, em meio líquido (diluída em etanol), em meio sólido (a solução diluída em etanol foi depositada sobre papel branco permitindo que o etanol evaporasse restando apenas as biomoléculas extraídas pelo etanol sobre o papel) e *in natura*. Esses três meios são ferramentas oportunas para mostrar o potencial da técnica de espectroscopia fotoacústica assim como dos *softwares* implementados, pois permitem que distintas análises sejam realizadas de um mesmo conjunto de entes sob diferentes perspectivas através da mesma técnica experimental.

5.2.1 Diluída em etanol

Na Figura 31 é apresentado o espectro de absorção UV-Vis dos extratos em etanol de folha de pitanga, de feofitina A e de clorofila B. Também é apresentada a curva gerada da combinação linear dos espectros de feofitina A e de clorofila B em uma tentativa de ajuste do espectro do extrato de folha de pitanga e a curva da diferença entre o espectro do extrato de folha de pitanga e a combinação linear. Os espectros de feofitina A e de clorofila B foram retirados do trabalho de H. K. Lichtenthaler [83].

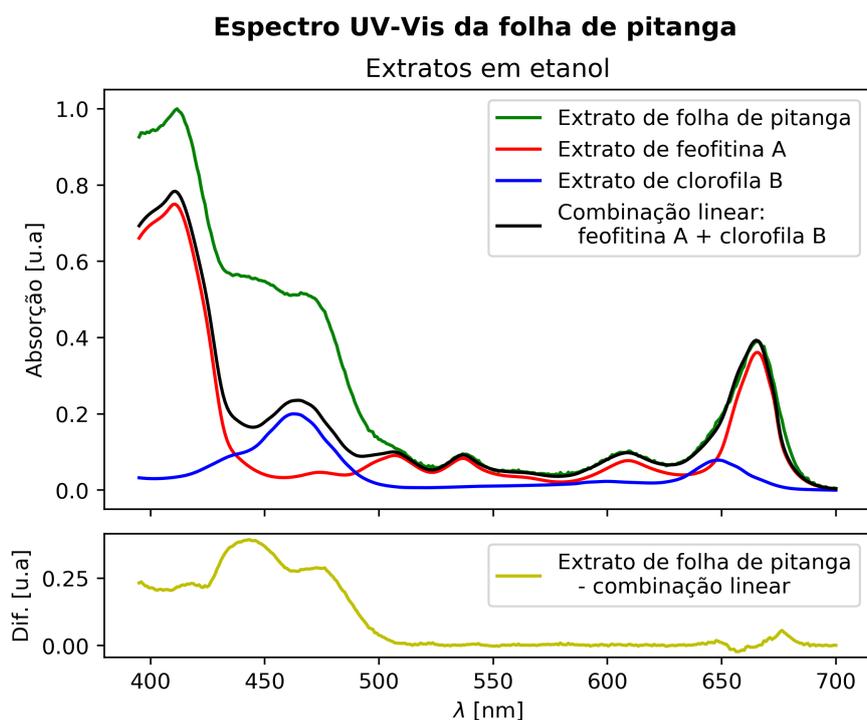


Figura 31 – Espectro de absorção UV-Vis dos extratos de folha de pitanga em etanol em verde, de feofitina A em vermelho e de clorofila B em azul. Combinação linear dos espectros de absorção de feofitina A e de clorofila B em preto e diferença entre o espectro do extrato de folha de pitanga e a combinação linear em amarelo. Os espectros de feofitina A e de clorofila B foram retirados do trabalho de H. K. Lichtenthaler [83].

Fonte: Autoria própria

A combinação linear entre os espectros dos extratos de feofitina A e clorofila B fornecem um bom ajuste para o espectro do extrato de folha de pitanga na região entre 500 e 700 nm sugerindo a presença dessas biomoléculas nessa folha. A região entre 395 e 500 nm apresenta uma diferença, entre a combinação linear dos espectros isolados, de feofitina A e clorofila B, e o extrato da folha de pitanga, que possui um perfil característico das biomoléculas do grupo carotenoide que absorvem tipicamente nessa região do espectro eletromagnético [84, 85, 86] e cujas contribuições à folha de pitanga foram observadas por

G. F. Santos *et al.* [87]. Os máximos de absorção observados nos espectros UV-Vis dos extratos de folha de pitanga, feofitina A e clorofila B estão catalogados na Tabela 1.

UV-Vis em etanol	UV-Vis observado na literatura em etanol		Referência
Folha de pitanga	Feofitina A	Clorofila B	
Picos (nm)	Picos (nm)	Picos (nm)	
411.6	410	463	[83]
448.3	473.6	543	[83]
470	506.8	600.6	[83]
537.4	536.5	648.6	[83]
563.6	565.4	—	[83]
607.3	608.2	—	[83]
665.9	666.6	—	[83]

Tabela 1 – Catalogação do centros de absorção observados nos extratos de folha de pitanga, feofitina A e clorofila B.

Na Figura 32 é apresentado o espectro fotoacústico obtido do extrato da folha de pitangueira em etanol, os principais centros de absorção obtidos a partir do método da segunda derivada, o ajuste do espectro em bandas gaussianas pelo método dos mínimos quadrados não lineares e os coeficientes de determinação R-quadrado e R-quadrado ajustado [88].

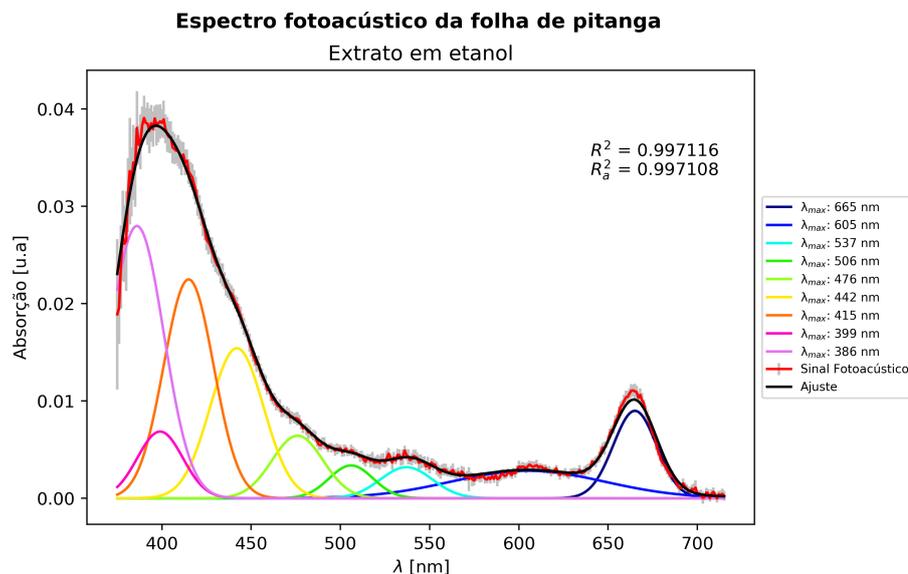


Figura 32 – Espectro fotoacústico para a folha de pitanga diluída em etanol em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos nove centros de absorção, na forma de funções gaussianas, obtidos com o auxílio do método da segunda derivada.

O espectro fotoacústico medido é formado pela superposição de várias bandas de absorção que podem pertencer a diversos entes absorvedores. A presença de bandas de absorção nas regiões vermelha e azul do espectro eletromagnético está em concordância com os espectros tradicionais de absorção óptica atribuídos às biomoléculas do grupo clorofila. Essas bandas de absorção combinadas, nas regiões vermelha e azul, são as responsáveis pela coloração caracteristicamente verde encontrada na maioria das folhas, uma vez que os comprimentos de onda não absorvidos são em sua maioria refletidos e sua superposição produzem essa tonalidade característica [89]. Os centros de absorção identificados com o auxílio do método da segunda derivada em conjunto com o método dos mínimos quadrados não lineares forneceram um ajuste que apresentou coeficientes de determinação elevados, $R^2 = 0.997116$ e $R_a^2 = 0.997108$, indicando alto nível de confiança ao modelo obtido.

Na [Tabela 2](#) são catalogados os centros de absorção observados através da técnica de espectroscopia fotoacústica, suas contribuições relativas para a formação do espectro, valores de referência da literatura e a tentativa de identificação das biomoléculas responsáveis por esses centros de absorção.

Fotoacústica em etanol		Observado na literatura UV-Vis (Em etanol)		Tentativa de identificação
Picos (nm) 2 ^a derivada	Contribuição ao espectro (%)	Picos (nm)	Referência	
386	28.62	—	—	—
399	5.84	—	—	—
415	21.25	410	[83]	Feofitina A
442	15.74	—	—	—
476	6.30	473.6	[83]	Feofitina A
506	2.86	506.8	[83]	Feofitina A
537	3.17	536.5	[83]	Feofitina A
605	8.76	608.2	[83]	Feofitina A
665	7.41	666.6	[83]	Feofitina A

Tabela 2 – Catalogação dos centros de absorção observados no extrato de folha de pitanga em etanol através da técnica de espectroscopia fotoacústica e tentativa de identificação dos mesmos.

A biomolécula feofitina A, de acordo com os dados da [Tabela 2](#), representa o principal ente absorvedor responsável pelo espectro de absorção do extrato da folha de pitanga em etanol. Não foi possível resolver as principais bandas de absorção associadas à clorofila B que devido às suas baixas intensidades provavelmente convoluíram com as bandas de absorção da feofitina A.

5.2.2 Extrato em etanol depositado sobre papel branco

Na [Figura 33](#) são apresentados o espectro fotoacústico obtido da deposição em papel branco do extrato da folha de pitanga em etanol, os principais centros de absorção obtidos com auxílio do método da segunda derivada, o ajuste do espectro em bandas gaussianas pelo método dos mínimos quadrados não lineares e os coeficientes de determinação R^2 -quadrado e R^2 -quadrado ajustado.

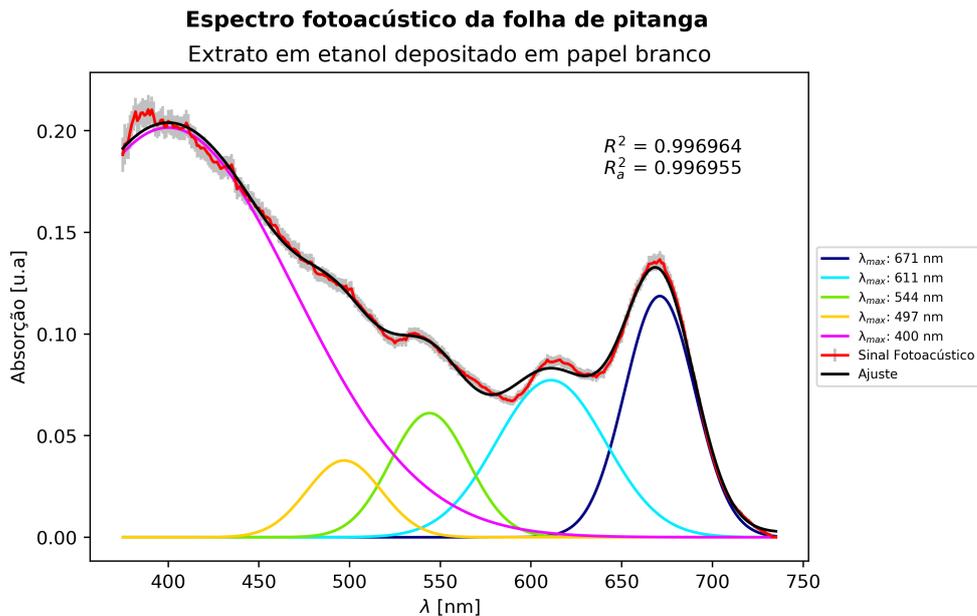


Figura 33 – Espectro fotoacústico do papel contendo as biomoléculas extraídas pelo etanol da folha de pitanga em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos cinco centros de absorção, na forma de curvas gaussianas, obtidos com auxílio do método da segunda derivada.

Fonte: Autoria própria

O espectro fotoacústico medido é formado pela superposição de várias bandas de absorção que em comparação com o espectro do extrato em etanol, [Figura 32](#), sofreu alargamento das bandas da região entre o UV-próximo e início do verde $\sim(380-500\text{nm})$ tornando difícil o estudo dessa região e deslocamento para menor energia dos centros de absorção. Esses alargamentos e deslocamentos provavelmente se dão devido às interações das biomoléculas com os entes que constituem o meio onde elas estão. Os coeficientes de determinação $R^2 = 0.996964$ e $R^2_a = 0.996955$ sugerem que os centros de absorção identificados com o auxílio do método da segunda derivada assim como o ajuste da curva se mostram consistentes com a curva experimental e têm elevada probabilidade de explicá-la.

Na [Tabela 3](#) são apresentados os centros de absorção observados através da técnica de espectroscopia fotoacústica assim como a tentativa de identificação dos centros de

absorção da feofitina A tendo como referência os valores medidos por fotoacústica e UV-Vis, ambos em etanol, catalogados na [Tabela 2](#).

Fotoacústica		Observado na literatura UV-Vis (Em etanol)		Tentativa de identificação
Papel	Etanol	Picos (nm)	Referência	
Picos (nm) 2 ^a derivada	Picos (nm) 2 ^a derivada	Picos (nm)	Referência	
400	—	—	—	—
497	—	—	—	—
544	537	536.5	[83]	Feofitina A
611	605	608.2	[83]	Feofitina A
671	665	666.6	[83]	Feofitina A

Tabela 3 – Catalogação dos centros de absorção observados no extrato de folha de pitanga em etanol depositado em papel branco através da técnica de espectroscopia fotoacústica e tentativa de identificação dos mesmos.

Foram identificados os principais centros de absorção da feofitina A na região de menor energia $\sim(500-700\text{nm})$. Os centros de absorção da clorofila B, devido sua pouca intensidade, tornaram-se indistinguíveis devido à superposição das bandas de absorção do espectro.

5.2.3 *In natura*

Na [Figura 34](#) é apresentado o espectro fotoacústico da folha de pitanga *in natura* mostrando o perfil de absorção característico dessa folha. Diferentemente dos casos anteriores, uma vez que os centros absorvedores mais intensos não estão isolados dos entes que constituem a estrutura da folha, o espectro fotoacústico da folha de pitangueira *in natura* é composto por largas bandas de absorção que se superpõem formando um espectro de difícil resolução.

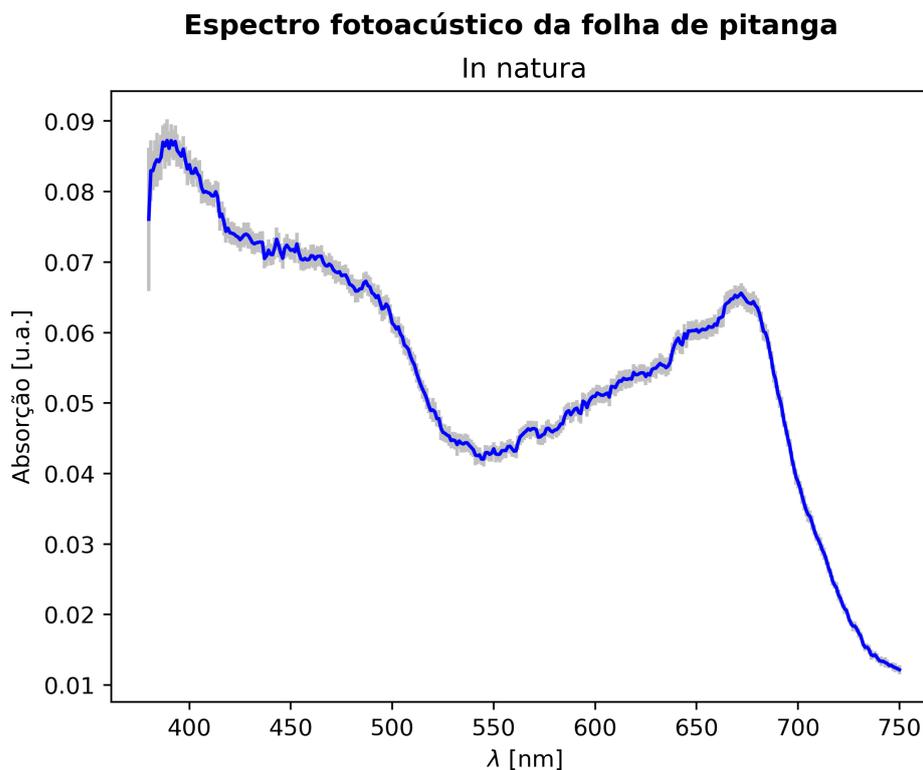


Figura 34 – Espectro fotoacústico da folha de pitanga *in natura* em azul e barras de desvio padrão em cinza.

Fonte: Autoria própria

Na [Figura 35](#) é apresentado o espectro de fase associado ao sinal fotoacústico da folha de pitangueira mostrado na [Figura 34](#), no qual é possível perceber distintas fases associadas à entes absorvedores presentes na amostra. Essa variação de fase sugere que existem entes absorvedores em diferentes profundidades na estrutura que constitui a folha de pitangueira, muito embora neste trabalho buscou-se estudar apenas os centros absorvedores associados às biomoléculas identificadas anteriormente, a saber, feofitina A e clorofila B que são os principais pigmentos responsáveis pela coloração dessa folha.

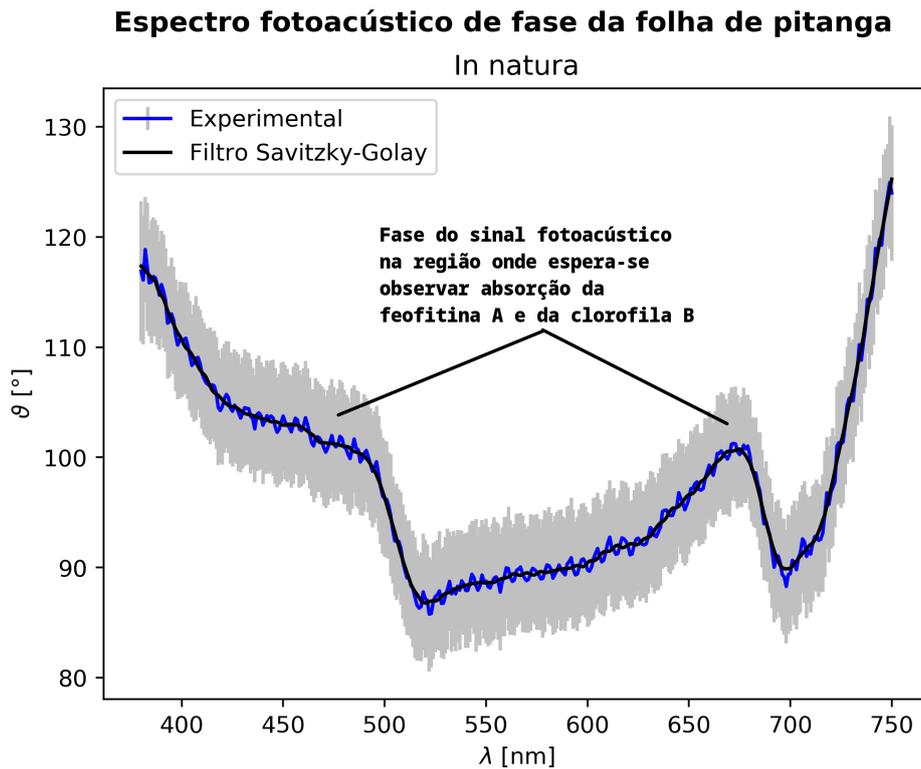


Figura 35 – Espectro fotoacústico de fase da folha de pitanga *in natura* em azul e espectro de fase com aplicação do filtro digital Savitzky-Golay para redução do ruído em preto. Destaque à fase do sinal fotoacústico na região onde espera-se observar absorção das biomoléculas feofitina A e clorofila B.

Fonte: Autoria própria

Na [Figura 36](#) é apresentado o melhor ajuste gaussiano obtido para o espectro da folha de pitanga resolvido na fase com o deslocamento computacional da fase de referência ϑ_{ref} , por um ângulo de 15° . O espectro revelou um perfil de absorção característico às biomoléculas do grupo clorofila, muito embora a região delimitada entre 400 nm e 550 nm permaneceu de difícil resolução devido a superposição das bandas absorvedoras nessa faixa do espectro. Os centros de absorção identificados com o auxílio do método da segunda derivada permitiram que o espectro fosse ajustado com altos coeficientes de determinação, a saber, $R^2 = 0.996743$ e $R_a^2 = 0.996734$. Foi possível identificar as principais bandas de absorção no vermelho da feofitina A e da clorofila B. Os centros de absorção observados na folha de pitangueira *in natura* com auxílio do método da segunda derivada, assim como a tentativa de identificação dos mesmos tendo como referência os valores medidos por fotoacústica e UV-Vis, ambos em etanol, catalogados na [Tabela 2](#), são apresentados na [Tabela 4](#).

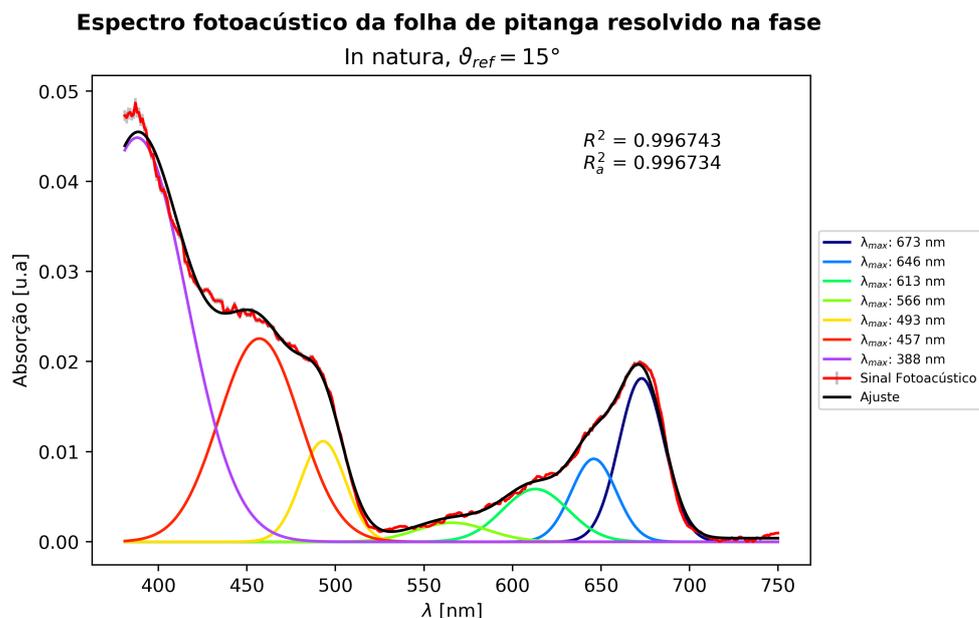


Figura 36 – Espectro fotoacústico resolvido na fase da folha de pitanga *in natura* em vermelho, obtido com o deslocamento computacional da fase de referência, ϑ_{ref} , por um ângulo de 15° . A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos sete centros de absorção, na forma de curvas gaussianas, obtidos com auxílio do método da segunda derivada.

Fonte: Autoria própria

Fotoacústica		Observado na literatura UV-Vis (Em etanol)		Tentativa de identificação
<i>In natura</i>	Etanol	Picos (nm)	Referência	
Picos (nm) 2ª derivada	Picos (nm) 2ª derivada	Picos (nm)	Referência	
388	—	—	—	—
457	—	—	—	—
493	—	—	—	—
566	—	—	—	—
613	605	608.2	[83]	Feofitina A
646	—	648.6	[83]	Clorofila B
673	665	666.6	[83]	Feofitina A

Tabela 4 – Catalogação dos centros de absorção observados na folha de pitanga *in natura* através da técnica de espectroscopia fotoacústica e tentativa de identificação dos mesmos.

5.3 Morango (*Fragaria spp.*) *in natura*

O morango é uma fruta de grande importância para o consumo humano sendo uma fonte importante de compostos bioativos devido aos seus altos níveis de vitamina C e antocianinas [90], esses compostos em especial tornam o morango um poderoso antioxidante [64, 65, 91]. Além disso, o consumo de morango e correlatos têm sido associado à diminuição do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares [90, 92].

As biomoléculas do grupo clorofila são as principais responsáveis pela coloração verde de muitas folhas e frutos antes de sua maturação. Conforme algumas folhas envelhecem e alguns frutos amadurecem as concentrações dessas biomoléculas diminuem enquanto que aumentam as concentrações de outras biomoléculas características a essas folhas e frutos [93]. Durante o processo de maturação do morango as biomoléculas do grupo clorofila cedem lugar às biomoléculas do grupo antocianina que aumentam em concentração, essas são as responsáveis pela coloração avermelhada do morango [94, 95, 96].

Na [Tabela 5](#) são apresentadas as principais biomoléculas presentes no morango e seus respectivos comprimentos de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) observado através da técnica de UV-Vis [97].

Antocianinas	UV-Vis
Cianidina-3-glicosídeo	515 nm
Cianidina-3-rutinosídeo	515 nm
Cianidina-3-malonilglicosídeo	—
Cianidina-3-malonilglucosil-5-glicosídeo	524 nm
Pelargonidina-3-galactosídeo	500 nm
Pelargonidina-3-glicosídeo	495 nm
Pelargonidina-3-rutinosídeo	503 nm
Pelargonidina-3-arabinosídeo	503 nm
Pelargonidina-3,5-diglicosídeo	500 nm
Pelargonidina-3-malilglicosídeo	503 nm
Pelargonidina-3-malonilglucosídeo	504 nm
Pelargonidina-3-acetilglicosídeo	504 nm

Tabela 5 – Principais biomoléculas previstas para o morango e seus respectivos comprimentos de onda máximo de absorção [97].

Na [Figura 37](#) são apresentados os espectros UV-Vis calculados através da teoria da densidade funcional dependente do tempo de algumas antocianinas da [Tabela 5](#) usando-se o funcional CAMB3LYP.

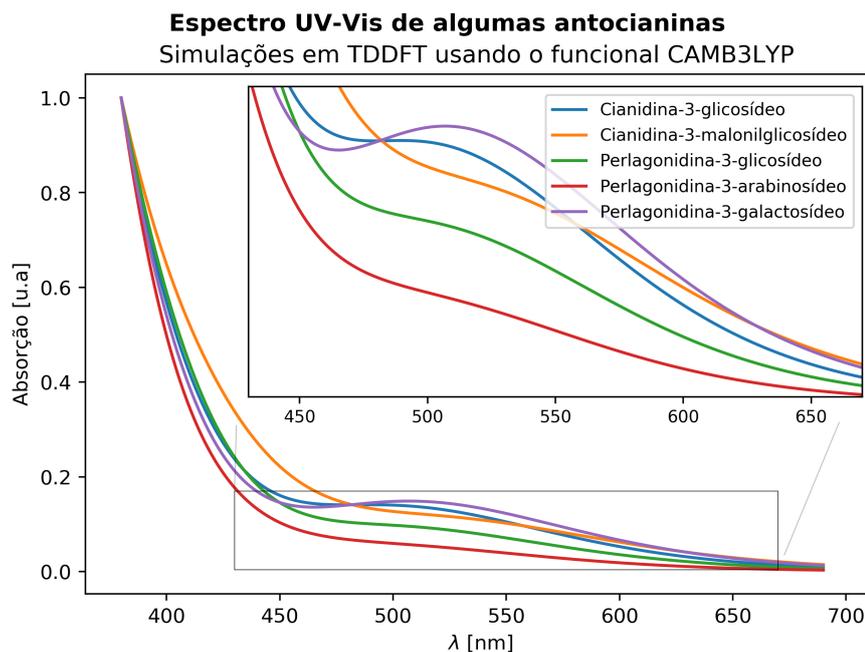


Figura 37 – Espectros de absorção UV-Vis calculados em TDDFT usando-se o funcional CAMB3LYP das biomoléculas cianidina-3-glicosídeo na curva ciano, cianidina-3-malonilglicosídeo na curva laranja, pelargonidina-3-glicosídeo na curva verde, pelargonidina-3-arabinosídeo na curva vinho e pelargonidina-3-galactosídeo na curva magenta.

Fonte: Autoria própria

Foi realizado o ajuste do espectro fotoacústico através de curvas gaussianas, explicitando-se as curvas conforme a [Figura 38](#) e por motivos didáticos as três bandas de absorção que compõem o espectro foram destacadas. Os centros de absorção que compõem o espectro fotoacústico, identificados com auxílio do método da segunda derivada, suas áreas e suas contribuições percentuais para a formação do espectro experimental foram catalogados na [Tabela 6](#). As bandas 1 e 2 compõem a parte mais significativa do espectro de absorção e é composta pela superposição de diversos centros de absorção. Esses centros de absorção observados na banda 2 estão de acordo com os máximos de absorção das principais biomoléculas, responsáveis pela coloração do morango, catalogadas na [Tabela 5](#) e também com os resultados obtidos através da teoria da densidade funcional dependente do tempo apresentados na [Figura 37](#). A banda 3, na região vermelha do espectro eletromagnético, é geralmente característica das biomoléculas do grupo clorofila quando observada em materiais vegetais, portanto essa banda sugere que a amostra continha biomoléculas desse grupo, remanescentes do processo de maturação [93].

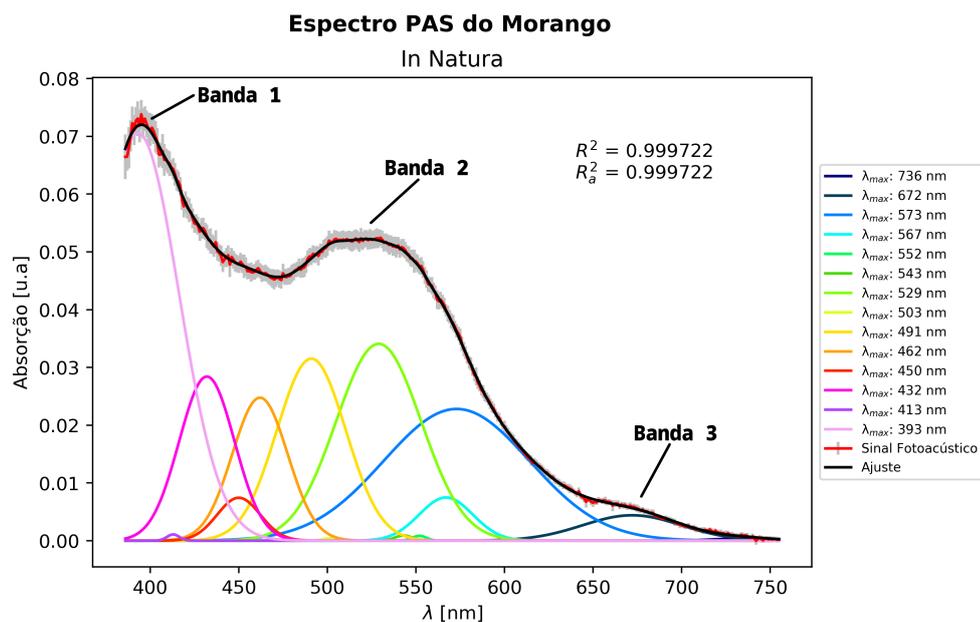


Figura 38 – Espectro fotoacústico do morango *in natura* em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos catorze centros de absorção, na forma de curvas gaussianas, obtidos com auxílio do método da segunda derivada.

Fonte: Autoria própria

Experimental - Fotoacústica			
Banda	Pico 2 ^a deriv.	Área (u.a.)	Contribuição ao espectro (%)
1	393 nm	4.12154	31.67
	413 nm	0.00953	0.07
	432 nm	1.11178	8.54
	450 nm	0.22677	1.74
2	462 nm	0.96916	7.44
	491 nm	1.53814	11.82
	503 nm	0.00548	0.04
	529 nm	2.05077	15.76
	543 nm	0.01097	0.08
	552 nm	0.00834	0.06
	567 nm	0.28305	2.17
3	573 nm	2.35184	18.07
	672 nm	0.30824	2.36
	736 nm	0.01655	0.12

Tabela 6 – Agrupamento dos máximos de absorção do morango em função das bandas de absorção.

5.4 Uva *red globe* (*Vitis vinifera* “Red Globe”) *in natura*

A uva *red globe* é uma variedade de uva de mesa bastante conhecida e consumida. É característica dessa variedade frutos grandes e avermelhados. A uva *red globe* é rica em polifenóis dentre os quais as antocianinas cianidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo são as principais biomoléculas responsáveis pela pigmentação característica dessa fruta [98]. Essas características fazem dessa fruta uma importante fonte de agentes antioxidantes sendo atuante na redução dos fatores de risco para doenças crônicas como, por exemplo, as doenças cardiovasculares [98, 99].

Na Figura 39 é apresentado o espectro fotoacústico da uva *red globe in natura*, os principais centros de absorção obtidos a partir do método da segunda derivada, o ajuste do espectro em bandas gaussianas pelo método dos mínimos quadrados não lineares e os coeficientes de determinação R-quadrado e R-quadrado ajustado.

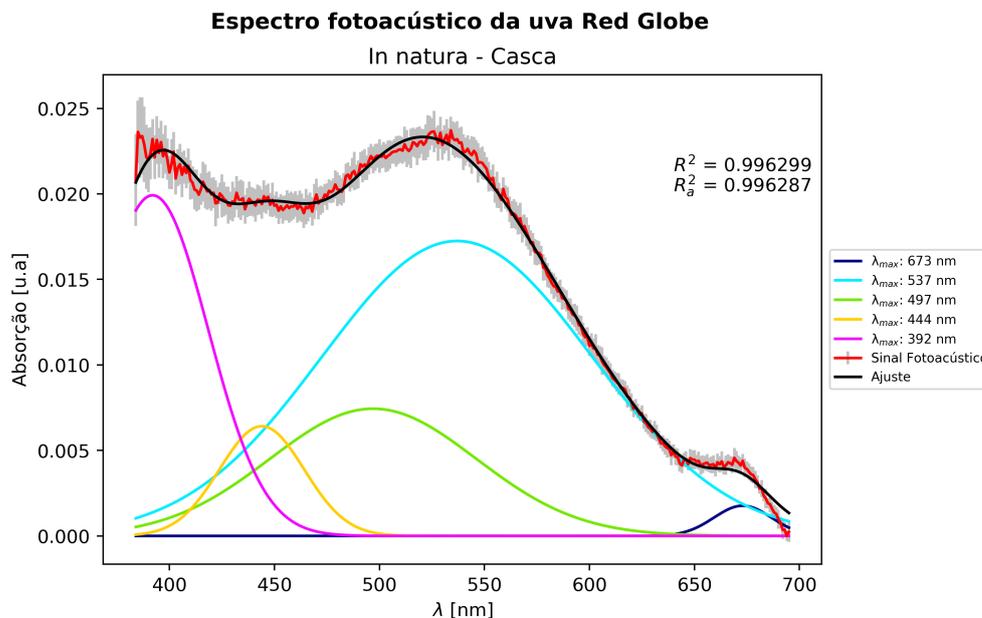


Figura 39 – Espectro fotoacústico da uva *red globe in natura* em vermelho e barras de desvio padrão em cinza. A curva em preto é o ajuste composto pela combinação linear dos cinco centros de absorção, na forma de funções gaussianas, obtidos com o auxílio do método da segunda derivada.

Fonte: Autoria própria

O espectro da Figura 39 é composto por largas bandas de absorção que se superpõem. Os centros de absorção identificados com o auxílio do método da segunda derivada permitiram que o espectro fosse ajustado com bastante confiança, gerando coeficientes de determinação $R^2 = 0.996299$ e $R_a^2 = 0.996287$. Esses centros de absorção estão em concordância com a região de absorção das principais biomoléculas responsáveis pela pigmentação característica da uva *red globe*, cianidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3-O-

glicosídeo, que possuem máximos de absorção na região visível entre 450 e 600 nm [100, 101] e estão catalogados na Tabela 7. A banda na região vermelha do espectro eletromagnético em materiais vegetais é geralmente característica de biomoléculas pertencentes ao grupo clorofila, portanto, a banda observada centrada em 673 nm sugere que essa amostra continha biomoléculas desse grupo, remanescentes do processo de maturação [93].

Fotoacústica	Observado na literatura HPLC-DAD-ESI/MS	
	Cianidina-3-O-glicosídeo	Peonidina-3-O-glicosídeo
<i>Uva red globe in natura</i>		
Picos (nm) segunda derivada	Picos (nm)	Picos (nm)
392	202	199
444	279	280
497	517	520
537	Referência: [101]	
673		

Tabela 7 – Catalogação dos centros de absorção observados na uva *red globe in natura* através da técnica de espectroscopia fotoacústica com o auxílio do método da segunda derivada e dos principais picos de absorção das biomoléculas cianidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo observadas na literatura através da técnica de HPLC-DAD-ESI/MS.

O espectro de fase da uva *red globe in natura* é apresentado Figura 40 e mostra uma variação de fase na região do espectro visível onde espera-se encontrar os máximos de absorção das biomoléculas responsáveis pela pigmentação da uva *red globe*, entre 500 e 600 nm. Essa variação de fase indica que os entes absorvedores associados a essa fase estão espacialmente localizados em uma região distinta dos demais entes absorvedores que compõem o espectro de absorção dessa fruta.

Com o objetivo de melhor sondar os entes absorvedores associados à variação de fase em destaque na Figura 40 o espectro da uva *red globe in natura* foi resolvido na fase para um deslocamento computacional da fase de referência por um ângulo $\vartheta_{ref} = -31^\circ$ e é apresentado na Figura 41. Embora as bandas de absorção da cianidina-3-O-glicosídeo e da peonidina-3-O-glicosídeo aparecem superpostas no espectro resolvido na fase, essa superposição é bem definida no espectro e encontra-se centrada em uma larga banda em torno de 551 nm.

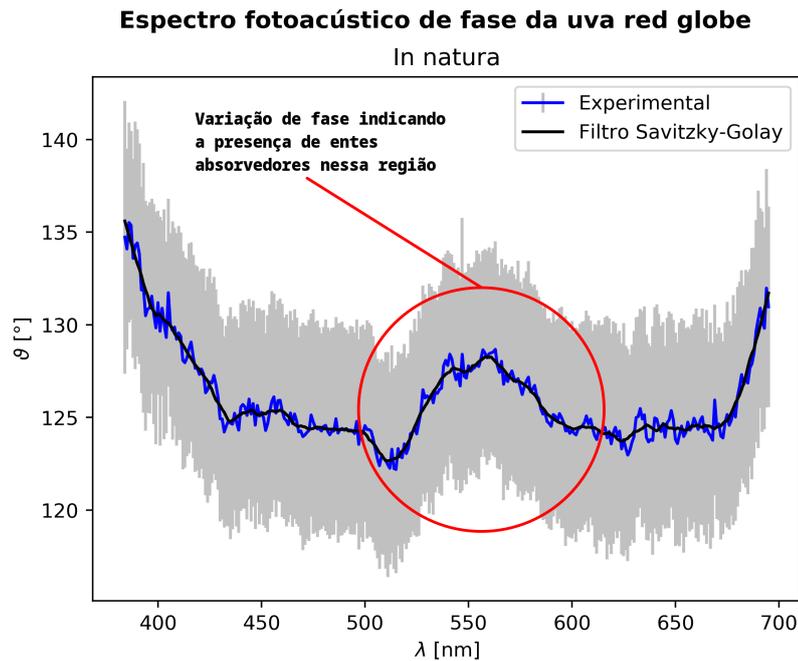


Figura 40 – Espectro fotoacústico de fase da uva *red globe in natura* em azul, barras de desvio padrão em cinza e espectro de fase com aplicação do filtro digital Savitzky-Golay para redução do ruído em preto. Destaque à região onde espera-se observar os principais centros de absorção para essa fruta na região visível.

Fonte: Autoria própria

Espectro fotoacústico de fase da uva red globe resolvido na fase
In natura, $\theta_{ref} = -31^\circ$

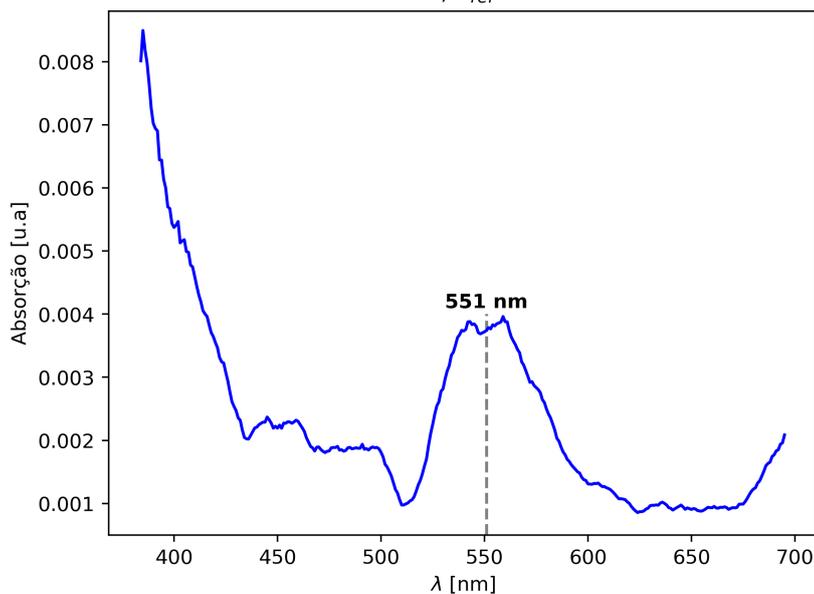


Figura 41 – Espectro fotoacústico resolvido na fase da uva *red globe in natura* com um deslocamento computacional da fase de referência por um ângulo $\theta_{ref} = -31^\circ$. Destaque à larga banda de absorção centrada em 551 nm.

Fonte: Autoria própria

6 Conclusões

Este trabalho teve como objetivo apresentar a espectroscopia fotoacústica como uma ferramenta poderosa para o estudo de biomoléculas e para isso foram desenvolvidas ferramentas computacionais que auxiliaram na caminhada até esse alvo. O *software* de automação e controle do espectrômetro fotoacústico, PAS 1.0.7, foi implementado com sucesso e permitiu a performance de todos os experimentos envolvendo a técnica de espectroscopia fotoacústica apresentados neste trabalho. Também foi realizada a implementação do pacote de tratamento de dados através do método da segunda derivada, PAS-AjusteGauss, que se mostrou muito eficiente para análise e identificação das pequenas variações do espectro bem como prático de se utilizar, permitindo a aplicação de fatores limitantes ao ajuste, tais como filtro gaussiano e amplitude mínima limitante aos resultados da segunda derivada.

Os resultados experimentais se mostraram bastante promissores, proporcionando que diversas facetas da técnica de espectroscopia fotoacústica fossem exploradas, do mesmo modo que puseram à teste o pacote de tratamento de dados, PAS-AjusteGauss.

O espectro de absorção da ácido L-ascórbico em sua forma pura foi obtido através da espectroscopia fotoacústica demonstrando o poder dessa técnica para sondar sistemas cristalinos. Além disso, o espectro foi ajustado e a principal banda de absorção identificada, expressando concordância com os espectros UV-Vis e com os resultados obtidos através das simulações TDDFT.

A folha de pitanga (*Eugenia uniflora*) foi estudada em três diferentes meios propiciando a identificação das principais bandas de absorção da feofitina A e da clorofila B. O espectro fotoacústico do extrato da folha de pitanga em etanol realçou a capacidade da espectroscopia fotoacústica em sondar sistemas imersos em meios líquidos com bastante resolução, sendo possível distinguir todas as bandas de absorção com o auxílio do pacote de tratamento de dados. O espectro fotoacústico do pigmento obtido do extrato em etanol da folha de pitanga depositado em papel branco apresentou bandas com intensidades notórias, permitindo a identificação das principais bandas de absorção da feofitina A na região de menor energia do espectro. O espectro fotoacústico da folha de pitanga *in natura* apresentou o perfil de absorção para esse material em sua forma original sem a interferência invasiva de solventes. Além disso, devido à sua estrutura característica, a folha de pitanga propiciou que o método da fase pudesse ser aplicado para identificação dos entes absorvedores mais internos, manifestando o poder da espectroscopia fotoacústica em sondar sistemas multicamadas. Isso permitiu que as principais bandas de absorção da feofitina A, na região de menor energia do espectro, fossem identificadas, mostrando

grande concordância com os resultados obtidos à partir do depósito do pigmento extraído em etanol depositado sobre papel branco, indicando que mais atenção deve ser dispensada à essa metodologia em trabalhos futuros.

O espectro fotoacústico do morango (*Fragaria spp.*) *in natura* evidenciou três largas bandas de absorção que foram estudadas com auxílio do pacote de tratamento de dados, PAS-AjusteGauss. Os resultados obtidos indicaram a presença de centros absorvedores na região onde esperava-se observar as principais antocianinas apontadas pela literatura, assim como corroborou com os resultados obtidos através das simulações TDDFT para algumas dessas antocianinas. Além disso, a banda observada na região vermelha do espectro eletromagnético sugeriu a presença de biomoléculas do grupo clorofila na amostra de morango.

O espectro fotoacústico da uva *red globe in natura* (*Vitis vinifera* “Red Globe”) apresentou o perfil de absorção para essa fruta em sua forma original sem a interferência invasiva de solventes. Com auxílio do pacote de tratamento de dados, PAS-AJusteGauss, foi possível distinguir as possíveis bandas de absorção que compõem o espectro. O método da fase por outro lado, propiciou a identificação de uma larga banda de absorção na região onde esperava-se observar a superposição das bandas de absorção da cianidina-3-O-glicosídeo e da peonidina-3-O-glicosídeo.

Todos esses resultados asseveram o potencial da espectroscopia fotoacústica como ferramenta para o estudo de biomoléculas, sejam elas em extrato, em seu ambiente natural ou em um substrato misto, dando ao cientista um panorama geral do ente estudado e guiando-o acerca do caminho que ele deve percorrer para melhor esclarecer seus questionamentos. Os resultados aqui catalogados fornecem motivação e sólida base experimental para que novos estudos sejam elaborados com o fim de melhor caracterizar os materiais apresentados, além de encorajar a implementação de novas ferramentas computacionais e avanços instrumentais que permitam que outros dados sejam extraídos através da técnica de fotoacústica.

7 Perspectivas

Tendo em vista todos os conhecimentos adquiridos, as habilidades desenvolvidas e os resultados obtidos durante a elaboração deste trabalho seguem em destaque algumas perspectivas:

- Realizar o registro dos *softwares* implementados junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial¹, INPI.
- Estender a metodologia aqui usada para estudo de outras frutas e de outros materiais orgânicos.
- Desenvolver um espectrômetro fotoacústico de câmara aberta para obtenção de propriedades térmicas associadas ao material estudado.
- Desenvolver instrumentação de baixo custo e *software* para aquisição de dados e controle do espectrômetro fotoacústico de câmara aberta, respectivamente.
- Elaboração de artigos científicos.

¹ <<https://www.gov.br/inpi/pt-br>>

Referências

- 1 BERG JOHN L. TYMOCZKO, L. S. J. M. *Biochemistry, Fifth Edition: International Version*. Fifth edition. [S.l.]: W. H. Freeman, 2002. ISBN 0716746840,9780716746843. Citado na página 25.
- 2 LÍNZE BOLD, I. et al. Study on the synthesis, antioxidant properties, and self-assembly of carotenoid–flavonoid conjugates. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 25, n. 3, p. 636, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules25030636>>. Citado na página 25.
- 3 PÉREZ-GÁLVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 9, n. 6, p. 505, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox9060505>>. Citado na página 25.
- 4 ZHOU, L. et al. Antioxidant activity of high purity blueberry anthocyanins and the effects on human intestinal microbiota. *LWT*, Elsevier, v. 117, p. 108621, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108621>>. Citado na página 25.
- 5 DING, T. et al. Evaluation of phenolic components (anthocyanins, flavanols, phenolic acids, and flavonols) and their antioxidant properties of peach fruits. *Scientia Horticulturae*, Elsevier, v. 268, p. 109365, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109365>>. Citado na página 25.
- 6 MAZZA, G. Anthocyanins and heart health. *Annali-Istituto Superiore Di Sanita, ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO*, v. 43, n. 4, p. 369, 2007. Citado na página 25.
- 7 NISHINO, H. et al. Cancer prevention by carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, De Gruyter, v. 71, n. 12, p. 2273–2278, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00293-5](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00293-5)>. Citado na página 25.
- 8 PAPPAS, D.; SMITH, B. W.; WINEFORDNER, J. D. Raman spectroscopy in bioanalysis. *Talanta*, Elsevier, v. 51, n. 1, p. 131–144, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00254-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00254-4)>. Citado na página 25.
- 9 BARDING, G. A.; SALDITOS, R.; LARIVE, C. K. Quantitative nmr for bioanalysis and metabolomics. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Springer, v. 404, n. 4, p. 1165–1179, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6188-z>>. Citado na página 25.
- 10 FALLON, A.; BOOTH, R.; BELL, L. *Applications of HPLC in Biochemistry*. [S.l.]: Elsevier, 1987. Citado na página 25.
- 11 BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy. *Photosynthesis research*, Springer, v. 101, n. 2-3, p. 157–170, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>>. Citado na página 25.
- 12 ZHANG, Q.-W.; LIN, L.-G.; YE, W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, Springer, v. 13, n. 1, p. 20,

2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>>. Citado na página 25.

13 ROSENCWAIG, A.; GERSHO, A. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, American Institute of Physics, v. 47, n. 1, p. 64–69, 1976. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.322296>>. Citado 9 vezes nas páginas 25, 54, 57, 58, 59, 61, 62, 63 e 65.

14 JR, O. P. et al. Two-beam photoacoustic phase measurement of the thermal diffusivity of solids. *Journal of applied physics*, American Institute of Physics, v. 59, n. 4, p. 1316–1318, 1986. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.336524>>. Citado na página 26.

15 LEITE, N. et al. Photoacoustic measurement of thermal diffusivity of polymer foils. *Journal of applied physics*, American Institute of Physics, v. 61, n. 8, p. 3025–3027, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.337853>>. Citado na página 26.

16 YAÑEZ-LIMÓN, M. et al. Photoacoustic measurements of thermal diffusivity and correlation with viscosity of instant corn dry masa flour. *Analyst*, Royal Society of Chemistry, v. 120, n. 7, p. 1953–1958, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/AN9952001953>>. Citado na página 26.

17 SCOFIELD, J. H. Frequency-domain description of a lock-in amplifier. *American journal of physics*, American Association of Physics Teachers, v. 62, n. 2, p. 129–133, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1119/1.17629>>. Citado na página 29.

18 VARGAS, H.; MIRANDA, L. Photoacoustic and related photothermal techniques. *Physics Reports*, Elsevier, v. 161, n. 2, p. 43–101, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0370-1573\(88\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0370-1573(88)90100-7)>. Citado na página 29.

19 BORKOWSKI, M.; SKRODZKA, E. B.; LINDE, B. B. Comparison of single and dual-phase lock-in amplifiers for photoacoustic spectroscopy. *Instrumentation Science & Technology*, Taylor & Francis, v. 42, n. 4, p. 469–474, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10739149.2014.888671>>. Citado na página 30.

20 CARTER, B.; BROWN, T. R. *Handbook of operational amplifier applications*. [S.l.]: Texas Instruments Dallas, Tex, USA, 2001. Citado na página 41.

21 REIF, F. *Fundamentals of statistical and thermal physics*. 1. ed. [S.l.]: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 1965. (McGraw-Hill Series in Fundamentals of Physics). ISBN 0070518009,9780070518001. Citado 2 vezes nas páginas 43 e 44.

22 CESAR, C. et al. Phase-resolved photoacoustic microscopy: Application to ferromagnetic layered samples. *Journal of applied physics*, American Institute of Physics, v. 55, n. 10, p. 3460–3464, 1984. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.332954>>. Citado na página 49.

23 LIMA, G. et al. Phase-resolved photoacoustic spectroscopy: application to metallic-ion-doped glasses. *Physical Review B*, APS, v. 36, n. 18, p. 9812, 1987. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.332954>>. Citado na página 49.

- 24 BAESSO, M. et al. Phase-resolved photoacoustic spectroscopy and epr investigation of mno 2-and coo-doped soda-lime glasses. *Physical Review B*, APS, v. 40, n. 3, p. 1880, 1989. Disponível em: <<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.40.1880>>. Citado na página 49.
- 25 JAIME, J. et al. Phase resolved method using the hill-climbing metaheuristic algorithm applied for the spectral separation from photoacoustic spectra of chilli pepper skin and yellow corn pericarp. *Measurement*, Elsevier, v. 138, p. 143–148, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2019.02.012>>. Citado na página 49.
- 26 ROJAS-MARROQUIN, A. et al. Application of photoacoustic spectroscopy and phase-resolved technique to the study of photoprotective pigments in golden delicious apple (*malus domestica*). *International Journal of Thermophysics*, Springer, v. 41, n. 3, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10765-020-2606-1>>. Citado na página 49.
- 27 MATHEWS, J. H.; FINK, K. D. et al. *Numerical methods using MATLAB*. [S.l.]: Pearson prentice hall Upper Saddle River, NJ, 2004. v. 4. Citado na página 51.
- 28 LINDON, J. C.; TRANTER, G. E.; KOPPENAAL, D. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. [S.l.]: Academic Press, 2016. Citado na página 53.
- 29 NEWTON, I. 1704. opticks: or, a treatise of the reflexions, refractions, inflexions and colours of light. *Royal Society of London*. Citado na página 53.
- 30 EDINBURGH, P. S. of. *Essays and Observations, Physical and Literary*. [S.l.]: G. Hamilton and J. Balfour, 1756. v. 2. 33–36 p. Citado na página 53.
- 31 COSENS, C. A balance-detector for alternating-current bridges. *Proceedings of the physical society*, IOP Publishing, v. 46, n. 6, p. 818, 1934. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/0959-5309/46/6/310>>. Citado na página 54.
- 32 ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy of biological materials. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 181, n. 4100, p. 657–658, 1973. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/science.181.4100.657>>. Citado na página 54.
- 33 ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy. *Annual review of biophysics and bioengineering*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 9, n. 1, p. 31–54, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.09.060180.000335>>. Citado na página 54.
- 34 LEBLANC, R. M.; PUC CETTI, G. Photoacoustic spectroscopy applied to biological materials. In: *Analytical Use of Fluorescent Probes in Oncology*. [S.l.]: Springer, 1996. p. 59–64. Citado na página 54.
- 35 PEREIRA, A. C. et al. Opc technique for in vivo studies in plant photosynthesis research. *Measurement Science and Technology*, IOP Publishing, v. 3, n. 9, p. 931, 1992. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/0957-0233/3/9/023>>. Citado na página 54.
- 36 VALLURU, K. S.; CHINNI, B. K.; RAO, N. A. Photoacoustic imaging: opening new frontiers in medical imaging. *Journal of clinical imaging science*, Scientific Scholar, v. 1, 2011. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4103%2F2156-7514.80522>>. Citado na página 54.

- 37 BAYER, C. L.; LUKE, G. P.; EMELIANOV, S. Y. Photoacoustic imaging for medical diagnostics. *Acoustics today*, NIH Public Access, v. 8, n. 4, p. 15, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1121/1.4788648>>. Citado na página 54.
- 38 BELL, A. G. Upon the production and reproduction of sound by light. *Journal of the Society of Telegraph Engineers*, IET, v. 9, n. 34, p. 404–426, 1880. Citado 2 vezes nas páginas 55 e 58.
- 39 BELL, A. G. Lxviii. upon the production of sound by radiant energy. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, Taylor & Francis, v. 11, n. 71, p. 510–528, 1881. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786448108627053>>. Citado 2 vezes nas páginas 56 e 58.
- 40 RAYLEIGH, L. The photophone. *Nature*, v. 23, n. 586, p. 274–275, 1881. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/023274a0>>. Citado 2 vezes nas páginas 56 e 58.
- 41 PREECE, W. H. I. on the conversion of radiant energy into sonorous vibrations. *Proceedings of the Royal Society of London*, The Royal Society London, v. 31, n. 206–211, p. 506–520, 1881. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspl.1880.0071>>. Citado 2 vezes nas páginas 56 e 58.
- 42 VEINGEROV, M. Eine methode der gasanalyse beruhend auf dem optisch-akustischen tyndall- röntgeneffekt. In: *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. [S.l.: s.n.], 1938. v. 19, p. 687. Citado na página 56.
- 43 KERR, E. L.; ATWOOD, J. G. The laser illuminated absorptivity spectrophone: a method for measurement of weak absorptivity in gases at laser wavelengths. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 7, n. 5, p. 915–921, 1968. Disponível em: <<https://doi.org/10.1364/AO.7.000915>>. Citado na página 56.
- 44 PARKER, J. Optical absorption in glass: investigation using an acoustic technique. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 12, n. 12, p. 2974–2977, 1973. Disponível em: <<https://doi.org/10.1364/AO.12.002974>>. Citado na página 57.
- 45 FOURIER, J. B. J. baron. *Théorie analytique de la chaleur*. [S.l.]: F. Didot, 1822. Citado na página 59.
- 46 TALER, J.; DUDA, P. *Solving direct and inverse heat conduction problems*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2010. Citado na página 59.
- 47 ZIELENKIEWICZ, W.; MARGAS, E. *Theory of calorimetry*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2006. v. 2. Citado na página 59.
- 48 BOUGUER, P. *Essai d'optique sur la gradation de la lumière*. [S.l.]: Gauthier-Villars et Cie., 1921. Citado na página 61.
- 49 TAGIROV, R.; TAGIROV, L. Lambert formula—bouguer absorption law? *Russian physics journal*, Springer, v. 40, n. 7, p. 664–669, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF02514957>>. Citado na página 61.
- 50 ROSENCWAIG, A. Photoacoustic spectroscopy. *Annual review of biophysics and bioengineering*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 9, n. 1, p. 31–54, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.bb.09.060180.000335>>. Citado na página 66.

- 51 OWEN, A. J. et al. Uses of derivative spectroscopy. *UV-Visible Spectroscopy, Agilent Technologies*, 1995. Citado na página 71.
- 52 SCHEINOST, A. et al. Use and limitations of second-derivative diffuse reflectance spectroscopy in the visible to near-infrared range to identify and quantify Fe oxide minerals in soils. *Clays and Clay Minerals*, Springer, v. 46, n. 5, p. 528–536, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1346/CCMN.1998.0460506>>. Citado na página 71.
- 53 MELO, W.; LÓIO, D.; VIANA, J. Aplicação da espectroscopia fotoacústica na identificação de componentes do solo. *Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2010. 8 p., 2010. Citado na página 71.
- 54 BALESTRIERI, C. et al. Second-derivative spectroscopy of proteins: A method for the quantitative determination of aromatic amino acids in proteins. *European journal of biochemistry*, Wiley Online Library, v. 90, n. 3, p. 433–440, 1978. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12622.x>>. Citado na página 71.
- 55 TZIA, G. L. C. Solid-liquid extraction. In: _____. *Extraction Optimization in Food Engineering (Food Science and Technology)*. 1. ed. [S.l.]: CRC Press, 2003. cap. 2. ISBN 0824741080,9780824741082. Citado na página 72.
- 56 GAUSSIAN Filter. In: COMPUTATIONAL Surface and Roundness Metrology. London: Springer, 2009. cap. 5, p. 33–38. Citado na página 73.
- 57 KELLEY, C. T. *Iterative methods for optimization*. [S.l.]: SIAM, 1999. Citado na página 74.
- 58 MARQUES, M. A. et al. *Fundamentals of time-dependent density functional theory*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2012. v. 837. Citado na página 74.
- 59 FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 09 Revision E.01*. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009. Citado na página 74.
- 60 BECKE, A. D. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 98, n. 2, p. 1372–1377, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.464304>>. Citado na página 74.
- 61 STEPHENS, P. J. et al. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *The Journal of physical chemistry*, ACS Publications, v. 98, n. 45, p. 11623–11627, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/j100096a001>>. Citado na página 74.
- 62 YANAI, T.; TEW, D. P.; HANDY, N. C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chemical physics letters*, Elsevier, v. 393, n. 1–3, p. 51–57, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.06.011>>. Citado na página 74.
- 63 KRISHNAN, R. et al. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *The Journal of chemical physics*, American Institute of Physics, v. 72, n. 1, p. 650–654, 1980. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.438955>>. Citado na página 74.

- 64 JOHNSON, F.; SINCLAIR, H. The antioxidant vitamins. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, Taylor & Francis, v. 11, n. 3, p. 217–309, 1979. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408397909527264>>. Citado 2 vezes nas páginas 80 e 91.
- 65 PADH, H. Vitamin c: newer insights into its biochemical functions. *Nutrition Reviews*, Oxford University Press Oxford, UK, v. 49, n. 3, p. 65–70, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1991.tb07407.x>>. Citado 2 vezes nas páginas 80 e 91.
- 66 ENGLARD, S.; SEIFTER, S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annual review of nutrition*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 6, n. 1, p. 365–406, 1986. Disponível em: <<https://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.002053>>. Citado na página 80.
- 67 CHEN, Q. et al. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 102, n. 38, p. 13604–13609, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.0506390102>>. Citado na página 80.
- 68 LV, H. et al. Vitamin c preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via svct-2. *NPJ precision oncology*, Nature Publishing Group, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41698-017-0044-8>>. Citado na página 80.
- 69 RIVAS, C. I. et al. Increased uptake and accumulation of vitamin c in human immunodeficiency virus 1-infected hematopoietic cell lines. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, v. 272, n. 9, p. 5814–5820, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1074/jbc.272.9.5814>>. Citado na página 80.
- 70 MATYUSHOV, D. V.; NEWTON, M. D. Solvent-induced shift of spectral lines in polar–polarizable solvents. *The Journal of Physical Chemistry A*, ACS Publications, v. 121, n. 11, p. 2232–2240, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b00414>>. Citado na página 81.
- 71 OLIVEIRA, P. S. et al. Eugenia uniflora fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. *Biomedicine & pharmacotherapy*, Elsevier, v. 92, p. 935–941, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.131>>. Citado na página 82.
- 72 FLORES, N. P. et al. Eugenia uniflora fruit extract exerts neuroprotective effect on chronic unpredictable stress-induced behavioral and neurochemical changes. *Journal of Food Biochemistry*, Wiley Online Library, v. 44, n. 10, p. e13442, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jfbc.13442>>. Citado na página 82.
- 73 SARKAR, S. K.; MIYAJI, T.; SASAKI, J.-i. Mini scale production of brazilian cherry fruits (eugenia uniflora l.) for the first time in nstu campus in bangladesh & the determination of antioxidant activity of different solvent extracts of ripe and non-ripe brazilian cherry fruits. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, World Journal of Advanced Research and Reviews, v. 10, n. 3, p. 048–060, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.10.3.0246>>. Citado na página 82.

- 74 SCHAPOVAL, E. et al. Evaluation of some pharmacological activities of eugenia uniflora l. *Journal of ethnopharmacology*, Elsevier, v. 44, n. 3, p. 137–142, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01178-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01178-8)>. Citado na página 82.
- 75 CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of eugenia uniflora l.(myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of ethnopharmacology*, Elsevier, v. 66, n. 1, p. 33–39, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00194-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00194-9)>. Citado na página 82.
- 76 CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of eugenia uniflora (myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of ethnopharmacology*, Elsevier, v. 81, n. 1, p. 57–63, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00039-9)>. Citado na página 82.
- 77 ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from eugenia uniflora on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *Journal of ethnopharmacology*, Elsevier, v. 68, n. 1-3, p. 307–314, 1999. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00066-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00066-5)>. Citado na página 82.
- 78 BECKER, N. A. et al. Biological properties of eugenia uniflora l. essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity. *VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde*, v. 29, n. 1, p. 22–30, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.14295/vittalle.v29i1.6267>>. Citado na página 82.
- 79 SOBEH, M. et al. A polyphenol-rich fraction from eugenia uniflora exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. *Pharmaceuticals*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 13, n. 5, p. 84, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ph13050084>>. Citado na página 82.
- 80 BELLO, E. F.; EZETEONU, A. I.; VINCENT, U. In vitro therapeutic potential of leaf extract of eugenia uniflora linn on acute-inflammation rat model. *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, Science Publishing Group, v. 6, n. 2, p. 31–38, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.11648/j.jdmp.20200602.11>>. Citado na página 82.
- 81 FERRARI, D. O. et al. Hydroalcoholic extract of eugenia uniflora as denture disinfectant: Antimicrobial activity and effect on the physical properties of polymethylmethacrylate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, SciELO Brasil, v. 63, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190704>>. Citado na página 82.
- 82 ABDELFAH, M. A. et al. Eugenia uniflora and syzygium samarangense extracts exhibit anti-trypanosomal activity: Evidence from in-silico molecular modelling, in vitro, and in vivo studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Elsevier, v. 138, p. 111508, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111508>>. Citado na página 82.
- 83 LICHTENTHALER, H. K. [34] chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1987. v. 148, p. 350–382. Citado 6 vezes nas páginas 17, 83, 84, 85, 87 e 90.
- 84 SOLOVCHENKO, A. Screening pigments: general questions. In: *Photoprotection in Plants*. Springer, 2010. p. 9–31. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-13887-4_2>. Citado na página 83.

- 85 MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; STINCO, C. M.; MAPELLI-BRAHM, P. Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: the emerging roles and applications of the uv radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. *Nutrients*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 11, n. 5, p. 1093, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/nu11051093>>. Citado na página 83.
- 86 WIDOMSKA, J.; GRUSZECKI, W. I.; SUBCZYNSKI, W. K. Factors differentiating the antioxidant activity of macular xanthophylls in the human eye retina. *Antioxidants*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 10, n. 4, p. 601, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/antiox10040601>>. Citado na página 83.
- 87 SANTOS, G. F. dos et al. Changes in colour during leaf development of eugenia uniflora (myrtaceae): different strategies for integrity conservation of the photosynthetic apparatus. *Australian Journal of Botany*, CSIRO Publishing, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/BT20145>>. Citado na página 84.
- 88 WESTFALL, P. H.; ARIAS, A. L. *Understanding regression analysis: a conditional distribution approach*. [S.l.]: CRC Press, 2020. Citado na página 84.
- 89 ATKINS, P.; ATKINS, P. W. *Atkins' molecules*. [S.l.]: Cambridge University Press, 2003. Citado na página 85.
- 90 GIAMPIERI, F. et al. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, Elsevier, v. 28, n. 1, p. 9–19, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.009>>. Citado na página 91.
- 91 PROTEGGENTE, A. R. et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin c composition. *Free radical research*, Taylor & Francis, v. 36, n. 2, p. 217–233, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10715760290006484>>. Citado na página 91.
- 92 BASU, A.; RHONE, M.; LYONS, T. J. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, Oxford University Press Oxford, UK, v. 68, n. 3, p. 168–177, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x>>. Citado na página 91.
- 93 CHRIST, B.; HÖRTENSTEINER, S. Mechanism and significance of chlorophyll breakdown. *Journal of plant growth regulation*, Springer, v. 33, n. 1, p. 4–20, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00344-013-9392-y>>. Citado 3 vezes nas páginas 91, 92 e 95.
- 94 CHENG, G. W.; BREEN, P. J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (pal) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, American Society for Horticultural Science, v. 116, n. 5, p. 865–869, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.21273/JASHS.116.5.865>>. Citado na página 91.
- 95 IHL, M.; MARTIN, A. S.; BIFANI, V. Preliminary report on colour quality measured as chlorophyllase activity in strawberries at different stages of maturity. In: *International Symposium Effect of Pre- & Postharvest factors in Fruit Storage 485*. [s.n.], 1997. p. 181–186. Disponível em: <<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.485.24>>. Citado na página 91.

- 96 MARTINEZ, G. A. et al. Characterization of peroxidase-mediated chlorophyll bleaching in strawberry fruit. *Phytochemistry*, Elsevier, v. 58, n. 3, p. 379–387, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00266-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00266-7)>. Citado na página 91.
- 97 SILVA, F. L. da et al. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food Science and Technology*, Elsevier, v. 40, n. 2, p. 374–382, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 91.
- 98 COLOMBO, F. et al. Phenolic profiles and anti-inflammatory activities of sixteen table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *Food & Function*, Royal Society of Chemistry, v. 10, n. 4, p. 1797–1807, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C8FO02175A>>. Citado na página 94.
- 99 LORENZO, C. D. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of different grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. In: EDP SCIENCES. *BIO Web of Conferences*. 2019. v. 12, p. 04005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/bioconf/20191204005>>. Citado na página 94.
- 100 SKAAR, I. et al. Purple anthocyanin colouration on lower (abaxial) leaf surface of *Hemigraphis colorata* (Acanthaceae). *Phytochemistry*, Elsevier, v. 105, p. 141–146, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.05.016>>. Citado na página 95.
- 101 LEE, J. H. Identification and quantification of anthocyanins from the grains of black rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Food Science and Biotechnology*, Springer, v. 19, n. 2, p. 391–397, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10068-010-0055-5>>. Citado na página 95.

Apêndices

APÊNDICE A – PAS 1.0.7

Código responsável pela interface gráfica do software de controle e aquisição de dados, PAS 1.0.7:

```

1 #! /bin/python3
2 # -*- encoding: utf-8 -*-
3 import sys, os
4 from PyQt5.QtWidgets import QMainWindow, QApplication, QPushButton,\
5     QMessageBox, QComboBox, QLineEdit, QFileDialog, QLabel, QSpinBox,\
6     QDoubleSpinBox, QCheckBox, QPlainTextEdit
7 from PyQt5.QtGui import QIcon
8 import PASMedidas
9
10 class App(QMainWindow):
11
12     def __init__(self):
13         super().__init__()
14         self.version = "1.0.7"
15         self.title = ("PAS %s – LPAS – UAF – UFCG"%(self.version))
16         self.setWindowIcon(QIcon("Hopstarter-Malware-Radioactive.ico"))
17         self.author = "Carlos Eduardo Rufino da Silva"
18         self.authorEmail = "carloveduardorufino7@gmail.com"
19         self.left = 600
20         self.top = 400
21         self.width = 650
22         self.height = 420
23
24         self.home()
25
26     def home(self):
27         self.setWindowTitle(self.title)
28         self.setGeometry(self.left, self.top, self.width, self.height)
29
30         arquivoMenu = self.menuBar().addMenu('Arquivo')
31         sairAcao = arquivoMenu.addAction('Sair')
32         sairAcao.triggered.connect(self.close_application)
33
34         # Botão 550nm
35         verde = QPushButton("550 nm", self)
36         verde.clicked.connect(PASMedidas.Verde)
37         verde.setStyleSheet("background-color:rgb(163,255, 0)")
38         verde.resize(100,26)
39         yVerde = 380
40         verde.move(500,yVerde)
41
42         # Botão iniciarExp
43         iniciar = QPushButton("INICIAR", self)
44         iniciar.clicked.connect(self.iniciarExp)
45         iniciar.resize(250,26)
46         iniciar.move(50,yVerde)

```

```

47
48     # Combo1 – Constante de Tempo
49     cteTempo = QLabel(self)
50     cteTempo.resize(150,20)
51     cteTempo.move(50,30)
52     cteTempo.setText("Cte. de Tempo:")
53     self.combo1 = QComboBox(self)
54     self.combo1.move(50, 50)
55     #

```

```

56     self.combo1.addItem("10 us");      self.combo1.addItem("30 us")
57     self.combo1.addItem("100 us");     self.combo1.addItem("300 us")
58     self.combo1.addItem("1 ms");       self.combo1.addItem("3 ms")
59     self.combo1.addItem("10 ms");      self.combo1.addItem("30 ms")
60     self.combo1.addItem("100 ms");     self.combo1.addItem("300 ms")
61     self.combo1.addItem("1 s");         self.combo1.addItem("3 s")
62     self.combo1.addItem("10 s");       self.combo1.addItem("30 s")
63     self.combo1.addItem("100 s");      self.combo1.addItem("300 s")
64     self.combo1.addItem("1 ks");       self.combo1.addItem("3 ks")
65     self.combo1.addItem("10 ks");      self.combo1.addItem("30 ks")
66     #

```

```

67
68     # Combo2 – Sensibilidade
69     sens = QLabel(self)
70     sens.resize(150,20)
71     sens.move(50,90)
72     sens.setText("Sensibilidade:")
73
74     self.combo2 = QComboBox(self)
75     self.combo2.move(50, 110)
76     #

```

```

77     self.combo2.addItem("2 nV/fA");    self.combo2.addItem("5 nV/fA")
78     self.combo2.addItem("10 nV/fA");   self.combo2.addItem("20 nV/fA")
79     self.combo2.addItem("50 nV/fA");   self.combo2.addItem("100 nV/fA")
80     self.combo2.addItem("200 nV/fA");  self.combo2.addItem("500 nV/fA")
81     self.combo2.addItem("1 uV/pA");    self.combo2.addItem("2 uV/pA")
82     self.combo2.addItem("5 uV/pA");    self.combo2.addItem("10 uV/pA")
83     self.combo2.addItem("20 uV/pA");   self.combo2.addItem("50 uV/pA")
84     self.combo2.addItem("100 uV/pA");  self.combo2.addItem("200 uV/pA")
85     self.combo2.addItem("500 uV/pA");  self.combo2.addItem("1 mv/nA")
86     self.combo2.addItem("2 mv/nA");    self.combo2.addItem("5 mv/nA")
87     self.combo2.addItem("10 mv/nA");   self.combo2.addItem("20 mv/nA")
88     self.combo2.addItem("50 mv/nA");   self.combo2.addItem("100 mv/nA")
89     self.combo2.addItem("200 mv/nA");  self.combo2.addItem("500 mv/nA")
90     self.combo2.addItem("1 V/uA")
91     #

```

```

92
93     # Combo3 – Filtro passa-baixa
94     lowPass = QLabel(self)
95     lowPass.resize(150,20)
96     lowPass.move(50,150)
97     lowPass.setText("Filtro Low Pass:")

```

```
98
99     self.combo3 = QComboBox(self)
100    self.combo3.move(50, 170)
101    self.combo3.addItem("6 dB/oct")
102    self.combo3.addItem("12 dB/oct")
103    self.combo3.addItem("18 dB/oct")
104    self.combo3.addItem("24 dB/oct")
105
106    # Lambda 1
107    lamb1T = QLabel(self)
108    lamb1T.resize(150,20)
109    lamb1T.move(200,30)
110    lamb1T.setText("λ1 (nm):")
111    self.lamb1 = QSpinBox(self)
112    self.lamb1.setMinimum(1)
113    self.lamb1.setMaximum(850)
114    self.lamb1.move(200,50)
115
116    # Lambda 2
117    lamb2T = QLabel(self)
118    lamb2T.resize(150,20)
119    lamb2T.move(200,90)
120    lamb2T.setText("λ2 (nm):")
121    self.lamb2 = QSpinBox(self)
122    self.lamb2.setMinimum(1)
123    self.lamb2.setMaximum(850)
124    self.lamb2.move(200,110)
125
126    # Passo
127    passoT = QLabel(self)
128    passoT.resize(150,20)
129    passoT.move(200,150)
130    passoT.setText("Passo (nm):")
131    self.passo = QDoubleSpinBox(self)
132    self.passo.move(200,170)
133
134    # Tempo de medida
135    tempoMedidaT = QLabel(self)
136    tempoMedidaT.resize(150,20)
137    tempoMedidaT.move(200,300)
138    tempoMedidaT.setText("Δt (min) | p/ M.C.:")
139    self.tempoMedida = QDoubleSpinBox(self)
140    self.tempoMedida.move(200,320)
141
142    # Nome do Arquivo
143    nomeArqHome = QLabel(self)
144    nomeArqHome.setText("Nome do Arquivo:")
145    nomeArqHome.resize(150, 20)
146    nomeArqHome.move(350, 30)
147    self.nomeArq = QLineEdit(self)
148    self.nomeArq.resize(250, 30)
149    self.nomeArq.move(350, 50)
150
151    # Endereço do Arquivo
152    nomeDirHome = QLabel(self)
```

```

153     nomeDirHome.setText("Diretório:")
154     nomeDirHome.resize(150, 20)
155     nomeDirHome.move(350, 90)
156     self.nomeDir = QLineEdit(self)
157     self.nomeDir.resize(200, 30)
158     self.nomeDir.move(350, 110)
159     dir = QPushButton("Buscar", self)
160     dir.clicked.connect(self.diretorio)
161     dir.resize(45,30)
162     dir.move(555,110)
163
164     # Ativa Filtro síncrono
165     self.filtro = QCheckBox('Filtro Síncrono (< 200Hz)', self)
166     self.filtro.setChecked(True)
167     self.filtro.resize(200, 20)
168     self.filtro.move(50,210)
169
170     yStep = 240
171     # Ativa Step-Scan
172     self.stepScan = QCheckBox('Step-Scan', self)
173     self.stepScan.setChecked(True)
174     self.stepScan.resize(200, 20)
175     self.stepScan.move(200,yStep)
176     self.stepScan.stateChanged.connect(self.atualizaModoS)
177
178     # Ativa Modo-Contínuo
179     self.modosContínuo = QCheckBox('Modo-Contínuo', self)
180     self.modosContínuo.resize(200, 20)
181     self.modosContínuo.move(200,yStep+30)
182     self.modosContínuo.stateChanged.connect(self.atualizaModoC)
183
184
185     # Modulação
186     ymodu = 260
187     modulacaoT = QLabel(self)
188     modulacaoT.resize(150,20)
189     modulacaoT.move(50,ymodu-20)
190     modulacaoT.setText("Modulação (Hz):")
191     self.shopper = QDoubleSpinBox(self)
192     self.shopper.move(50,ymodu)
193
194     yrep = 320
195     # Número de repetições
196     repT = QLabel(self)
197     repT.resize(150,20)
198     repT.move(50,yrep-20)
199     repT.setText("Nº rep. | p/ M.C.:")
200     self.rep = QSpinBox(self)
201     self.rep.setMinimum(1)
202     self.rep.move(50,yrep)
203
204     # Caixa de texto OBSERVAÇÕES
205     nomeCaixaTexto = QLabel(self)
206     nomeCaixaTexto.setText("Observações:")
207     nomeCaixaTexto.resize(150, 20)

```

```

208     nomeCaixaTexto.move(350, 150)
209     self.caixaTexto = QPlainTextEdit(self)
210     self.caixaTexto.move(350, 170)
211     self.caixaTexto.resize(250,180)
212     self.caixaTexto.insertPlainText("")
213
214     self.show()
215
216     def atualizaModoS(self):
217         if self.stepScan.checkState() == 2:
218             self.tipoMedida = ("stepScan")
219             self.modosContínuo.setChecked(False)
220     def atualizaModoC(self):
221         if self.modosContínuo.checkState() == 2:
222             self.tipoMedida = ("contínuo")
223             self.stepScan.setChecked(False)
224
225     def sobreSoftware(self):
226         msgBox = QMessageBox()
227         msgBox.setWindowTitle("PAS %s"%(self.version))
228         msgBox.setWindowIcon(QIcon("Hopstarter-Malware-Radioactive.ico"));
229         msgBox.setStandardButtons(QMessageBox.Close)
230         buttonSair = msgBox.button(QMessageBox.Close)
231         buttonSair.setText("Sair")
232         texto = ("O PAS %s tem sido desenvolvido com objetivo de aperfeiçoar
233 a "%(self.version)+\
234 "aquisição de dados do espectrômetro fotoacústico do LPAS. Este "+\
235 "software foi escrito em Python e pode ser usado e distribuído "+\
236 "livremente."+
237 "\n\nAutor: %s\nE-mail: %s"%(self.author, self.authorEmail))
238         msgBox.setText(texto)
239         msgBox.exec()
240
241     def diretorio(self):
242         self.dir_name = QFileDialog.getExistingDirectory(self, "Select
243 Directory")
244         if self.dir_name:
245             self.nomeDir.setText(self.dir_name)
246
247     def close_application(self):
248         #Função responsável por fechar aplicação
249         print("Programa finalizado!!!")
250         sys.exit()
251
252     def iniciarExp(self):
253         #Função responsável por iniciar Experimento
254         msgBox = QMessageBox()
255         msgBox.setWindowTitle("PAS %s"%(self.version))
256         msgBox.setWindowIcon(QIcon("Hopstarter-Malware-Radioactive.ico"));
257         msgBox.setIcon(QMessageBox.Information)
258         msgBox.setText("Confirme os parâmetros!")
259         msgBox.setInformativeText("Insira a amostra na câmara e clique em
260 Continuar para iniciar")
261         parametros = ("Parâmetros:\n\nCte. de Tempo: %s\nSensibilidade: %s\
262 \nFiltro Low Pass: %s\n\nλ_0 = %d\nλ_L1 = %d\nPasso = %g"

```

```

260     %(self.combo1.currentText(), self.combo2.currentText(),\
261     self.combo3.currentText(), self.lamb1.value(), self.lamb2.value(),\
262     self.passo.value())
263     msgBox.setDetailedText(parametros)
264     msgBox.setStandardButtons(QMessageBox.Yes|QMessageBox.No)
265     buttonY = msgBox.button(QMessageBox.Yes)
266     buttonY.setText("Continuar")
267     buttonN = msgBox.button(QMessageBox.No)
268     buttonN.setText("Voltar")
269
270     resp = msgBox.exec()
271
272     if (resp == 16384):
273         self.iniExp()
274
275     def iniExp(self):
276         PASMedidas.iniciaExp(cteTempo = self.combo1.currentIndex(),\
277         sens = self.combo2.currentIndex(),\
278         passaBaixa = self.combo3.currentIndex(),\
279         lambda1 = self.lamb1.value(),\
280         lambda2 = self.lamb2.value(),\
281         precisao = self.passo.value(),\
282         nomeArquivo = self.nomeArq.text(),\
283         nomeDir = self.nomeDir.text(),\
284         cteTempoText = self.combo1.currentText(),\
285         sensText = self.combo2.currentText(),\
286         passaBaixaText = self.combo3.currentText(),\
287         filtroSincrono = self.filtro.checkState(),\
288         observacoes = self.caixaTexto.toPlainText(),\
289         tipoMedida = self.tipoMedida,\
290         tempoMedida = self.tempoMedida.value(),\
291         shopper = self.shopper.value(),\
292         repeticao = self.rep.value())
293
294     if __name__=="__main__":
295         app=QApplication(sys.argv)
296         ex=App()
297         sys.exit(app.exec_())

```

Código contendo a classe responsável pela atualização em tempo real dos dados experimentais, coletados pelo PAS 1.0.7, na tela do computador:

```

1  #-*- encoding: utf-8 -*-
2  from pyqtgraph.Qt import QtGui, QtCore
3  import numpy as np
4  import pyqtgraph as pg
5  from time import sleep
6  import sys
7
8  class realTimePloter:
9
10     def __init__(self, arquivo='home', x1=200, x2=750):
11         self.arquivo = arquivo
12         self.x1 = x1
13         self.x2 = x2

```

```

14     self.author = ("Carlos Eduardo Rufino da Silva <
carlooseduardorufino7@gmail.com>")
15     self.app = QtGui.QApplication(sys.argv)
16     pg.setConfigOption('background', 'w')
17     pg.setConfigOption('foreground', 'k')
18
19     win = pg.GraphicsWindow(title="PAS Lab.")
20     win.resize(1350,700)
21     win.setWindowTitle('PAS Lab. - UAF - UFCG - Campina Grande - PB -
Brasil')
22     win.setWindowIcon(QtGui.QIcon('Hopstarter-Malware-Radioactive.ico'))
23
24     p1 = win.addPlot(title="Amplitude - R", row=0, col=0)
25     p1.setLabels(left='u.a.', bottom='λ(nm)')
26     p1.setXRange(self.x1, self.x2, padding=.1)
27     p1.showGrid(x=True, y=True)
28
29     p2 = win.addPlot(title="Fase - Theta", row=0, col=2, colspan=2)
30     p2.setLabels(left='ϑ(°)', bottom='λ(nm)')
31     p2.setXRange(self.x1, self.x2, padding=.1)
32     p2.showGrid(x=True, y=True)
33
34     self.ampR = p1.plot(pen = pg.mkPen('b', width=2))
35     self.ampTheta = p2.plot(pen= pg.mkPen('r', width=2))
36
37     self.UPDATE()
38
39     def UPDATE(self):
40         logfile = open(self.arquivo, "r")
41         loglines = self.follow(logfile)
42         x=[]
43         R=[]
44         theta=[]
45         for line in loglines:
46             if line != "#fim":
47                 line = line.split(",")
48                 x = np.append(x, float(line[0]))
49                 R = np.append(R, float(line[1]))
50                 theta = np.append(theta, float(line[3]))
51                 self.ampR.setData(x,R)
52                 self.ampTheta.setData(x, theta)
53                 self.app.processEvents()
54                 sleep(0.05)
55         logfile.close()
56
57     def follow(self, thefile):
58         thefile.seek(0,2)
59         while True:
60             line = thefile.readline()
61             if not line:
62                 continue
63             if line=="#fim":
64                 print("Fim do UPDATE")
65                 #Mantém janela aberta quanto terminar a aquisição

```

```

66         if (sys.flags.interactive != 1) or not hasattr(QtCore, '
PYQT_VERSION'):
67             QtGui.QApplication.instance().exec_()
68             yield line
69
70 if __name__ == '__main__':
71     a = realTimePlotter()

```

Código contendo os métodos de controle e aquisição de dados do PAS 1.0.7:

```

1 # -*- encoding: utf-8 -*-
2 import serial
3 import visa
4 import numpy as np
5 from time import sleep
6 import datetime as dat
7 import time
8 import multiprocessing
9
10 import classPlot
11
12 def iniciaExp(cteTempo, sens, passaBaixa, lambda1, lambda2, precisao, \
13             nomeArquivo, nomeDir, cteTempoText, sensText, passaBaixaText
14             , \
15             filtroSincrono, observacoes, tipoMedida, tempoMedida, \
16             shopper, repeticao):
17     if filtroSincrono == 2:
18         filtroSincrono = 1
19     else:
20         filtroSincrono = 0
21
22
23     vShopper = (shopper - 0.308333)/173.183333
24     # DISC2 - (shopper - 5.308333)/173.183333
25
26     #Parâmetros
27     global diretorio #Diretório onde os dados serão salvos
28     diretorio = (nomeDir + "/" + nomeArquivo + ".txt")
29     #referência equiv. a 1.0mm
30     umNM= 2132.196162
31     #Dicionário das constantes de tempo do lock-in
32     dictCteTempo = { 0:10E-6, 1:30E-6, 2:100E-6, 3:300E-6, 4:1E-3, 5:3E
-3, \
33                     6:10E-3, 7:30E-3, 8:100E-3, 9:300E-3, 10: 1, 11:3, \
34                     12:10, 13:30, 14:100, 15:300, 16:1E3, 17:3E3, 18:10E3
35             , \
36                     19:30E3 }
37     #cteTempEspera é o tempo, dado em segundos (s), que o lock-in deve
38     #esperar até estabilizar a medição
39     cteTempEspera = dictCteTempo[cteTempo]
40     #Cria arquivo de dados
41     criaArqDados(lambda1, lambda2, precisao, \
42                 cteTempoText, sensText, passaBaixaText, \
43                 observacoes, nomeArquivo, tipoMedida, shopper)

```

```

43     print("Arquivo de dados criado!")
44     #Abre comunicação com Instrumentos
45     abreComunIntruMotor()
46     abreComunIntruLockIn()
47     print("Comunicacao aberta!")
48     #Configura Motor
49     confMotor()
50     print("Motor Configurado!")
51     #Configura lock-in
52     confLockIn(cteTempo, sens, passaBaixa, filtroSincrono, vShopper)
53     print("Lock-In Configurado!")
54     #Inicia plotagem
55     iniciaGrafico(lambda1, lambda2)
56     print("Interface grafica interativa iniciada!")
57     #Realiza Medida
58     medir(unNM, lambda1, lambda2, precisao, cteTempEspera,
59           tipoMedida, tempoMedida, repeticao)
60     #Encerra comunicação com os instrumentos e com o arquivo de dados
61     encerraComunicacaoLockIn()
62     encerraComunicacaoMotor()
63     print("Comunicacao com Inst. encerrada!")
64     print("\n
-----\n")

65
66
67 def encerraComunicacaoMotor():
68     #Esta função encerra a comunicação com o motor.
69     motor.close()
70 def encerraComunicacaoLockIn():
71     #Esta função encerra a comunicação com o lock-in.
72     lockIn.close()
73
74 def criaArqDados(lambda1, lambda2, precisao, \
75                 cteTempoText, sensText, passaBaixaText, \
76                 observacoes, nomeArquivo, tipoMedida, shopper):
77     # 1. Obter data e hora
78     data = str(dat.date.today())
79     localtime = time.localtime(time.time())
80     hora = localtime.tm_hour
81     minuto = localtime.tm_min
82     if hora < 10:
83         hora = ('0'+str(hora))
84     else:
85         hora = str(hora)
86     if minuto < 10:
87         minuto = ('0'+str(minuto))
88     else:
89         minuto = str(minuto)
90     dataHoraMin = (data + ' ' + hora + 'h' + minuto + 'm')
91
92     observacoes = observacoes.split("\n")
93     arquivo = open(diretorio, "w")
94     arquivo.write("\n# Amostra: %s"%nomeArquivo)
95     arquivo.write("\n# %s\n"%dataHoraMin)
96     arquivo.write("\n# L1: %g nm\n"%(lambda1))

```

```

97     arquivo.write("# L2: %g nm\n"%lambda2)
98     arquivo.write("# Passo: %g nm\n"%precisao)
99     arquivo.write("# Cte. de Tempo: %s\n"%cteTempoText)
100    arquivo.write("# Sensibilidade: %s\n"%sensText)
101    arquivo.write("# Filtro Passa baixa: %s\n"%passaBaixaText)
102    arquivo.write("# Modulação: %g\n\n"%shopper)
103    arquivo.write("# Obs.: \n")
104    for i in range(len(observacoes)):
105        arquivo.write("# %s\n"%observacoes[i])
106    arquivo.write("\n\n#comp(nm), R(u.a.), std(R), theta(grad), std(Theta)\n\n")
107    arquivo.close()
108
109 def updateArqDados(informacao):
110     #Esta função atualiza o aquiuvo de dados.
111     arquivo = open(diretorio, "a")
112     arquivo.write(informacao)
113     arquivo.close()
114
115 def abreComunIntruMotor():
116     #Abre comunicação Serial do Motor
117     global motor
118     motor = serial.Serial(port="COM4", baudrate=9600, bytesize=8, parity="N",
119                            stopbits=1, timeout=1, xonxoff=0, rtscts=0)
120     sleep(1)
121
122 def abreComunIntruLockIn():
123     #Esta função abre a comunicação com o lock-in.
124     global lockIn
125
126     #Inicia o PyVisa
127     rm = visa.ResourceManager()
128     #Abre comunicação com lock-in
129     lockIn = rm.open_resource("GPIB0::8::INSTR")
130     #lockIn.write("OUTX 0") #Define interface de saída como GPIB
131     print("\nPorta do motor aberta")
132     #Testa comunicação
133     resp = lockIn.query("*IDN?\n")
134     if (resp)!= None:
135         print("\n %s conectado com SUCESSO!!!\n"%(resp))
136     else:
137         print("\nERRO ao conectar LockIn\n")
138         print("\nVerifique a porta de conexão!\n")
139         print("Programa ABORTADO.\n")
140         lockIn.close()
141         exit()
142
143 def confLockIn(cteTempo, sens, passaBaixa, filtroSincrono, vShopper):
144     tempoComando = 1.5
145     #Reset lock-in
146     lockIn.write("*RST \n")
147     print("Reset LockIn, OK")
148     sleep(5)
149     #Define Entrada
150     lockIn.write("ISRC 0")# 0 - A | 1 - A-B | I - 2

```

```

150     print("Define Channel Input , OK")
151     sleep(tempoComando)
152     #Define Referência
153     lockIn.write("FMODE 2")      # 2 - external (p.9)
154     print("Define Reference Signal , OK")
155     sleep(tempoComando)
156     #Define Frequência do Shopper
157     lockIn.write("AUXM 1, 0")
158     sleep(tempoComando)
159     lockIn.write("AUXV 1, %g"%vShopper)
160     sleep(tempoComando)
161     print("Define Frequencia Shopper , OK")
162     sleep(tempoComando)
163     #Define Constante de tempo
164     lockIn.write("OFLT %d\n"%cteTempo)
165     print("Time Constante , OK")
166     sleep(tempoComando)
167     #Define filtro passa-baixa
168     lockIn.write("OFSL %d"%passaBaixa)
169     print("Low Pass Filter , OK")
170     sleep(tempoComando)
171     #Define Sensibilidade
172     lockIn.write("SENS %d\n"%sens)
173     print("Sensibility , OK")
174     sleep(tempoComando)
175     #Define Acoplamento
176     lockIn.write("ICPL 0")      # 0 - AC    1 - DC (p.9)
177     print("Coupling , OK")
178     sleep(tempoComando)
179     #Synchronous Filter
180     lockIn.write("SYNC %d"%filtroSincrono) # 0 - OFF    1 - ON < 200Hz (p
181     print("Synchronous Filter , OK")
182     sleep(tempoComando)
183     #Input Shield Groundind
184     lockIn.write("IGND 0")      # 0 - Float 1 - Ground (p.9)
185     print("Input Shield Grouding , OK")
186     sleep(tempoComando)
187     #Define reserva dinâmica
188     lockIn.write("RMODE 2")      # 0 - Max    1 - Man    2 - Min (p.9)
189     print("Dinamic Reserve , OK")
190     sleep(tempoComando)
191     #Define Sample Rate
192     lockIn.write("SRAT 13")
193     print("Define Sample Rate , OK")
194     sleep(tempoComando)
195     #Define o que será mostrado no Display
196     lockIn.write("DTRC 1, 3")    #| Set (Query) theFull (i=0), Top (i=1) or
197     print("Show display , OK")
198     sleep(tempoComando)         #| Bottom (i=2) Display Trace to trace
199     lockIn.write("DTRC 2, 4")    #| j (1,2,3,4).
200     sleep(tempoComando)         #| Ver pg. 10
201
202 def confMotor():
203     #Liga motor

```

```

204     motor.write(b" \r")
205     sleep(1)
206     #Reset
207     motor.write(b"^C\r")
208     sleep(1)
209     #Define velocidade do motor
210     motor.write(b"V60000\r")
211     sleep(1)
212
213 def rebobMotor(nm2):
214     #Leva motor até zerar o mostrador
215     motor.write(b"+3255103\r")
216     resp = ''
217     while (resp !=('] 64 \r\n')):
218         motor.write(b"]\r")
219         resp = motor.readline()
220         resp = resp.decode('utf-8')
221         sleep(1)
222     print("0 motor chegou no limite Superior!!")
223     #levar motor até nm2
224     motor.write(b"%d\r"%(nm2))
225     sleep(10)
226     print("0 motor chegou no Ponto De Partida!!")
227
228
229 def Verde():
230     abreComunIntruMotor()
231     confMotor()
232     rebobMotorVerde()
233     encerraComunicacaoMotor()
234
235 def rebobMotorVerde():
236     #Leva motor até zerar o mostrador
237     motor.write(b"^C\r")
238     sleep(1)
239     motor.write(b"+3255103\r")
240     resp = ''
241     while (resp !=('] 64 \r\n')):
242         motor.write(b"]\r")
243         resp = motor.readline()
244         resp = resp.decode('utf-8')
245         sleep(1)
246     #levar motor até o verde
247     sleep(1)
248     motor.write(b"%d\r"%(666032)) #506098 - Verde
249     sleep(10)
250
251 def andarPasso(passo):
252     motor.write(b"%d\r"%(passo))
253     sleep(0.1)
254
255 def medir(unNM, lambda1, lambda2, precisao, cteTempEspera,
256         tipoMedida, tempoMedida, repeticao):
257     if(lambda2<lambda1):
258         temp = lambda1

```

```

259     lambda1 = lambda2
260     lambda2 = temp
261     del(temp)
262     if (lambda2 >= 787.369267):
263         lambda2 = 780.0
264
265     N = int((lambda2-lambda1)/precisao)
266     print("N: %d\n"%N)
267     nm1 = -(lambda1 - 787.369267)/0.000469 #passos
268     nm2 = -(lambda2 - 787.369267)/0.000469 #passos
269     passoStepScan = int((nm2 - nm1)/N) #passos
270     passoContínuo = (nm2 - nm1) #passos
271     print("Passo: ", passoContínuo)
272     #Rebobina o Motor
273     rebobMotor(nm2)
274     print("\nMotor rebobinado\n")
275     print(tipoMedida)
276     if tipoMedida == "stepScan":
277         print("INICIANDO STEP-SCAN")
278         #Inicia aquisição de dados do lock-in
279         lockIn.write("STRT \n")
280         sleep(1)
281         comp = lambda2
282         for i in range(N+1):
283             medidaR = []
284             medidaTheta = []
285             Npontos = 10
286             sleep(5*cteTempEspera) # Espera n*cteTempoEspera s para iniciar
medida
287             for i in range(Npontos):
288                 lockIn.write("OUTP? 3") # 3 - R (p.11) # ALTERADO \n
289                 medidaR.append(float(lockIn.read("\n")))
290                 lockIn.write("OUTP? 4") # 4 - Theta (p.11)
291                 medidaTheta.append(float(lockIn.read("\n")))
292                 sleep(cteTempEspera)
293             mediaR = np.mean(medidaR)
294             stdR = np.std(medidaR)
295             mediaTheta = np.mean(medidaTheta)
296             stdTheta = np.std(medidaTheta)
297             lamb = comp
298             dados = ("%g, %g, %g, %g, %g\n"%(lamb, mediaR, stdR, mediaTheta
, stdTheta))
299             updateArqDados(dados)
300             andarPasso(passoStepScan)
301             comp -= precisao
302     else:
303         print("INICIANDO MODOCONTINUO")
304         #Inicia aquisição de dados do lock-in
305         lockIn.write("STRT \n")
306         sleep(1)
307         # Calcular Velocidade
308         deltaT = N*0.068 # [s] Empírico
309         V = round(abs(passoContínuo/((tempoMedida*60.) + deltaT)),0)
310         print("Vel. passo/s: ", V)
311

```

```

312     motor.write(b"^C\r")
313     sleep(1)
314     #Define velocidade do motor
315     motor.write(b"v%d\r"%V)
316     sleep(5*cteTempEspera) # Espera n*cteTempoEspera [s] para iniciar
medida
317     dt = (tempoMedida*60./(N-1))
318     for j in range(repeticao + 1):
319         lamb = lambda2
320         andarPasso(passoContínuo)
321         lockIn.write("OUTP? 3") # 3 - R (p.11) # ALTERADO \n
322         R = float(lockIn.read("\n"))
323         lockIn.write("OUTP? 4") # 4 - Theta (p.11)
324         Theta = float(lockIn.read("\n"))
325         dados = ("%g, %g, 0, %g, 0\n"%(lamb, R, Theta))
326         updateArqDados(dados)
327         for i in range(N):
328             lamb -= precisao
329             sleep(dt)
330             lockIn.write("OUTP? 3")
331             R = float(lockIn.read("\n"))
332             lockIn.write("OUTP? 4")
333             Theta = float(lockIn.read("\n"))
334             dados = ("%g, %g, 0, %g, 0\n"%(lamb, R, Theta))
335             updateArqDados(dados)
336         motor.write(b"^C\r")
337         sleep(1)
338         motor.write(b"V60000\r")
339         rebobMotor(nm2)
340         motor.write(b"^C\r")
341         sleep(1)
342         motor.write(b"v%d\r"%V)
343
344     updateArqDados("#fim")
345     #Pausa aquisição de dados
346     lockIn.write("PAUS \n")
347     #Limpa dados do buffer
348     lockIn.write("REST \n")
349     sleep(1)
350     #Reset LockIn
351     lockIn.write("*RST \n")
352     print("Reset LockIn, OK")
353     sleep(5)
354
355 def iniciaGrafico(lambda1, lambda2):
356     #Inicia plotagem dos pontos como thread
357     print("Iniciar MULTIPROCESSING")
358     global t
359     argumentos = {"arquivo": diretorio, "x1": lambda1, "x2": lambda2}
360     t = multiprocessing.Process(target=classPlot.realTimePloter, kwargs=
argumentos)
361     t.start()

```

APÊNDICE B – PAS-AjusteGauss

Código do pacote de tratamento de dados fotoacústicos através do método da segunda derivada, PAS-AjusteGauss:

```

1 #!/usr/bin/python3
2 # -*- encoding: utf-8 -*-
3 import matplotlib.pyplot as plt
4 import numpy as np
5 from scipy.signal import find_peaks
6 from scipy import optimize
7 from scipy.ndimage import gaussian_filter1d
8 import multiprocessing
9
10 class PASGaussAjuste():
11
12     def __init__(self, endSin, endRef, supTit, tit, sigma, ini=None,\
13                 fim=None, rmvBg=False, norm=False, perctPico = 10.,\
14                 calibX=0):
15
16         self.endSin = endSin
17         self.endRef = endRef
18         self.supTit = supTit
19         self.tit = tit
20         self.sigma = sigma
21         self.ini = ini
22         self.fim = fim
23         self.rmvBg = rmvBg
24         self.norm = norm
25         self.perctPico = perctPico/100.
26         self.calibX = calibX
27         self.x, self.sinal, self.errSinal, self.sinalSmooth = self.
lerArquivos()
28
29     def start(self):
30
31         procs = []
32         print("-----")
33         while True:
34             print("0 – 2ª Derivada      1 – Ajustar      2 – Mudar  $\sigma$ ")
35             print("3 – Mudar PerctPico  4 – rmvBg      5 – Calib. X")
36             print("6 – Sair")
37             resp = int(input("— "))
38             print("-----")
39             if(resp == 0):
40                 t = multiprocessing.Process(target=self.deriv2)
41                 procs.append(t)
42                 t.start()
43             elif(resp == 1):
44                 t = multiprocessing.Process(target=self.ajusteGauss)
45                 procs.append(t)

```

```

46         t.start()
47     elif(resp == 2):
48         print("Entre com o novo  $\sigma$ :")
49         self.sigma = float(input("—— "))
50         print("—————")
51     elif(resp == 3):
52         print("Entre com o novo perctPico [%]:")
53         self.perctPico = float(input("—— "))/100.
54         print("—————")
55     elif(resp == 4):
56         self.rmvBg = not self.rmvBg
57         self.x, self.sinal, self.errSinal, self.sinalSmooth = self.
lerArquivos()
58     elif(resp == 5):
59         print("Entre com o shift desejado [nm]:")
60         self.calibX = float(input("—— "))
61         self.x, self.sinal, self.errSinal, self.sinalSmooth = self.
lerArquivos()
62     elif(resp == 6):
63         for proc in procs:
64             proc.terminate()
65         exit()
66     else:
67         print("Opção inexistente!!")
68
69
70     def salvaLog(self):
71         nome = self.endSin.replace( '.txt', '' ) + "_ajusParam.log"
72         temp = open(nome, 'w')
73         temp.write("supTit: %s\n"%self.supTit)
74         temp.write("tit: %s\n"%self.tit)
75         temp.write("endRef: %s\n"%self.endRef)
76         temp.write("endSin: %s\n"%self.endSin)
77         temp.write("calib. X: %g\n"%self.calibX)
78         temp.write("sigma: %g\n"%self.sigma )
79         temp.write("perctPico: %g \n"%(self.perctPico*100) )
80         if self.ini:
81             temp.write("ini: %g\n"%self.ini )
82         if self.fim:
83             temp.write("fim: %g\n"%self.fim )
84         temp.close()
85
86
87     def lerArquivos(self):
88         ref = np.loadtxt( self.endRef, delimiter=",")
89         data = np.loadtxt( self.endSin, delimiter=",")
90
91         xBg = ref[:,0]
92         yBg = ref[:,1] * 1000
93         yBgerr = ref[:,2] * 1000
94
95         x = data[:,0] + self.calibX
96         y = data[:,1] * 1000
97         yerr = data[:,2] * 1000
98

```

```

99     sinal = y/yBg
100    errSinal = y/yBg*( yerr/y + yBgerr/yBg)
101
102    x = x[ self.ini : self.fim ]
103    sinal = sinal[ self.ini : self.fim ]
104
105    if self.rmvBg == True:
106        sinal = sinal - np.amin(sinal)
107    if self.norm == True:
108        sinal = sinal/np.amax(sinal)
109
110    errSinal = errSinal[ self.ini : self.fim ]
111    sinalSmooth = gaussian_filter1d(sinal, self.sgma)
112
113    return x, sinal, errSinal, sinalSmooth
114
115
116    def gaussian(self, x, altura, centro, largura, offset=0):
117        return altura*np.exp(-(x - centro)**2/(2*largura**2)) + offset
118
119
120    def remPos(self, x):
121        for i in range(len(x)):
122            if x[i] >= 0:
123                x[i] = 0
124        return x
125
126
127    def deriv2(self):
128
129        deriv2 = gaussian_filter1d(self.sinal, self.sgma, order=2)
130
131        fig, ax1 = plt.subplots()
132        plt.suptitle(u"Análise numérica", fontweight='bold')
133        plt.title(u"\sigma$ = %g"%self.sgma)
134        a, = ax1.plot(self.x, self.sinal, color="r", label=u"Sinal Fotoacú
135        stico")
136        b, = ax1.plot(self.x, self.sinalSmooth, color="k", label=u"Suavizaç
137        ão Gaussiana")
138        ax1.set_xlabel(u"\lambda$ [nm]")
139        ax1.set_ylabel(u'Absorção [u.a]', color="r")
140        ax1.set_ylim(0, np.amax(self.sinal)*1.4)
141        ax1.tick_params(axis='y', labelcolor="r", color="r")
142
143        ax2 = ax1.twinx()
144        ax2.plot(self.x, deriv2, color="b", label=u'a')
145        diff2 = self.remPos(deriv2)
146        picos = abs(diff2)
147        peaks, _ = find_peaks(picos, height= np.amax(picos)*self.perctPico)
148        plt.plot(self.x[peaks], -picos[peaks], "kx")
149
150        cm = plt.get_cmap('gist_ncar')
151        ax2.set_prop_cycle('color', [cm(1.*i/len(peaks)) for i in range(len
152        (peaks))])

```

```

151     temp = [ [] for i in range(len(peaks))]
152     cnt = 0
153     for i in peaks:
154         temp[cnt], = plt.plot(self.x[i], -picos[i], "x", label=u"%1f nm
155         "%self.x[i])
156         cnt += 1
157
158     lines = [a,b]
159     lines = np.append(lines, temp[:, -1])
160
161     N = 4
162     if len(lines) <= 8:
163         N = 2
164     ax1.legend(lines, [l.get_label() for l in lines], ncol=N, mode="
165     expand", \
166         borderaxespad=0.1, loc="best", fontsize = 9)
167     ax2.axhline(linewidth=1, y=0.0, color='blue', ls='-')
168
169     arquivo = open("lambdas.txt", "w")
170     for i in self.x[peaks]:
171         arquivo.write("%.2f\n"%i)
172     arquivo.close()
173
174     ax2.set_ylim(-np.amax(abs(deriv2))*1.4, np.amax(abs(deriv2))*1.4)
175     ax2.set_xlabel(u"$\lambda$ [nm]")
176     ax2.set_ylabel(u'2ª derivada da Suavização Gaussiana [u.a]', color=
177     "b")
178     ax2.tick_params(axis='y', labelcolor="b", color="b")
179     ax2.spines['right'].set_color('b')
180     ax2.spines['left'].set_color('r')
181     ax2.set_yticks([0])
182     ax2.set_yticklabels("0")
183     figName = self.endSin.replace('.txt', '') + '-Deriv2.png'
184     plt.savefig(figName, dpi=400)
185
186     plt.show()
187
188     def ajusteGauss(self):
189         lambdas = np.loadtxt("lambdas.txt", delimiter="\n")
190         centro = lambdas[:]
191
192         arquivo = open("funcAjus.py", "w")
193         arquivo.write("import numpy as np\n")
194         partel = 'def ajusteGaussiano( x, '
195         parte2 = '\n\treturn('
196         for i in range(len(centro)):
197             partel += "A%d, L%d, "%(i, i)
198             parte2 += "\n\tA%i*np.exp(-(x - %g)**2/(2*L%i**2)) +"%(i, centro
199             [i], i)
200             partel += "offset = 0.0):"
201             parte2 += "\n\toffset )"
202         arquivo.write(partel+parte2)
203         arquivo.close()

```

```

202     from funcAjus import ajusteGaussiano
203
204     self.salvaLog()
205
206     optim3, success = optimize.curve_fit(ajusteGaussiano, self.x, self.
sinalSmooth, bounds=(0,100))
207
208     SS = self.sinal
209     residual = SS - ajusteGaussiano(self.x, *optim3)
210     ss_res = np.sum(residual**2)
211     ss_tot = np.sum((SS - np.mean(SS))**2)
212     r2 = 1. - (ss_res / ss_tot)
213     r2a = 1. - (((len(SS) - 1.)/(len(SS) - 2.)) * (1. -r2))
214
215     numCor = len(centro)
216     cm = plt.get_cmap('gist_ncar')
217     fig = plt.figure(figsize=(8,4.8))
218     ax = fig.add_subplot(111)
219     ax.set_prop_cycle('color', [cm(1.*i/numCor) for i in range(numCor)
])
220
221     plt.suptitle(u"%s"%self.supTit, fontweight='bold', x=.46)
222     plt.title(u"%s"%self.tit)
223
224     for i in range(len(centro)):
225         ax.plot(self.x, self.gaussian(self.x, optim3[2*i], centro[i],
optim3[2*i+1]), label=u"λ_{máx}$_: %d nm"%centro[i])
226         plt.errorbar(self.x, self.sinal, self.errSinal, ecolor="silver",
fmt="r", label=u"Sinal Fotoacústico")
227         plt.errorbar(self.x, ajusteGaussiano(self.x, *optim3), label="
Ajuste", fmt="k")
228
229
230     plt.legend( bbox_to_anchor=(1.01, .5), bbox_transform=ax.transAxes,
231               loc='center left', borderaxespad=0.1, fontsize = 'x-
small')
232     plt.subplots_adjust(right=0.8)
233     plt.xlabel(u"$\lambda$ [nm]")
234     plt.ylabel(u'Absorção [u.a]')
235     ax = plt.gca()
236
237     plt.text(640, np.amax(self.sinal)*0.9, r"$R^2$ = %g"%r2)
238     plt.text(640, np.amax(self.sinal)*0.85, r"$R^2_a$ = %g"%r2a)
239     figName = self.endSin.replace( '.txt', '' ) + '-AjusteGauss.png'
240     plt.savefig(figName, dpi=400)
241
242     plt.show()

```

APÊNDICE C – Calibração do experimento e integração do *software* PAS 1.0.7 com o mesmo

Com a finalidade de melhorar a qualidade do sinal medido foi realizada uma calibração manual do sistema óptico do espectrômetro fotoacústico realinhando-se o espelho localizado na parte anterior à lâmpada de arco de xenônio com objetivo de se aproveitar ao máximo a radiação emitida pela mesma, foi realizado também o reposicionamento das lentes que compõem o caminho óptico de forma a se obter a maior amplitude possível do sinal medido.

Para que o experimento pudesse ser completamente automatizado foi necessário realizar alguns experimentos de calibração para que o *software* fosse sincronizado com as partes variáveis do espectrômetro fotoacústico, a saber, com o motor que controla a posição da grade de difração e com o modulador que realiza a modulação da radiação incidente.

C.1 Alinhamento do espelho

O alinhamento do espelho, que fica localizado na parte anterior à lâmpada de arco de xenônio conforme a [Figura 42](#), consiste de um procedimento simples, porém delicado como descrito a seguir.

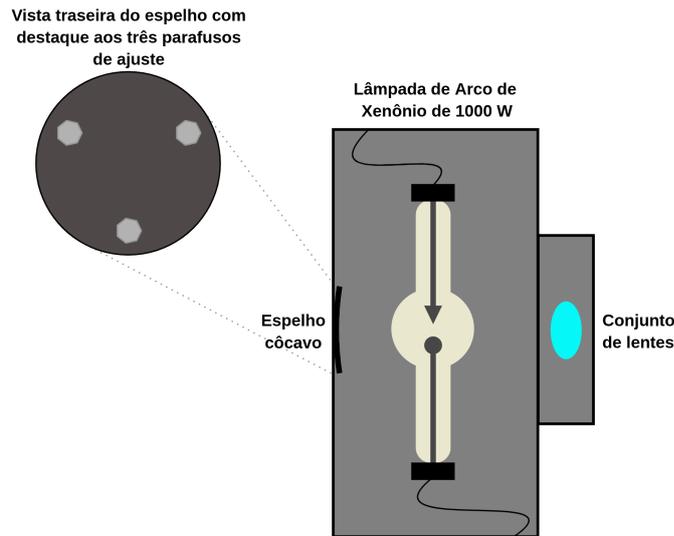


Figura 42 – Diagrama de blocos da fonte de radiação do espectrômetro fotoacústico com destaque ao espelho e seus parafusos de ajuste.

Fonte: Autoria própria

É de suma importância destacar que todo o procedimento deve ser realizado com os devidos cuidados e com o uso dos equipamentos de proteção individual necessários para evitar choques elétricos. A Lâmpada de arco de xenônio emite radiação ultravioleta e portanto deve-se evitar a exposição da pele à mesma. Em hipótese nenhuma deve-se olhar diretamente para a lâmpada de arco de xenônio enquanto a mesma estiver em funcionamento sob o risco de sofrer danos à visão devido à radiação emitida pela mesma.

Para realizar o ajuste do espelho deve-se desacoplar a fonte de radiação do experimento e deixá-la equipada com apenas uma lente para realizar a focalização do arco sobre um anteparo (uma parede por exemplo). Para aproveitar ao máximo a radiação emitida pela lâmpada, os parafusos devem ser ajustados de tal forma que a imagem real do arco projetada pelo espelho côncavo esteja exatamente sobreposta ao arco original. O espelho estará na posição ideal quando a imagem projetada no anteparo estiver composta por dois arcos sobrepostos, inversos e de mesmo tamanho conforme a [Figura 43](#).

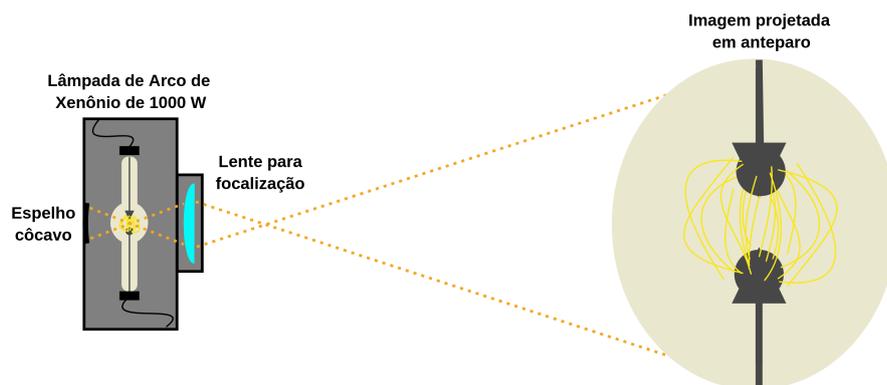


Figura 43 – Diagrama representando a posição ideal do espelho côncavo através da projeção dos arcos em um anteparo.

Fonte: Autoria própria

C.2 Alinhamento das lentes

O espectrômetro fotoacústico utilizado neste trabalho possui um caminho óptico relativamente longo e por isso é necessário o uso de algumas lentes que têm a finalidade de guiar a radiação através do mesmo. Uma vez que o espelho côncavo esteja alinhado, o alinhamento das lentes é feito de forma simples. Cada lente está efetivamente fixada à um tubo metálico que constitui as partes do corpo do caminho óptico, uma vez que cada parte só pode ser posicionada de uma única forma a montagem do caminho óptico é simples. O alinhamento do sistema é feito com a fonte de radiação em funcionamento observando-se a projeção do arco, semelhantemente ao alinhamento do espelho côncavo, sobre a grade de difração conforme o diagrama da [Figura 44](#).

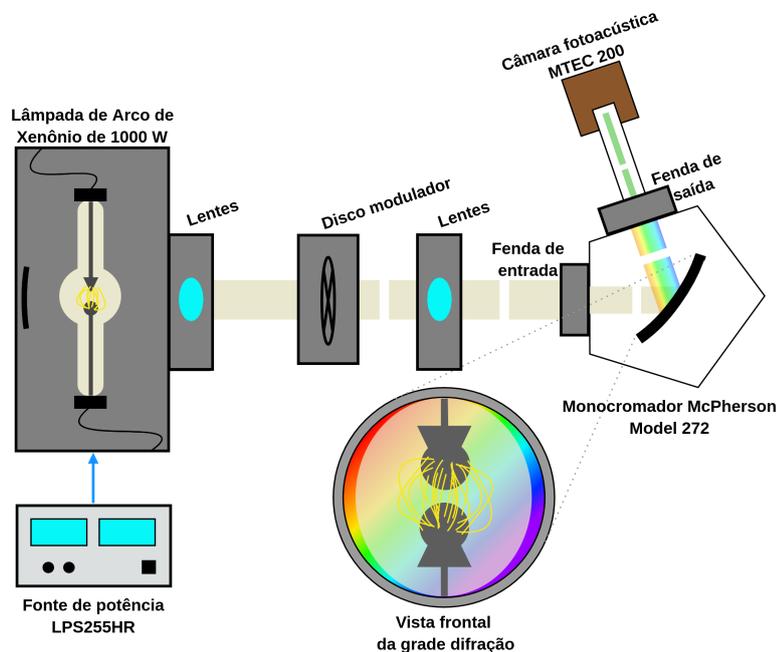


Figura 44 – Diagrama de blocos do aparato experimental com destaque à projeção do arco da lâmpada sobre a grade de difração depois do alinhamento das lentes do caminho óptico.

Fonte: Autoria própria

C.3 Integração do software de controle e aquisição de dados

Para que o *software* de automação pudesse ser integrado ao experimento foi necessário a realização de algumas medidas de calibração a fim de harmonizar o programa com as medidas reais.

C.3.1 Calibração do motor

O motor representa uma parte fundamental do espectrômetro fotoacústico utilizado neste trabalho. Ele é responsável pelo controle da posição da grade de difração, ou seja, modificando a posição da grade de difração é selecionado o comprimento de onda desejado para o experimento. Sempre que qualquer modificação seja feita no caminho óptico do experimento é de suma importância que seja realizada a calibração do motor para evitar erros quando das medidas.

Para proceder com a calibração o aparato experimental foi montado conforme o diagrama de blocos da [Figura 45](#) e o motor foi posicionado em seu limite superior.

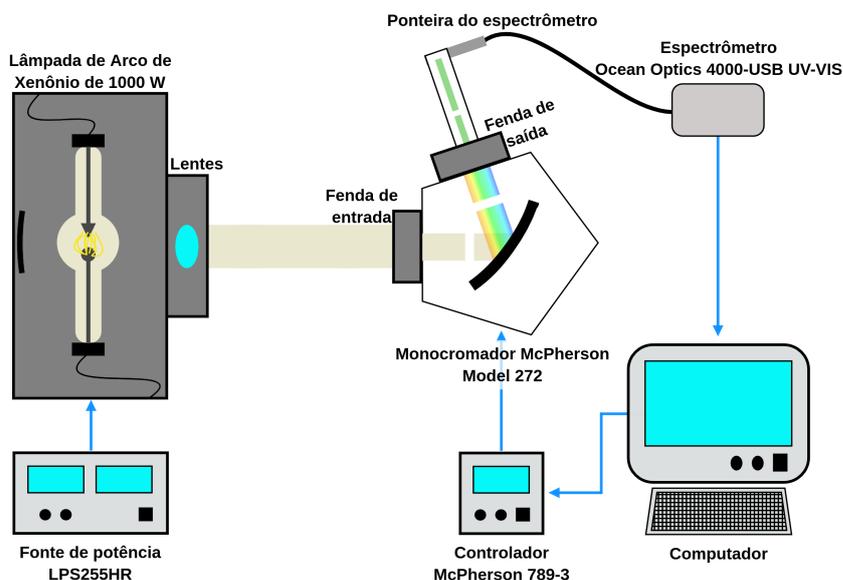


Figura 45 – Diagrama de blocos do aparato experimental utilizado na calibração do motor.

Fonte: Autoria própria

O espectrômetro Ocean Optics USB-4000 UV-VIS foi adequadamente posicionado à saída do espectrômetro fotoacústico com o fim de realizar as medidas necessárias para a calibração. Finalmente foram obtidos os pontos para a calibração, inicialmente foi utilizado o intervalo de 10000 passos entre os pontos e posteriormente utilizou-se o intervalo de 50000 passos. O comprimento de onda associado à cada intervalo foi medido através do

espectrômetro Ocean Optics USB-4000 UV-VIS, com o auxílio do *software* OceanView¹, e seu valor anexado em um arquivo de texto cujos dados e ajuste linear dos mesmos são apresentados na Figura 46.

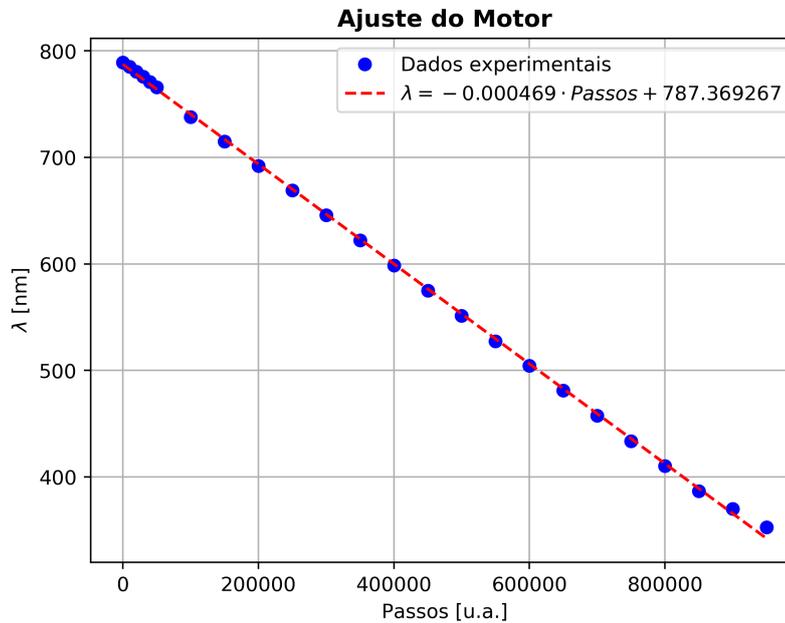


Figura 46 – Comprimento de onda λ medido quando o motor anda N Passos. O ajuste da reta foi utilizado no programa para controlar a posição da grade de difração.

Fonte: Autoria própria

C.3.2 Calibração do modulador óptico

O modulador óptico é um equipamento fundamental para o espectrômetro fotoacústico pois ele é o responsável pela modulação da radiação que incide sobre a amostra. Sem a modulação seria impossível realizar qualquer medida acústica de um sistema físico qualquer.

O modulador óptico usado neste trabalho foi o OC-4000 PTI o qual possui duas faixas de velocidade que podem ser alternadas através de uma chave localizada no mesmo. O OC-4000 PTI trabalha com um sistema de conversão simples no qual a velocidade do modulador é diretamente proporcional à uma dada tensão constante de entrada. Cada uma das faixas do modulador é responsável por um determinado *range* de velocidade que pode ser definida digitalmente através do *software* de automação com o auxílio de uma fonte de tensão programável (neste trabalho utilizamos uma das saídas do amplificador *lock-in* como fonte de tensão para controlar a frequência do modulador).

¹ <<https://www.oceaninsight.com/products/software/acquisition-and-analysis/oceanview/>>

Na [Figura 47](#) é apresentado o diagrama de blocos da montagem experimental para realizar a calibração do modulador. Através da chave seletora escolheu-se a posição *EXT* para indicar que o modulador iria funcionar a partir de uma referência externa (quando na posição *INT* a frequência do modulador deve ser controlada com o auxílio do potenciômetro frontal, *SPEED*). Através da saída auxiliar do amplificador *lock-in* o modulador foi alimentado com uma tensão constante, que foi sistematicamente modificada em um intervalo arbitrário, a frequência de modulação característica foi lida através do display *LCD* do próprio modulador e anexada à um arquivo de texto. Esse procedimento foi realizado para as duas posições da chave seletora com objetivo de caracterizar toda a faixa de trabalho do modulador.

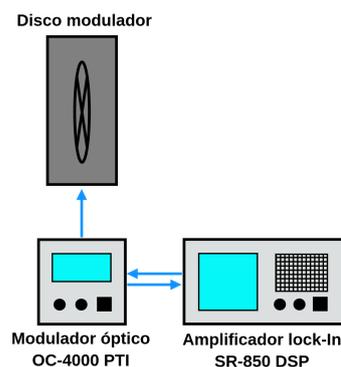


Figura 47 – Diagrama de blocos da montagem experimental utilizada para realizar a calibração das curvas de frequência do modulador óptico OC-4000.

Fonte: Autoria própria

A primeira posição da chave, *DISC 1*, é responsável por fazer o modulador trabalhar em baixas frequências. Seu funcionamento é instável para frequências muito pequenas e estável para frequências maiores que 20Hz. A frequência do modulador para a primeira posição da chave seletora possui uma dependência linear com a tensão de alimentação e os dados do experimento, assim como o ajuste linear são apresentados na [Figura 48](#).

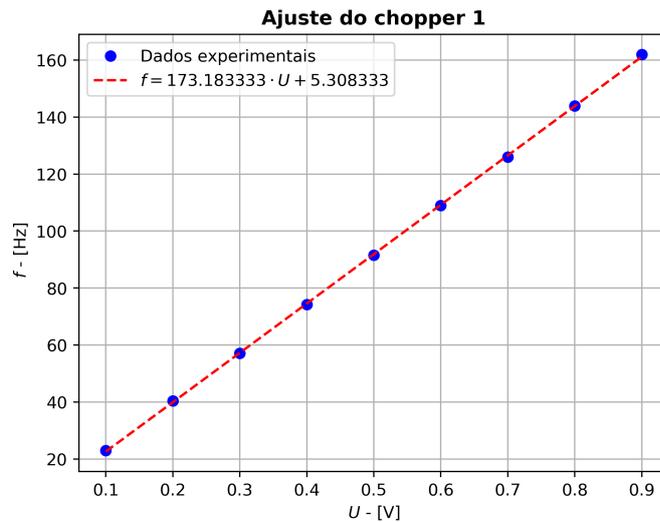


Figura 48 – Frequência do modulador, f , em função da tensão de entrada, U , para a chave seletora na primeira posição e ajuste linear dos dados experimentais.

Fonte: Autoria própria

A segunda posição da chave seletora, *DISC 2*, é responsável por fazer o modulador trabalhar em frequências mais altas. Semelhantemente ao caso anterior seu funcionamento será instável à baixas frequências, tornando-se estável para frequências maiores que 100Hz. A frequência do modulador para a segunda posição da chave seletora também tem uma dependência linear com a tensão de alimentação e os dados do experimento, assim como o ajuste linear são apresentados na [Figura 49](#).

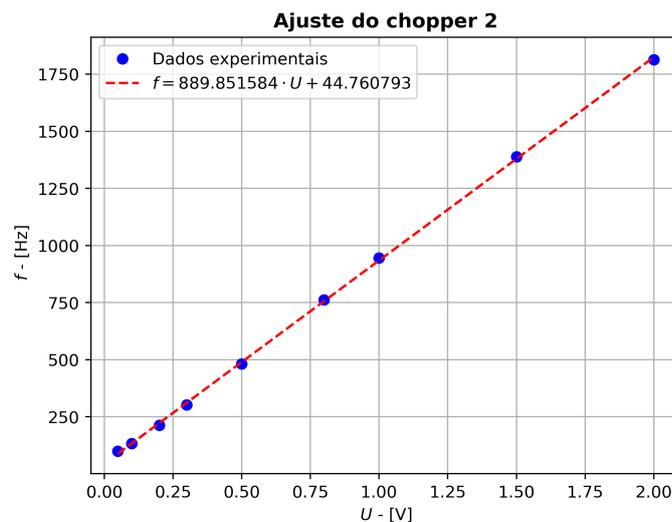


Figura 49 – Frequência do modulador, f , em função da tensão de entrada, U , para a chave seletora na segunda posição e ajuste linear dos dados experimentais.

Fonte: Autoria própria