

**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Leonardo Rafael Correia e Sá

## **Sensor de Fitoplâncton em Meio Aquático**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Eletrónica Industrial e  
Computadores

Trabalho efetuado sob a orientação do

**Professor Doutor Luís Miguel Valente Gonçalves**

E coorientação do

**Doutor Paulo Jorge Teixeira de Sousa**

Julho de 2023

## **DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS**

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença [abaixo](#) indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

### **Licença concedida aos utilizadores deste trabalho**



**Atribuição-NãoComercial-SemDerivações  
CC BY-NC-ND**

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

# Agradecimentos

Este projeto de dissertação não teria sido possível concretizar sem a ajuda de algumas pessoas, às quais pretendo retribuir os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador professor Doutor Luís Gonçalves, coorientador Doutor Paulo Sousa e Doutora Vânia Pinto, por todo o aconselhamento, orientação e condições disponibilizadas.

Ao Tiago Matos por toda a disponibilidade, aconselhamento e ajuda prestada ao longo do projeto.

Ao professor Doutor Emilio Fernández pela ajuda e disponibilidade e ao ECIMAT pelas instalações disponibilizadas para a realização de testes.

Um agradecimento especial aos meus pais e irmã, por todo o apoio, paciência e compreensão dada ao longo de toda a jornada universitária, sem vocês não teria sido possível chegar até aqui.

Este trabalho foi financiado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020), Projeto Atlântida, NORTE-01-0145-FEDER-000040 e por fundos nacionais FCT, projeto Eye-on-shell EXPL/EAM-OCE/1155/2021.

A todos o meu muito obrigado.

## **DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE**

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

# Resumo

O fitoplâncton representa um dos principais constituintes dos ecossistemas aquáticos, estando na base da cadeia alimentar e sendo um dos maiores produtores primários. Esses factos fazem que com inúmeras espécies estejam dependentes dele não só para alimento como também para a produção do seu oxigénio. Porém, o fitoplâncton não apresenta só benefícios podendo em alguns casos e mediante determinadas condições, proliferar de forma descontrolada. O seu rápido crescimento aliado à existência de algumas espécies tóxicas pode repercutir-se em graves problemas para os ecossistemas aquáticos e consequentemente para o ser humano, provocando prejuízos económicos e de saúde que em casos extremos pode resultar em morte. Por estes motivos é fundamental realizar a constante monitorização do fitoplâncton para tentar prevenir e conter este tipo de eventos.

A monitorização do fitoplâncton tem sido realizada, ao longo dos últimos anos, através de várias técnicas e equipamentos. No entanto, estas técnicas requerem muitas vezes a utilização de material caro e volumoso e a necessidade de um operador altamente qualificado nos processos e técnicas a utilizar. Estas necessidades fazem com que seja difícil obter um equipamento de pequenas dimensões que permita realizar as medições no local de forma autónoma.

Desta forma, o trabalho desenvolvido consiste na obtenção de um sensor de baixo custo que realize medições de fitoplâncton autonomamente *in-situ* com boa sensibilidade de medição. Este equipamento recorre à técnica de espectroscopia de fluorescência que realiza a monitorização de fitoplâncton através das propriedades fotossintéticas da clorofila-a, principal pigmento fotossintético que o constitui. Este sensor recorre a um amplificador de deteção síncrona para tratar o sinal de fluorescência medido, de forma que os resultados das medições tenham o menor ruído possível. Ao longo deste trabalho são apresentados os testes, correções e melhorias realizadas no sistema, demonstrando como foi possível atingir um equipamento capaz de medir concentrações que podem ir desde 0,01 µg/L até valores bastante superiores a 1000 µg/L.

**Palavras-chave:** Monitorização de fitoplâncton, sensor de clorofila-a, deteção de fluorescência, amplificador *lock-in*.

# Abstract

Phytoplankton represents one of the main constituents of aquatic ecosystems, being at the base of the food chain and being one of the largest primary producers. These facts mean that countless species are dependent on it not only for food but also for the production of their oxygen. However, phytoplankton does not only offer benefits, and in some cases and under certain conditions, it can proliferate uncontrollably. Its rapid growth, combined with the existence of some toxic species, can result in serious problems for aquatic ecosystems and consequently for humans, causing economic and health damage that in extreme cases can result in death. For these reasons, it is fundamental to carry out constant monitoring of phytoplankton in order to try to prevent and contain this type of event.

Phytoplankton monitoring has been carried out over the last few years using various techniques and equipment. However, these techniques often require the use of expensive and bulky material and the need for a highly qualified operator in the processes and techniques to be used. These needs make it difficult to obtain a small-sized device that allows autonomous measurements to be carried out in situ.

This work consists of obtaining a low-cost sensor that performs phytoplankton measurements autonomously in-situ with good measurement sensitivity. This equipment uses the fluorescence spectroscopy technique that monitors phytoplankton through the photosynthetic properties of chlorophyll-a, the main photosynthetic pigment that constitutes it. This sensor uses a lock-in amplifier to treat the measured fluorescence signal, so that the measurement results have as little noise as possible. Throughout this work, tests, corrections and improvements made to the system are presented, demonstrating how it was possible to achieve equipment capable of measuring concentrations that can range from 0.01  $\mu\text{g/L}$  to values much higher than 1000  $\mu\text{g/L}$ .

**Keywords:** Phytoplankton monitoring, chlorophyll-a sensor, fluorescence detection, amplifier lock-in.

# ÍNDICE

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract .....	vi
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xii
Acrónimos e Siglas .....	xiii
Capítulo 1 Introdução.....	1
1.1 Relevância do Fitoplâncton .....	1
1.2 Monitorização de Fitoplâncton.....	4
1.3 Enquadramento e Motivações .....	5
1.4 Objetivos e Contribuições .....	6
1.5 Organização e Estrutura da Dissertação .....	7
Capítulo 2 Estado da Arte .....	8
2.1 Introdução .....	8
2.2 Métodos de análise de fitoplâncton .....	8
2.2.1 Técnicas baseadas em microscopia .....	8
2.2.2 Técnicas moleculares .....	10
2.2.3 Técnicas fluorométricas .....	11
2.2.4 Citometria de fluxo .....	15
2.3 Conclusão.....	16
Capítulo 3 Análise e Compreensão do Sistema.....	18
3.1 Introdução .....	18
3.2 Princípios de funcionamento .....	18
3.2.1 Amplificador <i>Lock-In</i> .....	20
3.2.1.1 Amplificador de Transimpedância.....	21
3.2.1.2 Filtro Passa-Banda.....	22
3.2.1.3 Amplificador .....	23
3.2.1.4 Multiplicador .....	23
3.2.1.5 Filtro Passa-Baixo .....	24
3.3 Protótipo inicial.....	25
3.3.1 Câmara de medição.....	25
3.3.1.1 Fonte emissora de luz .....	26
3.3.1.2 Fotodetector.....	27
3.3.1.3 Filtro ótico .....	28
3.3.2 Circuito de leitura e Microcontrolador.....	28
3.4 Conclusão.....	29
Capítulo 4 Caracterização do protótipo existente.....	30
4.1 Introdução .....	30
4.2 Testes e correções iniciais .....	30
4.2.1 Comparação do sistema atual com a versão anterior.....	30
4.2.2 Aumento da intensidade dos LEDs .....	32
4.2.3 Utilização dos ADCs.....	34
4.3 Construção da estrutura para realizar testes de campo .....	37
4.3.1 Datalogger.....	38
4.4 Testes de campo nos laboratórios ECIMAT .....	39
4.4.1 Teste de calibração.....	39

4.4.1.1	Etapas do teste de calibração .....	40
4.4.1.2	Resultados .....	42
4.4.2	Teste de mar.....	45
4.4.3	Testes de temperatura .....	47
4.4.3.1	Varição de temperatura na caixa do sensor/fotodetector/LEDs .....	48
4.4.3.2	Varição da temperatura na placa de eletrónica.....	48
4.4.3.3	Varição da temperatura da água com o sensor submerso.....	49
4.4.4	Teste luz ambiente .....	51
4.4.5	Teste de medição da referência durante a noite.....	52
4.4.6	Problemas encontrados e melhorias a implementar .....	54
Capítulo 5	Otimizações e validações .....	55
5.1	Dependência com a temperatura .....	55
5.1.1	Implementação de medição da temperatura exterior.....	55
5.1.2	Análise e correção.....	56
5.1.3	Teste e validação.....	58
5.2	Dependência com a carga da bateria .....	60
5.2.1	Medição da tensão da bateria .....	60
5.2.2	Análise e correção.....	61
5.2.3	Teste e validação.....	64
5.3	Dependência com a turbidez da água .....	65
5.3.1	Calibração do sensor de turbidez .....	65
5.3.2	Análise .....	66
5.4	Dependência da luz ambiente.....	67
5.5	Consumo de corrente e autonomia .....	71
5.6	Teste de sensibilidade/calibração .....	73
5.7	PCB final.....	74
Capítulo 6	Conclusão.....	75
6.1	Conclusões .....	75
6.2	Sugestões para trabalho futuro .....	77
Referências Bibliográficas	.....	78
Apêndice I	– Esquemático do sensor.....	81
Apêndice II	– Lista de material .....	82
Apêndice III	– Software mais relevante .....	84

## Lista de Figuras

Figura 1.1 – Cadeia alimentar marinha (adaptada de [6]).	1
Figura 1.2 - Bloom observado via satélite [9].	2
Figura 1.3 – a - Maré vermelha na costa portuguesa [13]. b - Morte de peixes causada após um bloom [14].	3
Figura 2.1 – a – Microscópio binocular invertido, usado em laboratório para análise das amostras de fitoplâncton [35]. b - Visualização em microscópio de fitoplâncton [34].	9
Figura 2.2 - Kit de material para aplicar o método de Utermöhl [38].	9
Figura 2.3 - Espectro de absorção e emissão da clorofila-a [16].	11
Figura 2.4 - Esquemático da configuração necessária para medição através da espectroscopia de fluorescência, adaptado de [43].	12
Figura 2.5 - Configuração do instrumento de medição ALFA [45].	12
Figura 2.6 - Exemplo de um fluorímetro digital [49].	13
Figura 2.7 -Esquema geral do sistema SIMPATICO. Os pontos b e d representam a localização das baterias e do armazenamento de dados, adaptada de [51].	14
Figura 2.8 - Mapa da concentração de clorofila do mês de maio de 2023, obtida via satélite com o sistema MODIS [54].	14
Figura 2.9 - Esquemático de um citômetro de fluxo [55].	15
Figura 2.10 - Equipamento FlowCAM que permite a medição de fitoplâncton [59].	16
Figura 3.1 – Representação esquemática dos blocos que constituem o sistema de monitorização de clorofila.	19
Figura 3.2 - Diagrama de blocos do lock-in.	20
Figura 3.3 - Esquemático da configuração do amplificador de transimpedância.	21
Figura 3.4 - Esquemático do filtro passa-banda.	22
Figura 3.5 - Diagrama de bode da resposta do filtro passa-banda dimensionado.	22
Figura 3.6 - Esquemático do amplificador.	23
Figura 3.7 - Esquemático do bloco multiplicador.	24
Figura 3.8 - Esquemático do filtro passa-baixo.	24
Figura 3.9 - Diagrama de bode da resposta do filtro passa-banda dimensionado.	24
Figura 3.10 – Peças e montagem da câmara de medição do sensor.	25
Figura 3.11 - Esquemático da câmara de medição do sensor.	26
Figura 3.12 – Fonte emissora de luz, LED LUXEON Rebel Royal Blue e o seu respetivo diagrama de espectro.	26
Figura 3.13 - Circuito de atuação dos LEDs.	27
Figura 3.14 – a-Fotodetector Hamamatsu para medir a fluorescência da clorofila a). b-Fotodetector OSRAM para medir a turbidez b).	27
Figura 3.15 – Filtro ótico da Thorlabs utilizado e respetivo diagrama de transmissão.	28
Figura 3.16 – Parte de cima da placa eletrónica.	29

## Lista de Figuras

Figura 3.17 – Parte de baixo da placa eletrônica. ....	29
Figura 4.1 – Placas de eletrônica do sistema com STM do lado esquerdo e com Arduino do lado direito. ....	31
Figura 4.2 - Evolução da tensão no ADC durante as medições feitas com o circuito do arduino. ....	31
Figura 4.3 – Evolução da tensão durante as medições feitas com o circuito da STM. ....	32
Figura 4.4 – Esquemático do circuito de alimentação dos LEDs. ....	33
Figura 4.5 - Evolução da tensão no ADC durante as medições de diferentes concentrações de clorofila, após aumento da intensidade dos LEDs. ....	33
Figura 4.6 - Sincronização do momento de leitura dos ADCs. ....	34
Figura 4.7 - Medições realizadas com o multímetro digital para comparar com as medições do ADC, concentrações mais baixas. ....	35
Figura 4.8 - Medições realizadas com o multímetro digital para comparar com as medições do ADC, concentrações mais elevadas. ....	35
Figura 4.9 – Protótipo construído para a realização de testes. ....	37
Figura 4.10 - Trama de dados enviada pelo microcontrolador para o datalogger. ....	38
Figura 4.11 – Módulo do datalogger construído. ....	39
Figura 4.12 - Bancada de realização dos testes de calibração. ....	40
Figura 4.13 - Material utilizado na primeira fase do teste de calibração. ....	41
Figura 4.14 – Etapas da segunda fase do teste de calibração. ....	42
Figura 4.15 - Evolução dos vários ganhos do sensor em função da clorofila medida pelo fluorímetro. ....	42
Figura 4.16 - Reta de calibração obtida do ganho 10, primeiro teste. ....	43
Figura 4.17 - Reta de calibração obtida do ganho 100, primeiro teste. ....	43
Figura 4.18 - Reta de calibração obtida do ganho 10, segundo teste. ....	44
Figura 4.19 - Reta de calibração obtida do ganho 100, segundo teste. ....	44
Figura 4.20 - Evolução da referência ao longo do segundo teste de calibração. ....	45
Figura 4.21 - Condições de realização do teste de mar. ....	46
Figura 4.22 – Valores de clorofila, em tensão, medidos pelo sensor no mar, utilizando um ganho de 100. ....	46
Figura 4.23 - Valores de clorofila, em $\mu\text{g/L}$ , medidos pelo sensor no mar, utilizando um ganho de 100. ....	47
Figura 4.24 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da temperatura da caixa que envolve o sensor. ....	48
Figura 4.25 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da temperatura da placa de eletrônica. ....	49
Figura 4.26 - Condições de realização do teste de variação de temperatura. ....	50
Figura 4.27 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da temperatura da placa de eletrônica. ....	50
Figura 4.28 - Evolução da medição do sensor com ganho 100, da temperatura e da luminosidade ao longo do teste realizado. ....	51
Figura 4.29 – Evolução da luz ambiente e da tensão medida pelo sensor ao longo do tempo. ....	52
Figura 4.30 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da luz ambiente. ....	52
Figura 4.31 - Condições do teste de medição contínua da referência. ....	53
Figura 4.32 - Tensão medida pelo sensor ao longo da noite. ....	53
Figura 5.1 – Sensor DS18B20 usado, a). Estrutura do sensor com o sensor de temperatura acoplado na câmara de medição, b). ....	55

## Lista de Figuras

Figura 5.2 - Esquemático de montagem do sensor de temperatura.....	56
Figura 5.3 – Gráfico da variação do ganho típico do transistor em função da temperatura, retirado do datasheet.....	57
Figura 5.4 - Onda inicialmente gerada pelo DAC.....	58
Figura 5.5 - Onda atualmente gerada pelo DAC.....	58
Figura 5.6 - Variação da temperatura ao longo do teste. ....	59
Figura 5.7 – Medição da tensão que representa a quantidade de clorofila, em função da variação da temperatura. ....	59
Figura 5.8 - Resultados do teste sem compensação da alimentação. ....	60
Figura 5.9 - Esquemático do circuito divisor de tensão que permite medir a carga da bateria. ....	61
Figura 5.10 - Corrente de alimentação dos LEDs em função da carga da bateria. ....	61
Figura 5.11 - Evolução da tensão no coletor do transistor ao longo de um pulso. ....	62
Figura 5.12 - Esquemático da fonte de alimentação e do circuito de atuação dos LEDs. ....	62
Figura 5.13 - Exemplo de um dos casos analisados neste teste. ....	63
Figura 5.14 - Resultados do teste de variação do valor do condensador dos LEDs. ....	63
Figura 5.15 - Resultados do teste com compensação da alimentação. ....	64
Figura 5.16 - Curva de calibração do sensor de turbidez. ....	65
Figura 5.17 - Declives que permitem determinar a turbidez em NTU.....	66
Figura 5.18 – Resultados de teste de medição da clorofila em função da variação do valor de turbidez.....	66
Figura 5.19 - Resultados de variação da luz ambiente para a solução 1. ....	68
Figura 5.20 - Resultados de variação da luz ambiente para a solução 2. ....	68
Figura 5.21 - Resultados de variação da luz ambiente para a solução 3. ....	69
Figura 5.22 - Luz ambiente, em tensão, medida pelo sensor no mar.....	70
Figura 5.23 – Clorofila medida pelo sensor.....	70
Figura 5.24 – Consumos de corrente ao longo de quatro ciclos de medição. ....	71
Figura 5.25 - Resultados do teste de sensibilidade. ....	73
Figura 5.26 – Nova PCB montada com as correções e melhorias implementadas.....	74

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação dos valores medidos pelo multímetro digital e pelo microcontrolador para diferentes concentrações.....	36
Tabela 2 – Diferenças percentuais entre os valores medidos pelo multímetro digital e pelo microcontrolador para as diferentes concentrações. ....	36
Tabela 3 - Consumos para um ciclo de amostragem de 54 s. ....	72
Tabela 4 – Consumos para um ciclo de amostragem de 3600 s. ....	72

## Acrónimos e Siglas

<b>Acrónimo/Sigla</b>	<b>Significado</b>
ADCP	Acoustic Doppler Current Profiler
ADC	<i>Analog-to-Digital Converters</i> Conversor analógico para digital
ALFA	Aquatic Laser Fluorescence Analyzer
CPR	<i>Continuous Plankton Recorder</i> Registrador Contínuo de Fitoplâncton
DAC	<i>Digital to Analog Converter</i> Conversor digital para analógico
DC	Corrente contínua
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxirribonucleico
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> Agência de Proteção Ambiental
GACS	<i>Global Alliance of CPR Surveys</i> Aliança Global de Pesquisas de CPR
HAB	<i>Harmful Algae Blooms</i> Proliferação de algas nocivas
ICM	Índice de clorofila máxima
IPMA	Instituto Português do Mar e da Atmosfera
LED	<i>Light-emitting diode</i> Diodo emissor de luz
NTU	<i>Nephelometric Turbidity Unit</i> Unidade Nefelométrica de Turbidez

PCB	<i>Printed Circuit Board</i> <i>Placa de circuito impresso</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Reação em cadeia de polimerase
PMN	<i>Phytoplankton Monitoring Network</i> Rede de Monitoramento de Fitoplâncton
rDNA	<i>Recombinant Deoxyribonucleic acid</i> Ácido desoxirribonucleico recombinado
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Ácido Ribonucleico
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> Ácido ribonucleico ribossômico
RTC	<i>Real Time Clock</i> Relógio de tempo real

# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Relevância do Fitoplâncton

O fitoplâncton compreende organismos microscópicos com capacidade fotossintética que vivem suspensos em ambientes aquáticos. Estes organismos podem ser desde bactérias, organismos protistas e, na sua maioria, plantas unicelulares. Como recorre à fotossíntese para produzir a sua energia o fitoplâncton é dependente da luz, habitando por isso essencialmente na zona eufótica[1][2]. Embora o fitoplâncton represente menos de 1% da biomassa fotossintética do planeta Terra é responsável por quase 50% da produção primária global, representando a principal fonte de energia dos ecossistemas aquáticos e assumido um papel importante na regulação do clima global [3].

O fitoplâncton está na base de toda a cadeia alimentar aquática, representando os principais produtores de alimento[4]. Num ecossistema em equilíbrio, o fitoplâncton fornece alimento a uma grande variedade de organismos aquáticos, indo desde o zooplâncton microscópico até baleias de várias toneladas (Figura 1.1) [5].

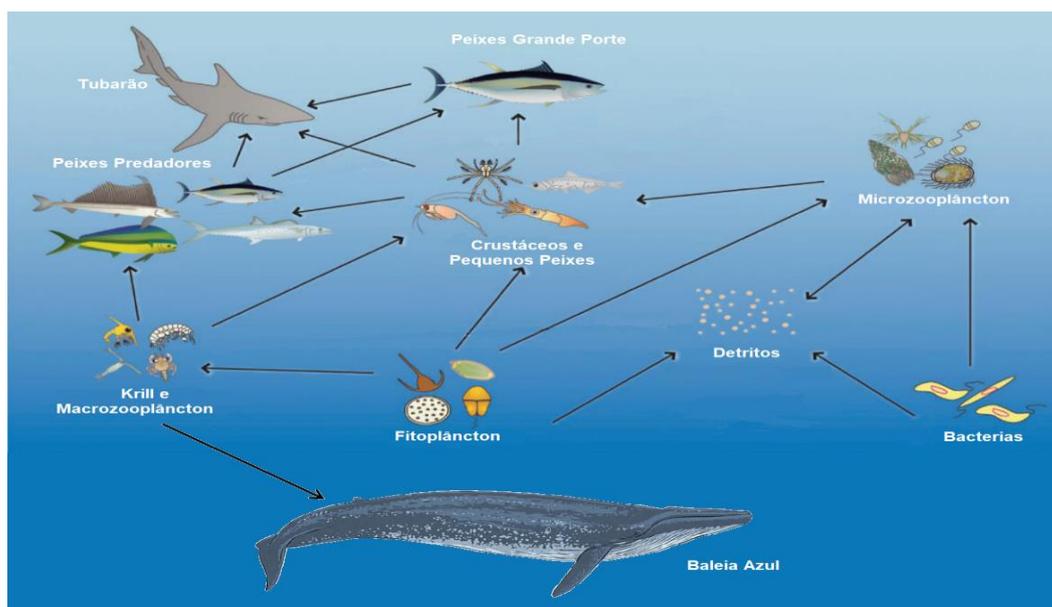


Figura 1.1 – Cadeia alimentar marinha (adaptada de [6]).

O fitoplâncton apresenta ciclos de vida curtos, tendo elevada sensibilidade a pequenas alterações ambientais nas condições que rodeiam a sua comunidade. Algumas dessas condições são a luz solar, temperatura, salinidade da água, nutrientes e matéria orgânica disponíveis, pH, profundidade da água, vento e o tipo de predadores que habitam o ecossistema onde se está a desenvolver [1]. Quando todas as condições de crescimento são favoráveis e os organismos ambientais que controlam o fitoplâncton deixam de operar, ainda que num curto período de tempo, este pode responder crescendo de forma explosiva[7]. Esse fenómeno é conhecido como *bloom* de algas e pode durar várias semanas, chegando a cobrir uma área de centenas de quilómetros quadrados que é facilmente visível em imagens via satélite (Figura 1.2) [8].

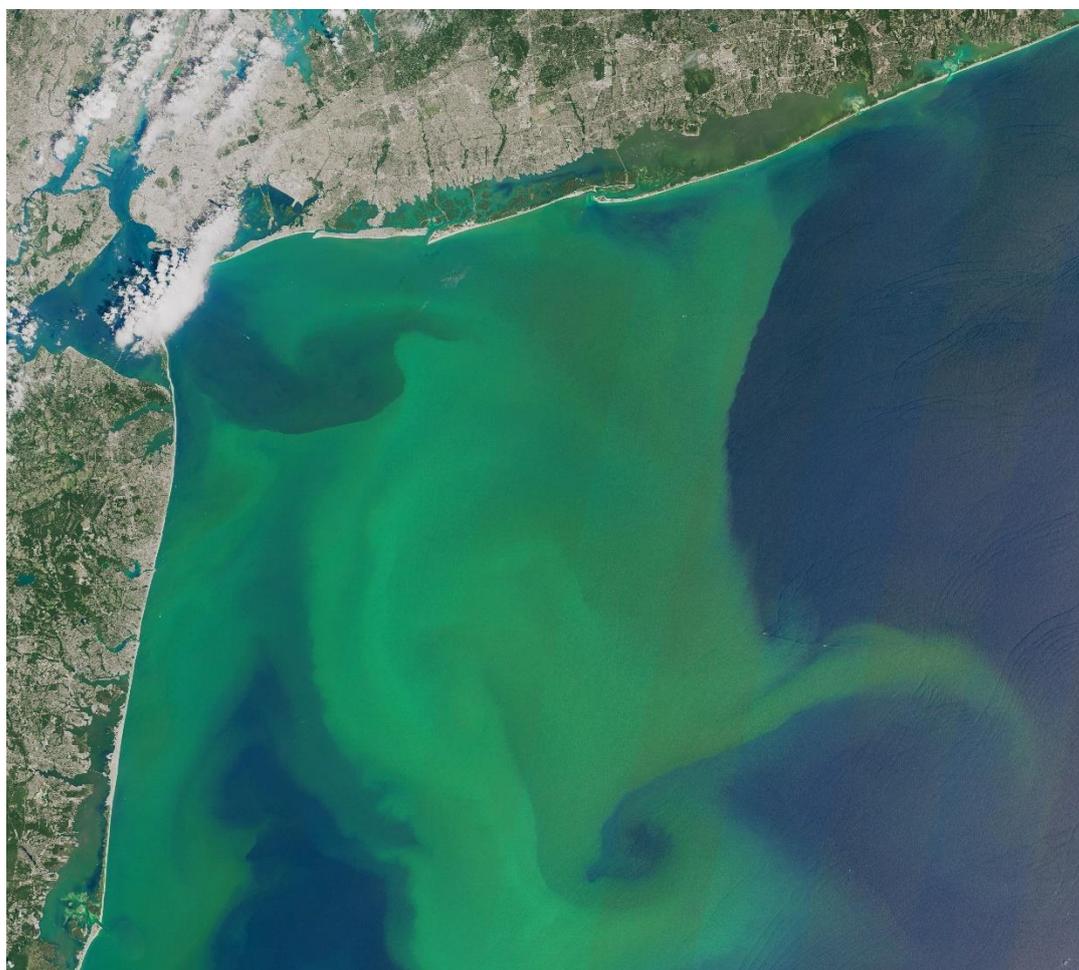


Figura 1.2 - *Bloom* observado via satélite [9].

O facto do fitoplâncton ser tão relevante na base dos ecossistemas aquáticos faz com que os malefícios que oferece, se revelem muitas vezes em morte ou doença. Algumas espécies de fitoplâncton produzem biotoxinas poderosas, tornando-as responsáveis pelo desenvolvimento e proliferação de algas nocivas (HABs do inglês Harmful Algae Blooms) e de “marés vermelhas”. Uma “maré vermelha” pode matar não só a vida marinha como afetar as pessoas que comam frutos do mar contaminados,

provocando dessa forma perda de recursos alimentares marinhos bem como significativos impactos económicos [10][11].

Todavia, não são apenas as espécies tóxicas o fitoplâncton que podem causar mortalidade. Depois de um grande *bloom*, o fitoplâncton morto afunda no oceano ou no chão do lago e as bactérias responsáveis pela sua decomposição acabam por consumir grande parte do oxigénio presente na água. Dessa forma são criadas zonas de água anóxica, sufocando, nessa área, grande parte da vida animal e resultando numa zona de morte (Figura 1.3) [12].



Figura 1.3 – a - Maré vermelha na costa portuguesa [13]. b - Morte de peixes causada após um *bloom* [14].

O fitoplâncton desempenha, tal como as plantas, um papel vital sobre o clima e o ciclo do carbono, devido ao facto de também realizar o processo de fotossíntese para produzir a sua própria energia [15]. Nesse processo consome dióxido de carbono, luz solar e água gerando, para além da sua energia, oxigénio. Estima-se que durante a execução da fotossíntese do fitoplâncton seja consumindo carbono numa escala equivalente às florestas ou outras plantas terrestres. Parte desse carbono é arrastado para o oceano profundo quando o fitoplâncton morre, sendo outra grande parte transferida para outras camadas do oceano à medida que o fitoplâncton é ingerido por outros organismos. Desta forma o fitoplâncton funciona como uma “bomba biológica de carbono”, transferindo por ano cerca de 10 gigatoneladas de carbono da atmosfera para o oceano[16]. Com este grau de influência no ciclo do carbono, a ocorrência de pequenas alterações no crescimento do fitoplâncton pode afetar as concentrações de dióxido de carbono presentes na atmosfera, provocando, consequentemente, alterações na temperatura e clima.

Analisando tudo o que foi mencionado anteriormente e fazendo um balanço dos aspetos que representam a importância do fitoplâncton no panorama do mundo atual, constata-se que o fitoplâncton, além de ser a base das cadeias alimentares marinhas e do seu papel na redução do dióxido de carbono, é um indutor e direto indicador biológico de alterações da concentração de nutrientes na coluna de água

e de pressões associadas ao processo de eutrofização. Devido à sua obtenção dos nutrientes necessários para o seu desenvolvimento diretamente da coluna de água [1][17]. Podendo as variações nas suas condições de vida refletir-se noutros níveis tróficos e atividades económicas (como a pesca). É, também, a fonte de mais de 50% do oxigénio presente na atmosfera, tornando-o num dos principais responsáveis pela regulação climática[18].

## 1.2 Monitorização de Fitoplâncton

As alterações climáticas estão a tornar os oceanos cada vez mais quentes e ácidos. Com estas condições o aparecimento de *blooms* torna-se mais frequente, tendo impactos nocivos na vida marinha. A monitorização do fitoplâncton permite a deteção precoce destes acontecimentos e agir antecipadamente de forma a tentar proteger a fauna e flora marinha[19]. Esse papel ecológico proeminente, fez com que o fitoplâncton se tornasse um alvo indispensável em programas de monitorização global tendo vindo também a ser incluído nas avaliações de rotina das agências ambientais. Contudo, a monitorização do fitoplâncton é particularmente exigente em termos de equipamentos disponíveis, tempo e custos associados, devido aos procedimentos de análise[20]. A monitorização de grandes massas de fitoplâncton é normalmente realizada através das mesmas técnicas que são utilizadas para a monitorização da concentração de clorofila-a, uma vez que este pigmento fotossintético é dos principais componentes do fitoplâncton. Essa monitorização é feita recorrendo muitas vezes a satélites, que podem fornecer informações detalhadas sobre a distribuição das concentrações de clorofila-a em grandes áreas com um baixo custo [21]. Um dos indicadores utilizados na monitorização de fitoplâncton é o índice de clorofila máxima (ICM), inicialmente desenvolvido para o instrumento MERIs foi transferido com sucesso para outros sensores [22]. Este índice permite perceber e enquadrar o valor da concentração de clorofila medido, percebendo se esse valor é baixo, normal ou alto. Sendo que o índice é alto na presença de mares vermelhas [23].

A monitorização de fitoplâncton no mundo tem sido feita há décadas pelos gravadores contínuos de plâncton (CPR do inglês Continuous Plankton Recorder). Em 2011 foi formada a Aliança Global de Pesquisas de CPR (GACS). Inicialmente, os esforços desta aliança centraram-se no fortalecimento e partilha de um conjunto de dados, identificando e documentando as melhores praticas de CPR, realizando workshops de treino e desenvolvendo um banco de dados integrado. Este processo resultou em novas pesquisas e manuais que permitiram padronizar as pesquisas regionais. Contudo, esta aliança ainda não é global estando em constante procura por novos parceiros de modo a aumentar as regiões com monitoração regular [24], [25].

Dada a importância e impactos do fitoplâncton existem vários países que tem os seus próprios planos de monitoração. No caso dos Estados Unidos da América existe o programa chamando Rede de Monitoramento de Fitoplâncton (PMN do inglês Phytoplankton Monitoring Network) que recolhe dados ecológicos com um baixo custo em 36 estados e territórios, desde 2001 até ao presente. O PMN é uma rede de voluntários de base comunitária que treina grupos voluntários através de workshops e webinars sobre como recolher, identificar através de microscopia digital e relatar os dados recolhidos [26], [27]. Outra forma de monitoração feita nos Estados Unidos é através dos satélites da NASA que permitem fazer uma monitorização mais contínua[28].

Na Irlanda, o fitoplâncton nos estuários e águas costeiras é monitorizado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, Environmental Protection Agency) e pelo Instituto Marinho. Essa monitorização é feita de acordo com requisitos da Diretiva-Quadro Europeia da Água [29].

Em Portugal, o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) faz e disponibiliza, num relatório mensal, análises de fitoplâncton nocivo que possa estar presente na água [30].

A população portuguesa tem na água doce de origem superficial um recurso fundamental para o seu abastecimento. Contudo, a contaminação ambiental desta água pode introduzir níveis elevados de matéria orgânica, o que favorece o crescimento de microalgas, em particular de cianobactérias. Estas últimas podem produzir toxinas, resultando em efeitos nefastos para a saúde pública. A monitorização destas ocorrências nos recursos hídricos superficiais assegura o controlo da qualidade da água, prevenindo riscos para a saúde e reduzindo os custos associados ao seu tratamento [31].

Nesse sentido o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, através do seu Departamento de Saúde Ambiental tem promovido ao longo dos anos um curso de “Técnicas de amostragem de água para análise de fitoplâncton”. Esta iniciativa visa dotar os participantes de conhecimentos básicos sobre as comunidades de fitoplâncton residentes nas albufeiras portuguesas e sobre as diversas técnicas de colheita de amostras de água doce para a sua análise [32].

Em suma, tendo em conta os possíveis efeitos negativos que o fitoplâncton pode acarretar tanto para a ecologia aquática como para economia, são vários os programas e países que fazem a sua monitorização de forma a assegurar segurança nos vários níveis.

### **1.3 Enquadramento e Motivações**

A conservação e estudo da biodiversidade dos ambientes aquáticos tem vindo a assumir um papel cada vez mais importante ao longo dos anos devido às alterações climáticas. Dentro dos ecossistemas aquáticos, um dos habitantes que permite inferir qual o seu estado de saúde é o fitoplâncton. Isso deve-se

ao facto de o fitoplâncton estar na base da cadeia alimentar e poder ser o causador de morte ou doenças, dado que certas espécies produzem biotoxinas poderosas [33]. Esta ocorrência tem levado a avanços tecnológicos os quais permitiram a descoberta de diversas técnicas para identificar a presença de fitoplâncton. Dessa forma as análises deixaram de ser exclusivamente feitas em laboratório e passaram a poder ser realizadas *in-situ*, com recurso especialmente a fluorímetros.

Dos vários métodos que existem atualmente para medir e monitorizar fitoplâncton um dos principais entraves que é comum a todos, é a necessidade de que alguém se desloque ao local para fazer a medição ou recolha de uma amostra que será analisada posteriormente em laboratório. O único método que não tem essa necessidade é por satélite, contudo este é um método que apresenta muito baixa sensibilidade. Além disso, os equipamentos atualmente disponíveis são normalmente caros ou de dimensões volumosas, dificultando a sua utilização em campo de forma rotineira. Dessa forma é difícil ter um sistema, com custo acessível, que realize a medição subaquática de fitoplâncton na zona eufótica, de forma autónoma e com um grau de detetabilidade relativamente bom.

Assim, este trabalho de dissertação surge como um contributo para o desenvolvimento tecnológicos na área de medição e monitorização de fitoplâncton. Pretende-se desta forma, o desenvolvimento de uma solução de baixo custo, autónoma e com capacidade de medição *in-situ* para resolução dos problemas apresentados.

## 1.4 Objetivos e Contribuições

Tendo em conta as limitações dos dispositivos atualmente disponíveis, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento, teste e validação de um sensor para monitorização de fitoplâncton com capacidade de realizar medições submersas de forma autónoma, com boa sensibilidade na gama de 0,01 a 1000  $\mu\text{g/L}$  e com um baixo custo de mercado (<150€). Esta proposta teve como ponto de partida um protótipo laboratorial desenvolvido previamente pelo grupo de investigação, sobre o qual se realizou testes, melhorias validações, conferindo-lhe também a capacidade para medições subaquáticas. Assim sendo, para que seja atingido esse objetivo final devem ser cumpridas e atingidas o seguinte conjunto de etapas:

- Estudo bibliográfico, com foco na investigação do estado da arte;
- Estudo e realização de testes com o protótipo laboratorial, identificação dos problemas e pontos a melhorar;
- Implementação das correções e melhorias;
- Teste em laboratório após realização das melhorias;

- Montagem do sensor com capacidade de medição em ambientes subaquáticos;
- Calibração e teste do sensor no mar;

## **1.5 Organização e Estrutura da Dissertação**

Neste documento de dissertação, composto por cinco capítulos, são descritos os princípios de funcionamento, etapas de montagem e testes do sistema proposto.

No capítulo 1 é feita uma descrição da importância do fitoplâncton nos ambientes aquáticos e apresentadas algumas das organizações responsáveis pela sua monitorização. O capítulo termina com a exposição dos objetivos para a realização deste projeto de dissertação, assim como, as motivações e contribuições.

No capítulo 2, é realizado um levantamento do estado da arte dos principais metodologias e equipamentos de monitorização existentes. Neste capítulo são descritos os métodos de funcionamento de cada técnicas, as suas principais vantagens e limitações, sendo apresentados alguns dos equipamentos que recorrem as técnicas apresentadas.

O capítulo 3 foca-se na parte mais teórico-prática do projeto onde são apresentados com maior detalhe os princípios de funcionamento e os materiais escolhidos para a montagem do sistema.

No que toca ao capítulo 4, este é dedicado aos testes experimentais realizados para perceber o estado em que o protótipo existente se encontrava. Para isso foram realizados um conjunto de testes, dos quais resultou um conjunto de melhorias e correções a serem feitas.

O capítulo 5 aborda, essencialmente, a análise, correção e validação dos problemas encontrados ao longo dos testes descritos no capítulo 4.

Por fim, no capítulo 6 encontram-se as conclusões finais retiradas ao longo da realização deste projeto de dissertação, sendo apresentadas também algumas propostas de trabalho futuro para melhorar e otimizar ainda mais o trabalho realizado.

# Capítulo 2

## Estado da Arte

### 2.1 Introdução

O fitoplâncton está presente em todos os ecossistemas aquáticos. Ao longo dos tempos com os avanços dos conhecimentos sobre os habitats aquáticos, a importância do fitoplâncton foi sendo cada vez mais evidenciada. Dessa forma e acompanhando os progressos da tecnologia, a monitorização e quantificação de fitoplâncton foi evoluindo em técnicas e equipamentos.

Nos dias de hoje é possível identificar a presença de fitoplâncton tanto em laboratório como no próprio local onde se recolhe a amostra. Ao longo deste capítulo são apresentadas as principais metodologias e equipamentos que podem ser utilizados para identificar fitoplâncton, evidenciando as suas principais vantagens e limitações.

### 2.2 Métodos de análise de fitoplâncton

Devido a importância do fitoplâncton a sua monitorização é essencial para a proteção da vida e saúde dos ecossistemas aquáticos, garantindo a segurança alimentar e protegendo também a saúde humana. A realização dessa monitorização recorre muitas vezes a metodologias como técnicas baseadas em microscopia, técnicas moleculares, técnicas de fluorométricas e citometria de fluxo, que são depois aplicadas em diversos dispositivos.

#### 2.2.1 Técnicas baseadas em microscopia

A análise de fitoplâncton com base de microscopia representa o método mais utilizado em análise de laboratório, dada a sua fácil utilização. A utilização deste método necessita apenas de um microscópio de alta qualidade (Figura 2.1 - a) para realizar a contagem e identificação do fitoplâncton (Figura 2.1 - b). A identificação das espécies é realizada por um especialista com base morfológica do

fitoplâncton, o que requer um elevado conhecimento por parte de quem analisa. A quantificação é feita contando as células manualmente [34].

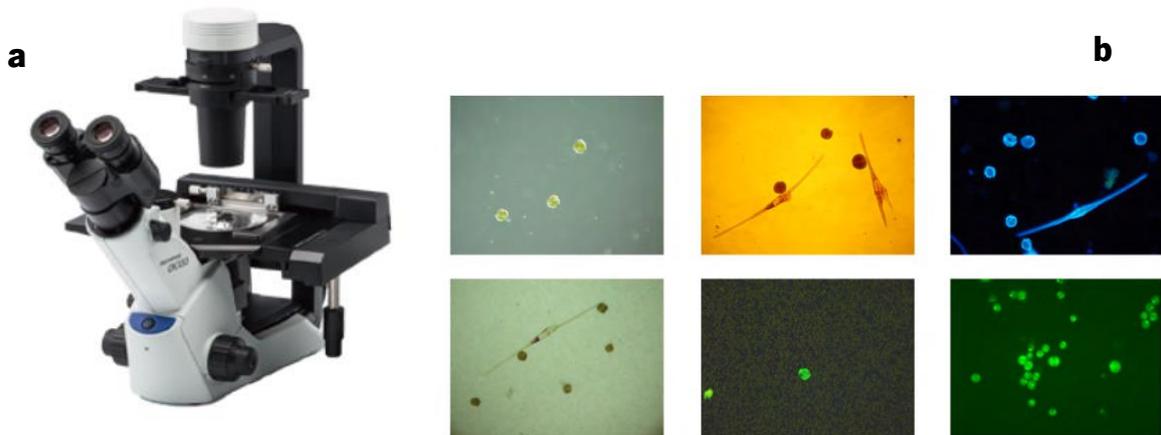


Figura 2.1 – a – Microscópio binocular invertido, usado em laboratório para análise das amostras de fitoplâncton [35]. b - Visualização em microscópio de fitoplâncton [34].

Um dos métodos utilizados na de preparação das amostras para a realização da análise com o microscópio é o método de Utermöhl [36]. Este método usa uma câmara, na qual uma amostra de 10 ml a 100 ml é colocada e deixada para assentar numa lamela. Deixando a amostra repousar durante algum tempo o fitoplâncton presente na amostra irá assentar na lamela. Sendo possível, posteriormente, com recurso a um microscópio invertido realizar a devida análise e contagem [37]. A aplicação deste método requer o uso de um conjunto de material específico, representado na Figura 2.2.

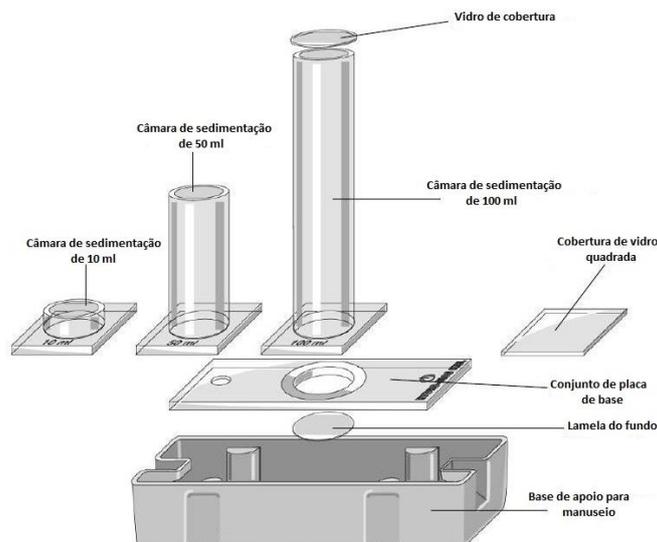


Figura 2.2 - Kit de material para aplicar o método de Utermöhl [38].

A análise de fitoplâncton com microscópio pressupõe que quem está a analisar as imagens tenha o conhecimento e habilidades necessárias para a identificação das células usando apenas as

características morfológicas. Este tipo de análise representa um processo bastante demorado uma vez que é realizado de forma manual, considerando que é utilizado o método de Utermöhl na preparação da amostra para análise é necessário só para realizar a sedimentação dos pigmentos entre 24 e 48 horas [37] [34].

A demora no processo levou à tentativa de fazer este tipo de análise de forma automatizada, tendo sido desenvolvidos alguns softwares com base em redes neuronais artificiais para identificar espécies automaticamente através de reconhecimento de padrões. Contudo, como este método de automatização ainda está pouco desenvolvido requer a necessidade de um especialista em identificação de fitoplâncton para realizar o controlo de qualidade dos resultados obtidos na análise automática das imagens [34].

As técnicas de análise de microscopia apresentam algumas limitações no que diz respeito ao seu uso, nomeadamente a necessidade de equipamento sofisticado e caro, a necessidade constante de um especialista para realizar a análise das amostras e o tempo despendido até realizar análise propriamente dita representa. Considerando o tempo desde que a amostra é recolhida no local até ser efetivamente analisada, é despendido bastante tempo no transporte e tratamento da amostra o que afeta a viabilidade da leitura. Durante esse tempo o fitoplâncton poderá reproduzir-se ou morrer, uma vez que foi retirado do seu ambiente natural, levando a erros de medição, dado que no momento da análise a concentração de fitoplâncton seria diferente da que foi originalmente recolhida. Dessa forma torna-se difícil prever e evitar situações de risco como HABS.

### **2.2.2 Técnicas moleculares**

Devido a algumas dificuldades e limitações das técnicas de identificação morfológica, os estudos com métodos moleculares começaram a ser cada vez mais explorados e aprofundados. Diferentes tipos de técnicas moleculares apresentam requisitos diferentes, dessa forma a gama de equipamentos disponíveis para aplicar estas técnicas vai desde laboratórios muito bem equipados até instrumentos de medição *in situ*.

Algumas das técnicas usadas são baseadas em oligonucleotídeos direcionados a ribossomas RNA (rRNA) e DNA (rDNA) e na reação em cadeia da polimerase (PCR). Oligonucleotídeos e PCR são ligações curtas de RNA ou DNA sintético que são complementares ao RNA/DNA alvo. Uma vez conhecido o sequenciamento molecular das células do fitoplâncton e através desta característica de complementaridade das ligações alvo com as ligações sintéticas, torna-se possível identificar com precisão a existência de fitoplâncton.

O rDNA e rRNA tornaram-se nas técnicas moleculares mais populares para a identificação de fitoplâncton, através das espécies de microalgas que o constituem. Isto porque as regiões analisadas nestas técnicas são regiões conservadas e presentes em todos os organismos [34].

Embora estas técnicas sejam altamente eficazes necessitam de equipamento de elevada complexidade e custo bem como de pessoal altamente especializadas, o que acaba por fazer com que a sua utilização rotineira seja dificultada [39].

### 2.2.3 Técnicas fluorométricas

A deteção de fluorescência representa uma tecnologia amplamente utilizada na quantificação de fitoplâncton. A espectroscopia de fluorescência é uma metodologia que se baseia na medição das propriedades óticas provenientes dos pigmentos fotossintéticos presentes no fitoplâncton, conhecida por ser altamente sensível, não-invasiva e apropriada para monitorização in-situ no que diz respeito a identificação do fitoplâncton [40].[41]. A sua utilização baseia-se no principal pigmento fotossintético utilizado para estimar a abundância de fitoplâncton, a clorofila-a, a qual tem a capacidade de absorver luz na região azul do espectro eletromagnético (430 nm) e emitir fluorescência por volta dos 680 nm, zona do vermelho (Figura 2.3) [42].

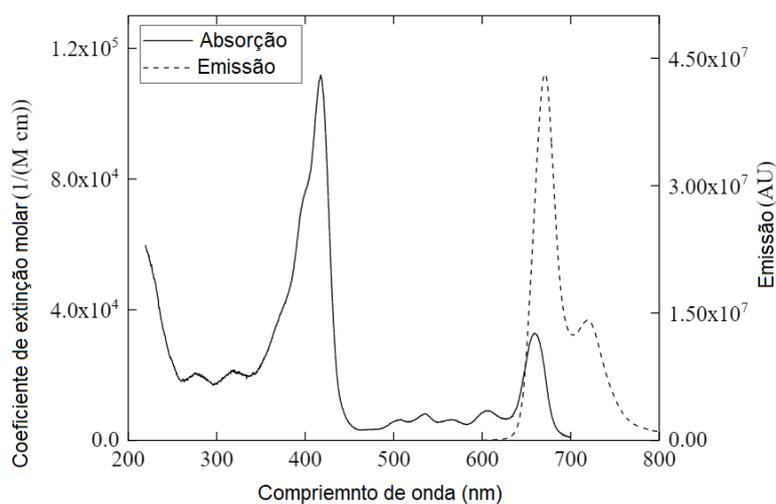


Figura 2.3 - Espectro de absorção e emissão da clorofila-a [16].

Recorrendo a uma fonte emissora de luz que emita na zona dos 430 nm e um fotodetector que detete a intensidade da fluorescência emitida pela amostra, é assim possível, através da espectroscopia de fluorescência, identificar a presença e concentração do fitoplâncton presente numa amostra, uma vez que a intensidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à quantidade de fitoplâncton presente (Figura 2.4).

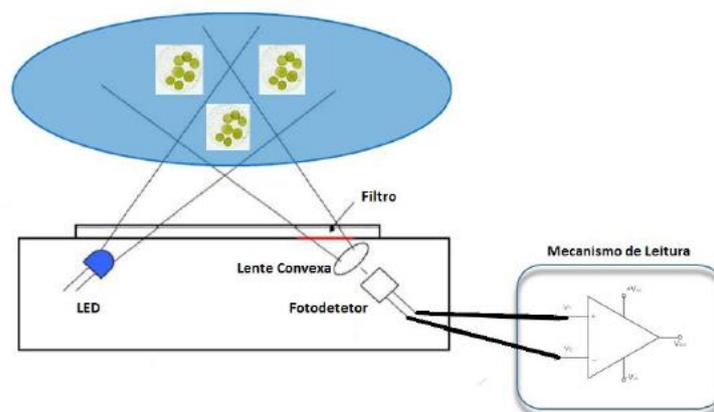


Figura 2.4 - Esquemático da configuração necessária para medição através da espectroscopia de fluorescência, adaptado de [43].

Nos últimos anos tem sido desenvolvidos vários equipamentos que realizam medições de fluorescência. Alguns desses equipamentos são analisadores aquáticos de fluorescência a laser como o ALFA (Aquatic laser fluorescence analyzer), os mais frequentemente utilizados fluorímetros, o sistema SIMPATICO e recursos remotos como satélites ou naves que permitem realizar medições com elevada abrangência de área.

O ALFA (Figura 2.5) foi desenvolvido para caracterizar o ambiente aquático, através de medições espectrais e temporais estimuladas por laser para avaliar os pigmentos e a estrutura da comunidade de fitoplâncton, a eficiência fotoquímica e a matéria orgânica cromófora dissolvida [44]. Este equipamento opera permitindo que as medições possam ser feitas diretamente na água sem necessidade de qualquer preparação ou recolha e tratamento da amostra. Sendo também possível, usando o modo automático de análise rápida, realizar a análise no oceano a bordo de pequenas embarcações. Cada análise realizada permite avaliar de forma precisa a biomassa de pigmentos, a estrutura e a fisiologia da comunidade de fitoplâncton [45]. O destaque deste equipamento deve-se ao facto de realizar as análises de dados em tempo real e a sua capacidade de diferenciação espectral de bandas de fluorescência e avaliação da concentração de clorofila [45].



Figura 2.5 - Configuração do instrumento de medição ALFA [45].

O fluorímetro (Figura 2.6) representa um dos equipamentos mais utilizados para o estudo da distribuição, atividade e população dinâmica *in situ* do fitoplâncton [46]. Este equipamento aproveita as propriedades de fluorescência de excitação e emissão que a clorofila-a, principal pigmento fotossintético contida no fitoplâncton, apresenta para realizar a sua quantificação [47]. A realização da medição é feita usando fontes de luz dedicadas para iluminar um pequeno volume de água que se encontra a passar pela câmara de medição [48]. Contudo, a interpretação dos dados das medições realizadas *in situ* não deve ser direta, isto é, os valores produzidos nas medições são arbitrários e dessa forma o fluorímetro deve ser calibrado. Podendo ainda, outros fatores como a turbidez e temperatura influenciar também os valores medidos [46].



Figura 2.6 - Exemplo de um fluorímetro digital [49].

O sistema SIMPATICO (Sistema Integrado de Monitorização de Parametros TIpo em zonas COsteiras), Figura 2.7, permite realizar monitorização contínua. A sonda do sistema inclui sensores óticos que permitem a medição de turbidez, oxigénio dissolvido e clorofila, contendo também outros sensor para medir pH, temperatura e salinidade [50]. Este sistema mede a concentração de clorofila *in vivo* com base nas técnicas de fluorométricas. Baseia-se num sistema automático que mede caudais e as propriedades da água, sendo constituído por quatro partes principais: (1) uma boia flutuante de superfície, ancorada ao fundo do mar; (2) um computador central, localizado dentro da boia, que comunica e interliga todo o sistema; (3) uma sonda multiparámetros para monitorizar e medir as propriedades da água; e (4) um ou mais correntómetro (ADCP–Acoustic Doppler Current Profiler).

As principais vantagens deste sistema são a aquisição de dados de diversos parâmetros e o facto de todo o sistema ser alimentado através de painéis solares [51]. Em contrapartida, como se trata de um sistema complexo, acaba por ser também uma tecnologia dispendiosa.

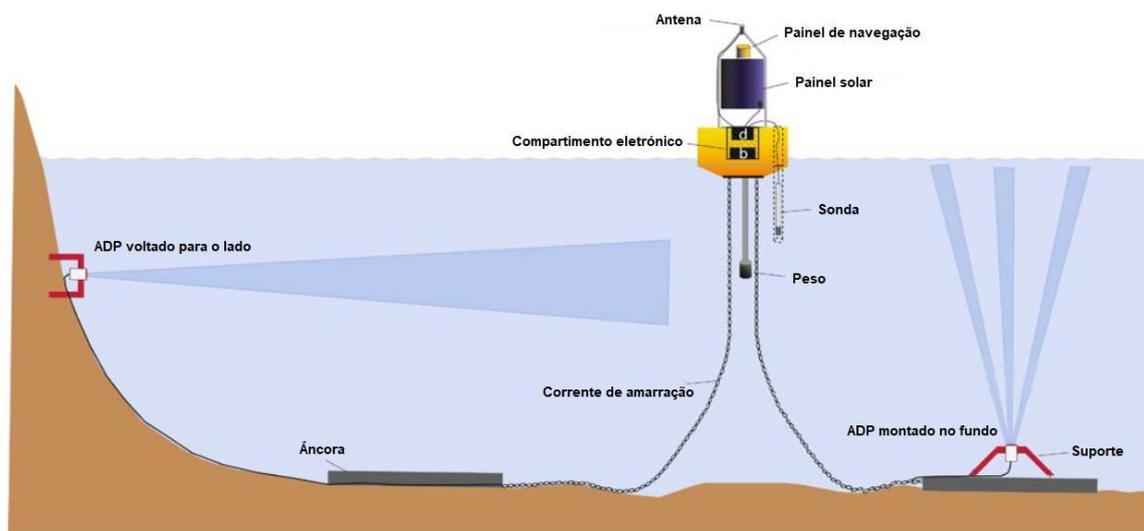


Figura 2.7 -Esquema geral do sistema SIMPATICO. Os pontos b e d representam a localização das baterias e do armazenamento de dados, adaptada de [51]

A medição realizada de forma remota recorre ao uso de satélites ou a naves espaciais. Este tipo de sensorização apresenta como principal vantagem o facto de cobrir uma maior área em cada análise. Apesar disso, esta técnica apresenta baixa resolução, representa uma análise muito superficial e só permite realizar medições durante as horas de luz solar [52]. Este tipo de medição com recurso a satélite realiza as medições de fluorescência utilizando como fonte de excitação o sol e permite estudar a biomassa da clorofila e a produtividade primária. Com base num modelo teórico da variação esperada de emissão de fluorescência com a variação das concentração de clorofila é possível estudar e acompanhar as variações do fitoplâncton [53] (Figura 2.8). Isto faz com este método seja ótimo para ter uma perceção da distribuição geral do fitoplâncton, no entanto com uma muito baixa sensibilidade de medição.

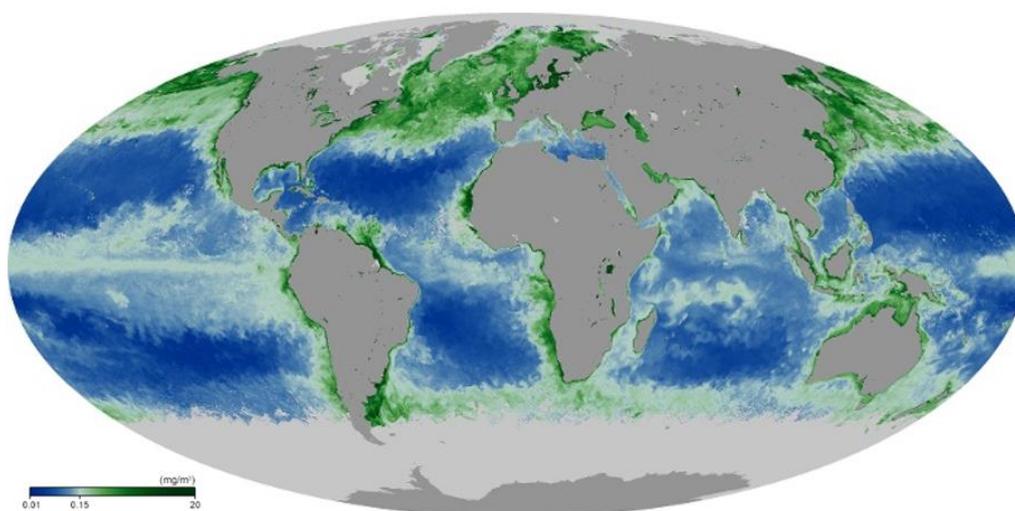


Figura 2.8 - Mapa da concentração de clorofila do mês de maio de 2023, obtida via satélite com o sistema MODIS [54].

## 2.2.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, desenvolvida inicial para uso na ciência médica, é uma técnica que permite quantificar e discriminar as células de fitoplâncton através da medição de sinais de fluorescência e da dispersão da luz quando as células passam na zona de deteção, possibilitando com recurso a um citómetro a monitorização do fitoplâncton [34]. Existem dois tipos diferentes de citometria de fluxo, uma com classificação e outra sem classificação. O tipo sem classificação apenas realiza dispersão de luz e emissão de fluorescência (Figura 2.9), enquanto o tipo com classificação para além de também realizar estes processos tem a capacidade de classificar as partículas analisadas, sendo um exemplo desse equipamento o FlowCAM.

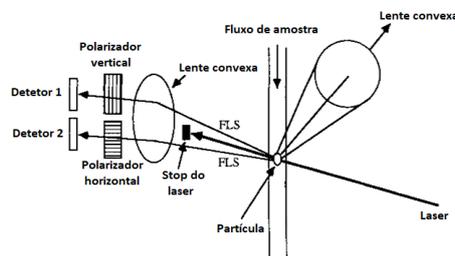


Figura 2.9 - Esquemático de um citómetro de fluxo [55].

Este método de análise é constituído por quatro sistemas principais: sistemas fluidicos, óticos (excitação e aquisição de fluorescência), rede eletrónica (detetores) e um computador. O sistema fluidico é responsável por direcionar a solução para que sejam obtidos os dados presentes nas amostras a analisar, sendo este sistema constituído por dois componentes, invólucro de fluido e linhas pressurizadas. O sistema ótico é formado por lasers responsáveis por iluminar a solução, lentes e filtros óticos. As lentes são utilizadas essencialmente para moldar e focar o feixe do laser, podendo existir vários tipos de lentes em função dos vários tipos de lasers que existem. Os filtros são responsáveis por separar os comprimentos de onda específicos que se pretendem recolher, através dos detetores óticos. A rede eletrónica é responsável por receber e converter o sinal ótico num sinal elétrico que é enviado para o computador onde é processado, podendo ser exibido como gráfico [56].

Esta técnica apesar da rápida contagem e análise das características óticas e de fluorescência, apresenta algumas limitações como o facto de as células presentes na amostra a ser analisada poderem ser afetadas pela aceleração do fluido e de o desempenho da medição pode ser prejudicado pelas propriedades da amostra. Uma concentração elevada pode fazer com que a taxa de análise máxima seja atingida fazendo com que as medições sejam pouco precisas [57]. Para além de serem equipamentos caros e volumosos o que dificulta a sua utilização de forma pratica.

O FlowCAM (Figura 2.10) é um equipamento que faz uso da técnica de citometria de fluxo. Através da captura de imagens das partículas/células, este instrumento é capaz de medir não só a abundância de fitoplâncton como também muitos parâmetros das células, tais como comprimento, largura e fluorescência. Este dispositivo apresenta como vantagens o registo digital dos dados da análise de imagem da amostra tratada, bem como o registo das imagens capturadas. Isto possibilita um posterior estudo visual ou, até mesmo, que as imagens possam ser processadas por um computador para pesquisar e quantificar as células e partículas encontradas [58]. Todavia, existem algumas desvantagens. Para que a identificação de todo o fitoplâncton seja bem-sucedida pode ser necessário recorrer a várias objetivas diferentes, de modo a permitir a visualização das células de diferentes tamanhos. Dependendo do ecossistema em análise o tamanho das células pode variar e se as células forem muito grandes pode ocorrer entupimento do circuito de fluxo. Existe também a necessidade de que o operador tenha conhecimento de identificação de fitoplâncton para a análise dos dados que o equipamento fornece [34].

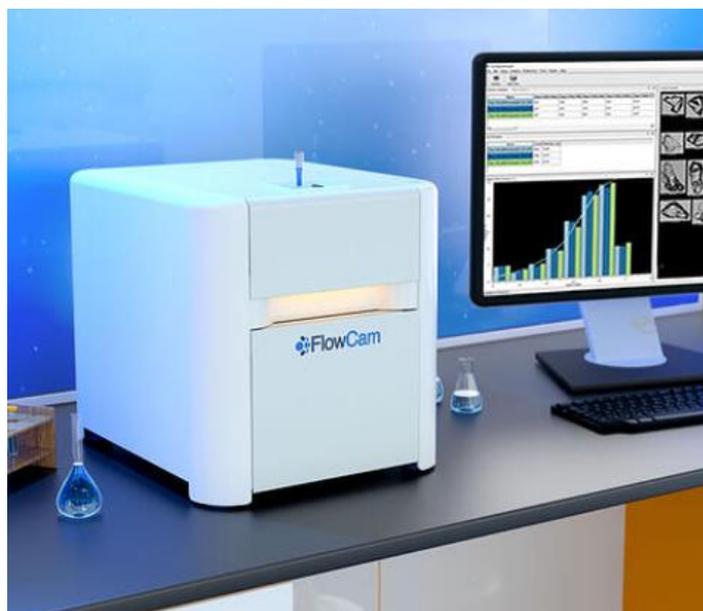


Figura 2.10 - Equipamento FlowCAM que permite a medição de fitoplâncton [59].

## 2.3 Conclusão

A monitorização do fitoplâncton é um processo que pode ser feito recorrendo a diversos procedimentos e equipamentos. A monitorização feita por técnicas de microscopia apesar de ser um método altamente demorado e que exige pessoal com um elevado grau de qualificação é a que representa maior fiabilidade de resultados, sendo ainda utilizada nos dias de hoje. As técnicas moleculares representam um processo de monitorização altamente preciso e fiável, contudo, a sua necessidade de material específico e complexo faz com que ainda sejam um método difícil de usar de

forma automática no local. As técnicas fluorométricas representam uma das técnicas mais rápidas e fáceis de identificar os pigmentos fotossintéticos do fitoplâncton, a clorofila-a. Permitindo a sua utilização em equipamentos que realizam as suas medições de forma rápida, no local e automaticamente. Porém, no que diz respeito a identificação de espécies esta é uma técnica que ainda não está muito desenvolvida. A citometria de fluxo permite a quantificação e identificação de células de fitoplâncton de forma rápida e automática, todavia os citómetros são equipamentos caros e de grandes dimensões que necessitam que os utilizadores sejam qualificados.

Atendendo às vantagens e características de utilizam das diversas metodologias apresentadas a técnica de espectroscopia de fluorescência destaca-se relativamente às outras devido a sua fácil implementação e uso em dispositivos que são utilizados de forma automática *in situ*. Dessa forma, esta é a técnica escolhida, tendo em vista aproveitar todas as suas vantagens para construir um equipamento de baixo custo e com um bom grau de detetabilidade.

# Capítulo 3

## Análise e Compreensão do Sistema

### 3.1 Introdução

Ao longo deste capítulo serão apresentados os principais componentes que constituem o sistema e o modo como atuam, de forma a perceber como a sua junção no final resulta no sistema pretendido. O primeiro passo a dar é conhecer e compreender os princípios de funcionamento em que o sistema está assente. Com base nesses princípios, é possível repartir o sensor em várias partes.

### 3.2 Princípios de funcionamento

O equipamento usa o método de espectroscopia de fluorescência. Este método usa as propriedades fluorescentes da clorofila-a, permitindo a quantificação da mesma através da análise da quantidade de luz vermelha que esta emite após ser excitada com luz azul.

O uso deste método é relativamente simples, contudo necessita que seja usada uma elevada potência por parte da fonte de excitação de modo a existir uma boa relação entre sinal e ruído. Uma vez que o equipamento pretendido tem como um dos focos o baixo consumo, a potência disponível para a fonte de excitação não será a ideal. Dessa forma a resposta da clorofila terá uma baixa amplitude de fluorescência, surgindo assim problemas na aquisição do sinal sobretudo devido ao aumento da sua suscetibilidade ao ruído, diminuído com isto a relação sinal/ruído.

A baixa amplitude associada ao sinal de fluorescência acaba por representar um problema devido à sua facilidade em ser afetada pelo ruído. Visto que o objetivo final é colocar o equipamento submerso grande parte dos ruídos externos deixam de ter impacto sobre o sistema. Todavia, ainda existe o ruído que advém dos componentes eletrónicos utilizados para montar o equipamento, para além da interferência entre os vários circuitos. Para reduzir esse ruído será utilizado um detetor síncrono.

Um detetor síncrono é capaz de extrair um sinal embebido em ruído, com um bom nível de sensibilidade. Em muitos sistemas, o ruído aumenta à medida que a frequência se aproxima de zero. Dessa forma, afastando o sinal pretendido do ruído de baixa frequência torna-se possível a deteção de

sinais de reduzida amplitude, como é o caso da fluorescência da clorofila. A melhor forma para realizar esse afastamento, para frequências com menor ruído intrínseco, é através da modulação do sinal de excitação, isto é, pulsar os díodos emissores de luz (LEDs do inglês light-emitting diodes) responsáveis pela excitação da clorofila com uma frequência na ordem dos quilohertz. Recorrendo a um filtro passa-banda é depois possível isolar o sinal útil e remover todo o ruído das frequências que não tem interesse. Tendo o sinal útil isolado, a recuperação do sinal original pode ser feita recorrendo a um desmodulador síncrono que deslocará o sinal na ordem dos quilohertz para corrente contínua (DC) rejeitando com isso todos os sinais que não estão sincronizados com a referência[60]. Um dispositivo que usa esta técnica é chamado de Amplificador *Lock-In*, representando no sensor o cerne do sistema de leitura. De uma forma simplista, um detetor síncrono compara-se a um filtro de ordem muito elevada, que consegue atenuar significativamente todos os sinais fora da frequência de interesse.

Tendo todos estes conceitos, acima mencionados, como base o sistema para medição e monitorização de fitoplâncton pode traduzir-se no esquemático da Figura 3.1.

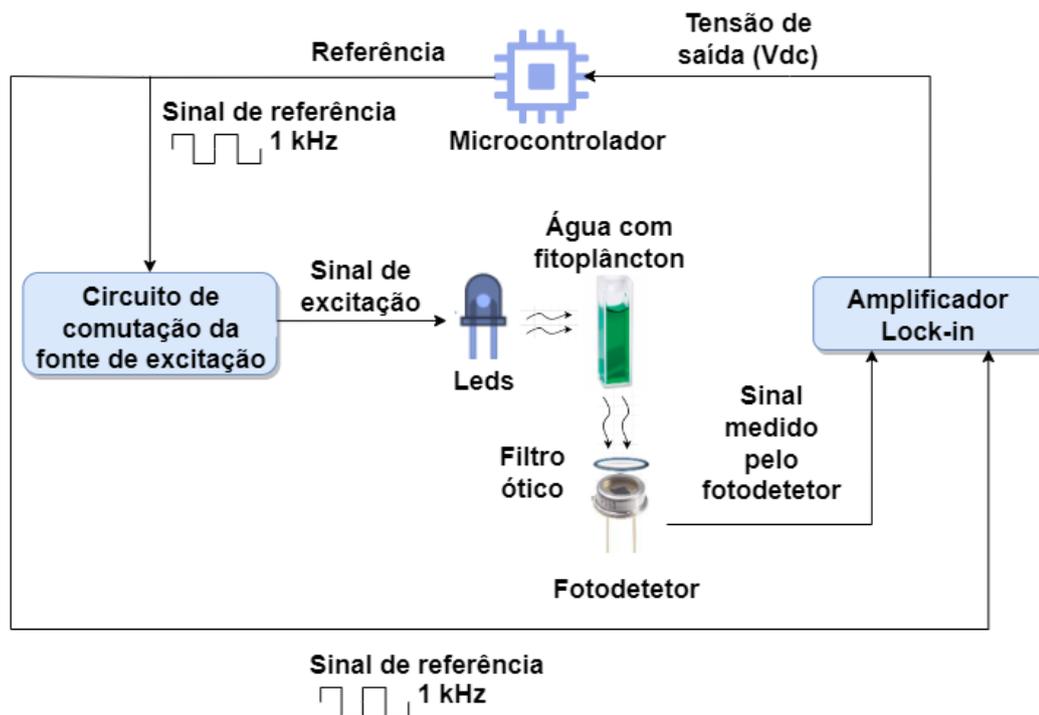


Figura 3.1 – Representação esquemática dos blocos que constituem o sistema de monitorização de clorofila.

Com base no esquemático, para realizar uma medição de clorofila é necessário:

- Geração por parte do microcontrolador do sinal de referência para realizar o sincronismo necessário para a eliminação do ruído;
- Excitação da fonte emissora de luz, LEDs, que serão pulsados à frequência de referência e cuja luz irá incidir perpendicularmente ao fotodetetor;

- Detecção por parte do fotodetector do sinal de fluorescência emitido pela clorofila presente no fitoplâncton. O fotodetector tem implementado por cima um filtro ótico passa alto que rejeita todos os comprimentos de onda que estão abaixo de 550 nm que podem interferir com as medições;
- Amplificação e filtragem do sinal medido pelo fotodetector pelo amplificador *lock-in*, eliminando o ruído e obtendo apenas o sinal de interesse;
- Por fim, o sinal útil será recebido pelo microcontrolador, onde será processado e finalmente enviado para o datalogger.

### 3.2.1 Amplificador *Lock-In*

O amplificador *lock-in* é um instrumento que pode ser usado para deteção e medição de sinais de reduzida amplitude, mesmo estando o sinal de interesse completamente embebido em ruído. Este amplificador utiliza a técnica denominada por deteção sensível à fase, *phase-sensitive detetion*, que isola o sinal através de uma referência com determinada frequência e fase. Dessa forma, o ruído presente em frequências diferentes da do sinal de referência será rejeitado. Para que tal aconteça este amplificador é constituído por vários estágios representados na Figura 3.2, responsáveis no seu todo por atingir o sinal pretendido.

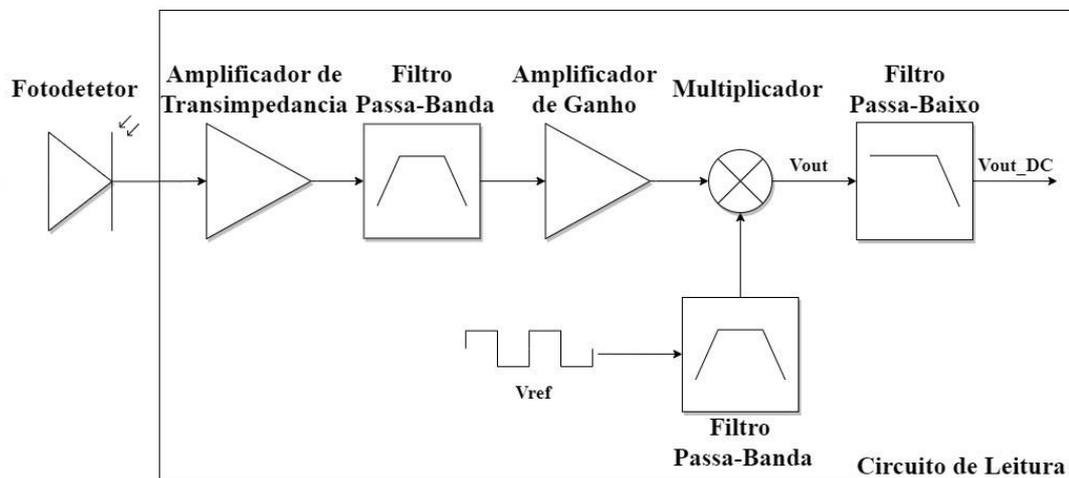


Figura 3.2 - Diagrama de blocos do *lock-in*.

Neste sistema, o sinal de referência é utilizado na excitação pulsada dos LEDs e no bloco multiplicador, de maneira que ambos se encontrem em fase. Cada um dos blocos que faz parte do circuito de leitura tem uma função específica atribuída. Em seguida serão analisados mais em pormenor cada bloco e qual a sua função.

### 3.2.1.1 Amplificador de Transimpedância

O fotodetector retorna em função da fluorescência medida um determinado valor de corrente, que é convertida em tensão pelo amplificador de transimpedância. O dimensionamento do amplificador teve de ser feito tendo em conta que o sinal de fluorescência é de baixa amplitude, o que corresponde a um sinal de entrada no amplificador na ordem dos microampères ( $\mu\text{A}$ ). A ponte de comunicação entre o fotodetector e o amplificador é feita usando cabo coaxial RG-59/U de  $75 \Omega$ , tentando evitar o máximo de introdução de ruído externo no sistema. O amplificador utilizado permite realizar a conversão de corrente em tensão de dois sinais distintos, no caso é utilizado para o sinal de fluorescência e para o sinal de turbidez (Figura 3.3).

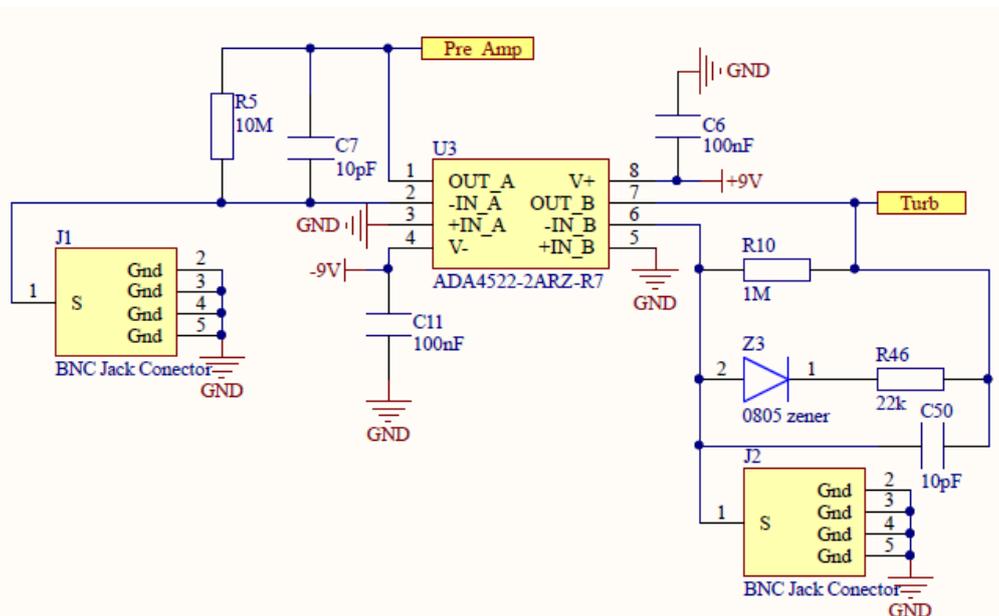


Figura 3.3 - Esquemático da configuração do amplificador de transimpedância.

Neste bloco, a conversão corrente – tensão é feita no ampop ADA4522-2ARZ-R7. De modo que o sinal de tensão final seja na casa dos milivolts (mV) o valor da resistência  $R_5$  é dimensionado. O condensador  $C_7$  e  $C_{50}$  são usados para prevenir oscilações ou picos de tensão à saída do amplificador. A parte da direita do bloco diz respeito à turbidez medida pelo sensor através de um fotodetector colocado na frente de um dos LEDs e abaixo do outro LED (princípio da técnica de luz transmitida). A quantidade de luz emitida pelo LED que chega ao fotodetector é medida em cada ciclo de medição, dependendo da luz recebida é possível calcular o valor da turbidez. Para conseguir sensibilidade nas baixas concentrações de turbidez sem perder uma escala grande são utilizados dois ganhos comutados através de um diodo de zener, um para sinais abaixo do valor do diodo zener Z3 (dado por R10) e outro para valores superiores (com R46).

### 3.2.1.2 Filtro Passa-Banda

O filtro passa banda tem como principal função isolar o sinal útil, eliminando os restantes sinais que se encontram em frequências indesejadas. Como o sinal de excitação é pulsado a uma frequência de 1 kHz, o sinal útil obtido encontrar-se-á também nessa ordem de frequência estando assim deslocado das baixas frequências para frequências mais elevadas e com menor ruído. Dimensionando o filtro para uma frequência de banda passante de 1 kHz (Figura 3.4) e fazendo passar o sinal através dele, é eliminada uma grande parte dos ruídos indesejados presentes no sinal de interesse.

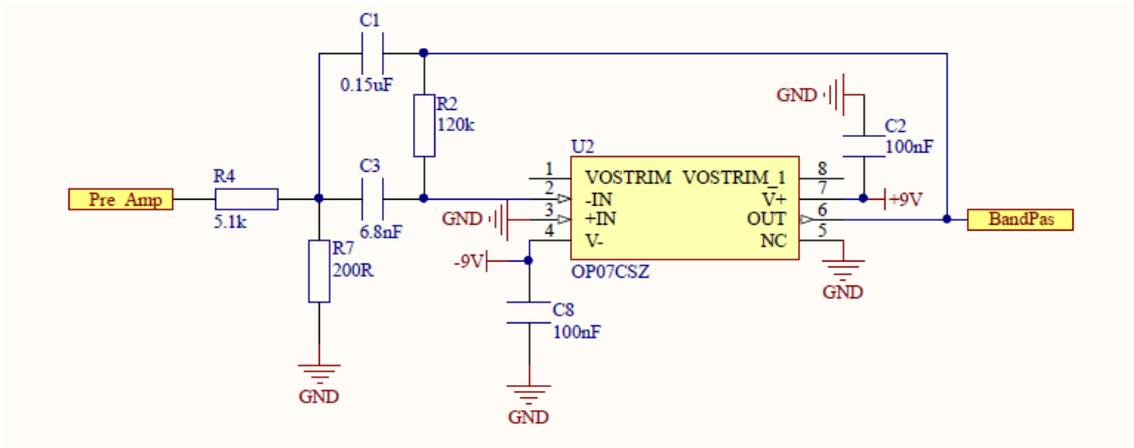


Figura 3.4 - Esquemático do filtro passa-banda.

A topologia escolhida para implementar este filtro é a de múltiplo *feedback*, por oferecer uma implementação de fácil configuração e uma boa fiabilidade. Este filtro apresenta um fator de qualidade (Q) igual a 5, estando o seu diagrama de bode representado na Figura 3.5.

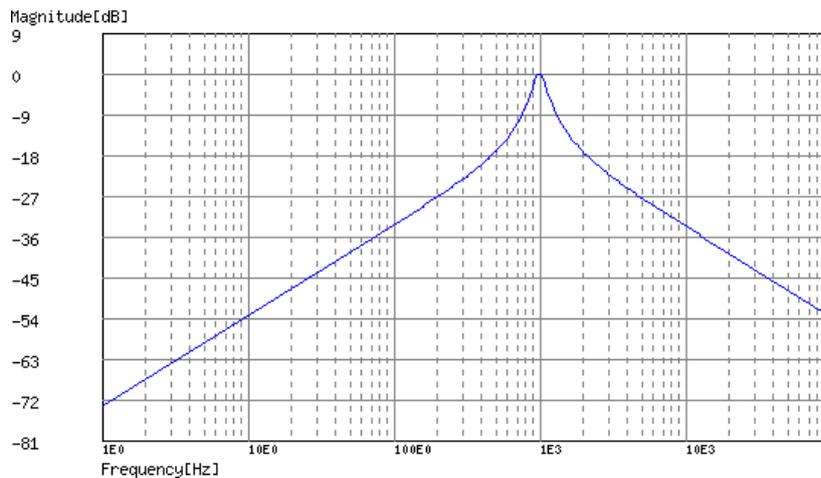


Figura 3.5 - Diagrama de bode da resposta do filtro passa-banda dimensionado.

### 3.2.1.3 Amplificador

O bloco amplificador tem como objetivos alterar o ganho aplicado no amplificador de transimpedância e permitir aproveitar o máximo possível da reduzida resolução do ADC utilizado. Através do uso de vários ganhos variáveis é possível realizar medições numa grande gama de valores, tornando o sensor capaz de medir desde baixas até elevadas concentrações.

Neste bloco amplificador estão implementados quatro ganhos (100;  $\approx 10$ ; 1; 0,1), que são alternados através de um sistema de interruptores eletrónicos. O ganho base é o de 100, representado no esquemático da Figura 3.6 pela resistência R8 de 100 k $\Omega$ , sendo que os restantes ganhos são obtidos através do resultado do paralelo da resistência de base com a resistência que corresponde ao ganho pretendido. A resistência do ganho pretendido é colocada em paralelo com a de base através da ativação dos terminais que lhe correspondem. Para obter o ganho 10 devem ser ativados os terminais G2D3 – G2S3, para o ganho 1 os terminais G1D2 – G1S2 e para o ganho 0,1 os terminais G1D1 – G1S1.

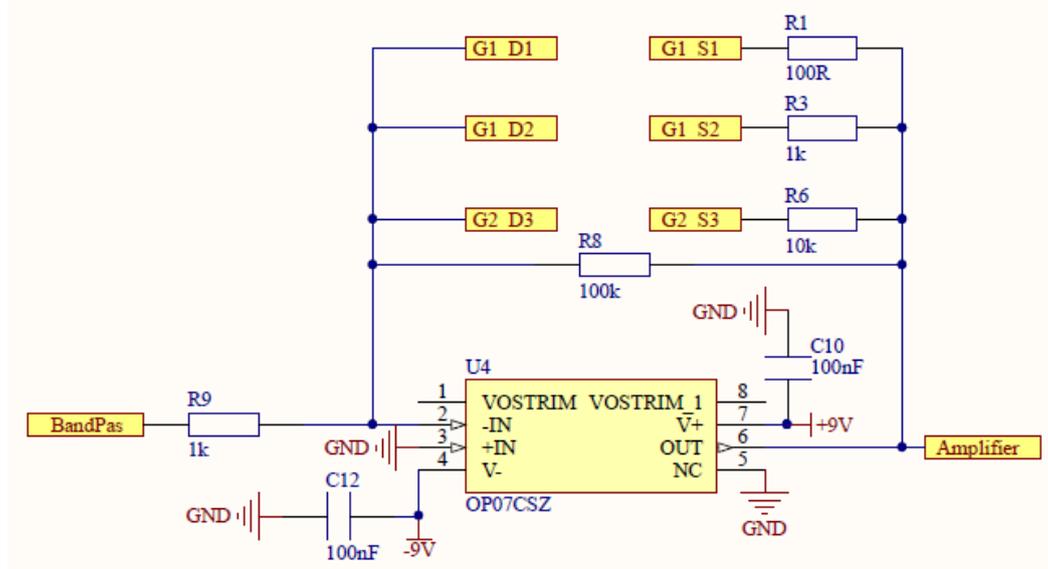


Figura 3.6 - Esquemático do amplificador.

### 3.2.1.4 Multiplicador

O bloco multiplicador pode ser considerado o principal bloco do amplificador *lock-in*, tratando-se do responsável pela recuperação do sinal original. Neste bloco o sinal de fluorescência medido é multiplicado pela referência de 1 kHz (Ref PB) que foi usada para excitar os LEDs, garantindo o sincronismo de ambos os sinais à entrada do multiplicador. Dessa forma, o sinal será deslocado para o domínio contínuo, rejeitando todos os sinais que não estão sincronizados com a referência de excitação. Neste bloco é ainda introduzido um sinal de *offset* (POT\_OUT) que permite regular a linha de base em que são retornados os resultados (Figura 3.7).

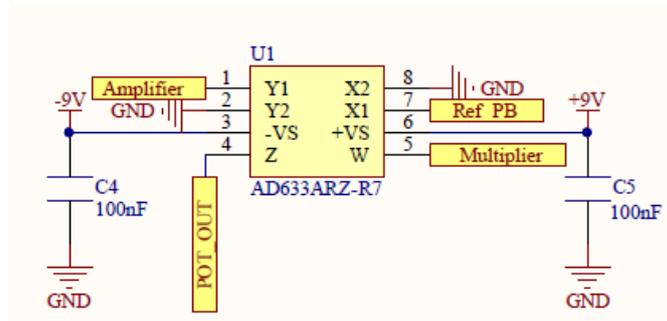


Figura 3.7 - Esquemático do bloco multiplicador.

### 3.2.1.5 Filtro Passa-Baixo

O último bloco do amplificador *lock-in* é o filtro passa-baixo. O filtro implementado utiliza a topologia *sallen-key*, utilizada quando se pretende elevada precisão, sendo dimensionado para uma frequência de corte de 1 Hz com um fator de qualidade de 0,7. Este filtro é utilizado para remover os harmónicos de ruído após deslocar o sinal de interesse para o domínio contínuo, obtendo-se o sinal útil pretendido. Este sinal final será lido e enviado para o datalogger pelo microcontrolador. O esquemático da Figura 3.8 representa o circuito montado para obter o filtro passa-baixo, estando na Figura 3.9 representado o diagrama de bode da resposta do filtro

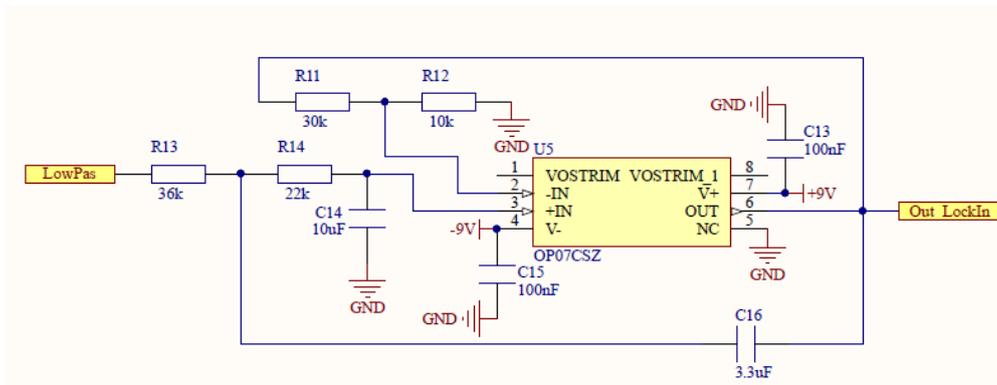


Figura 3.8 - Esquemático do filtro passa-baixo.

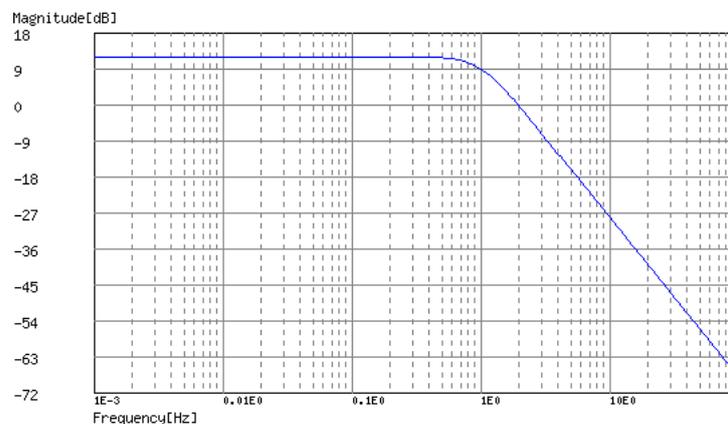


Figura 3.9 - Diagrama de bode da resposta do filtro passa-banda dimensionado.

### 3.3 Protótipo inicial

Foi também analisado o protótipo que permita realizar testes em laboratório. Este será composto por duas partes principais, a câmara de medição onde está a fonte emissora de luz, o fotodetetor e o filtro ótico, e a placa de controlo e atuação do sistema onde está o circuito de leitura e o microcontrolador que comandará todas as operações do sistema.

#### 3.3.1 Câmara de medição

A câmara de medição corresponde a parte do sensor onde são realizadas as medições dos parâmetros a recolher. Para construir esta câmara foram fabricadas, através de impressão 3D, as peças necessárias e foram montadas conforme a Figura 3.10. Esta solução permite uma fácil adaptação e montagem, e acima de tudo, garante um fabrico de baixo custo. Para realizar a assemblagem das várias peças foi utilizada uma resina epóxi para garantir a impermeabilidade do protótipo e permitir sua imersão, garantindo ainda alguma resistência à pressão da água. Para além das peças feitas para montar a estrutura da câmara, esta é também constituída por dois *LEDs* e seu respetivo circuito de atuação, um fotodetetor para a fluorescência da clorofila, um filtro ótico e um fotodetetor para as medições de turbidez, que serão apresentados com mais pormenor neste capítulo.

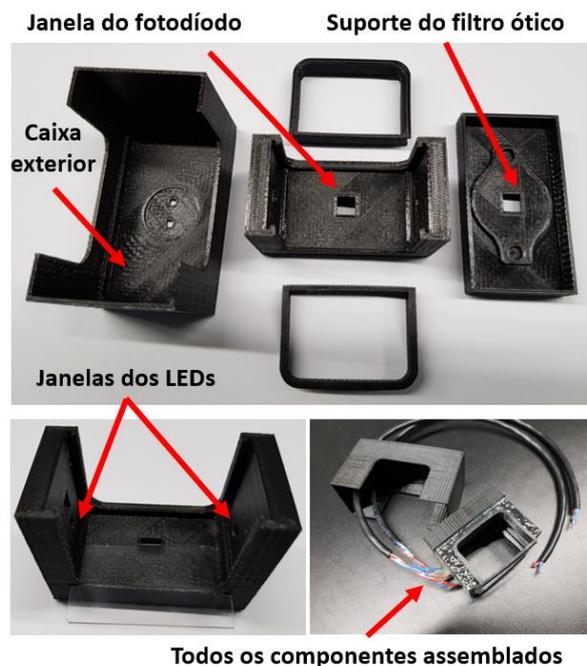


Figura 3.10 – Peças e assemblagem da câmara de medição do sensor.

A câmara de medição permite realizar a recolha de dados através da sua imersão na solução ou ambiente onde pretendemos fazer as medições. O seu processo de operação é simples, a câmara foi

projetada em formato de U para que ao ser submersa e a água contendo algas consiga fluir facilmente através dela. Uma vez iniciado o procedimento de medição as algas presentes na água que atravessa a câmara são excitadas pelos LEDs e o fotodetector, colocado a 90° em relação aos LEDs, irá receber a fluorescência emitida pela clorofila contida nas algas. Através da Figura 3.11 é possível perceber melhor o processo de funcionamento da câmara de medição durante as medições.

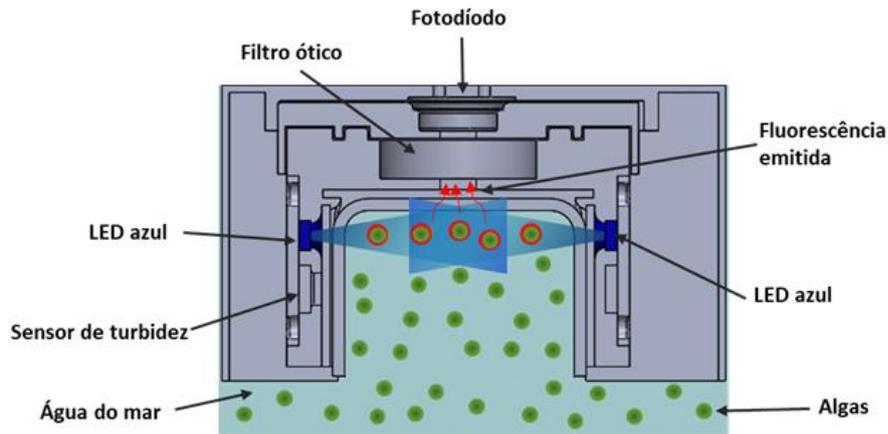


Figura 3.11 - Esquemático da câmara de medição do sensor.

### 3.3.1.1 Fonte emissora de luz

A fonte emissora de luz escolhida é um *LED*. Na construção do protótipo serão colocados dois *LEDs* perpendiculares ao fotodetector. A escolha do *LED* a usar baseou-se em características como a intensidade luminosa, o pico do comprimento de onda e o tamanho, sendo a intensidade luminosa a de maior importância dado que a concentração de fitoplâncton no mar é baixa e uma maior capacidade de excitação melhora a sensibilidade de medição. O pico do comprimento de onda deve ser em torno dos 430 nm uma vez que é o comprimento de onda ideal para realizar a excitação da clorofila-a. Assim sendo, a fonte emissora de luz escolhida é o *LED LUXEON Rebel Royal Blue* da LUMILEDS (Figura 3.12).

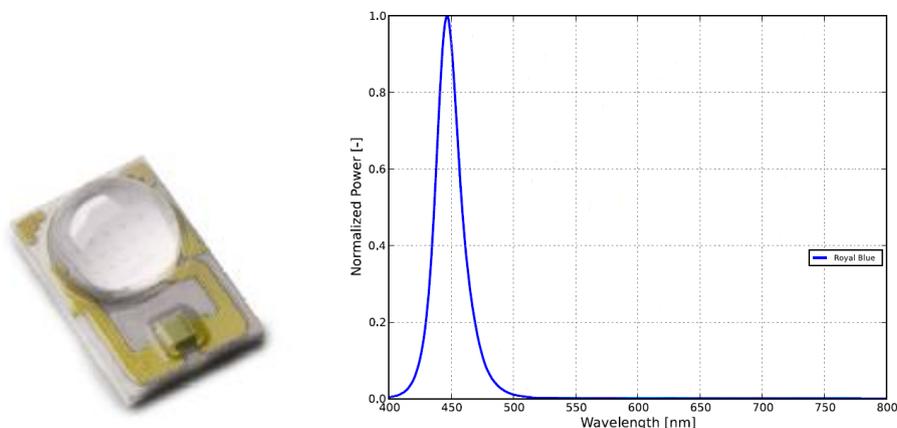


Figura 3.12 – Fonte emissora de luz, LED LUXEON Rebel Royal Blue e o seu respetivo diagrama de espectro.

A atuação dos LEDs é feita de forma que exista sincronismo em todo o processo, sendo pulsados com base numa onda de referência gerada por software (REF na Figura 3.13). A onda é uma senoide com frequência de 1 kHz gerada por um DAC do microcontrolador a partir de um array de 100 valores. Os LEDs são alimentados (V\_LEDS na Figura 3.13) e comandados por um circuito controlado por um transistor (Q2 na Figura 3.13) que é comutado e ativado pela onda de referência gerada pelo DAC. Desta forma torna-se possível controlar por software quando e durante quanto tempo os LEDs estão ativos.

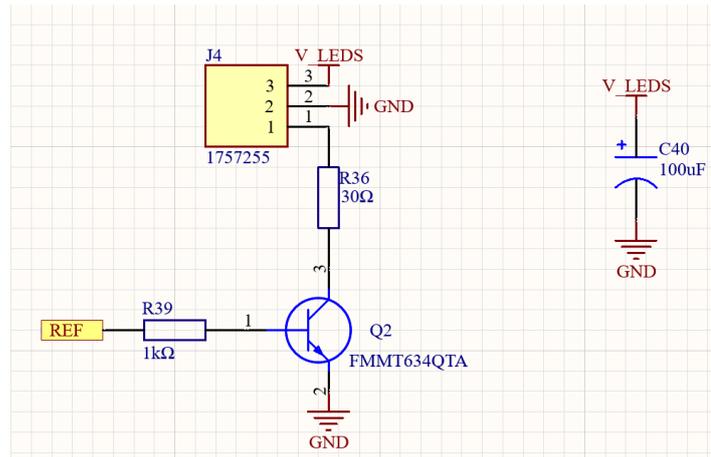


Figura 3.13 - Circuito de atuação dos LEDs.

### 3.3.1.2 Fotodetector

O fotodetector utilizado na medição da fluorescência da clorofila é o fotodíodo de silício S1336-8BK da Hamamatsu (Figura 3.14 - a). Este fotodíodo tem uma sensibilidade com uma gama que vai desde o ultravioleta até ao infravermelho, sendo muito utilizado em equipamentos de medição ótica. A sua escolha foi baseada nas suas características de responsividade, eficiência, não uniformidade, não linearidade e o ruído. Existe ainda outro fotodetector no sistema utilizado para realizar medições relativas à turbidez, o fotodíodo de silício SFH 2240 da OSRAM (Figura 3.14 - b).

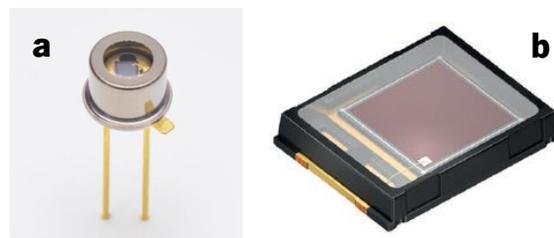


Figura 3.14 – a-Fotodetector Hamamatsu para medir a fluorescência da clorofila a). b-Fotodetector OSRAM para medir a turbidez b).

### 3.3.1.3 Filtro ótico

A implementação do filtro ótico visa fazer com que chegue ao fotodetector apenas a luz correspondente à fluorescência do fitoplâncton. Para que isso aconteça foi utilizado o filtro passa-banda FBH680-10 da Thorlabs que rejeita todos os comprimentos de onda em torno dos 680 nm (Figura 3.15).

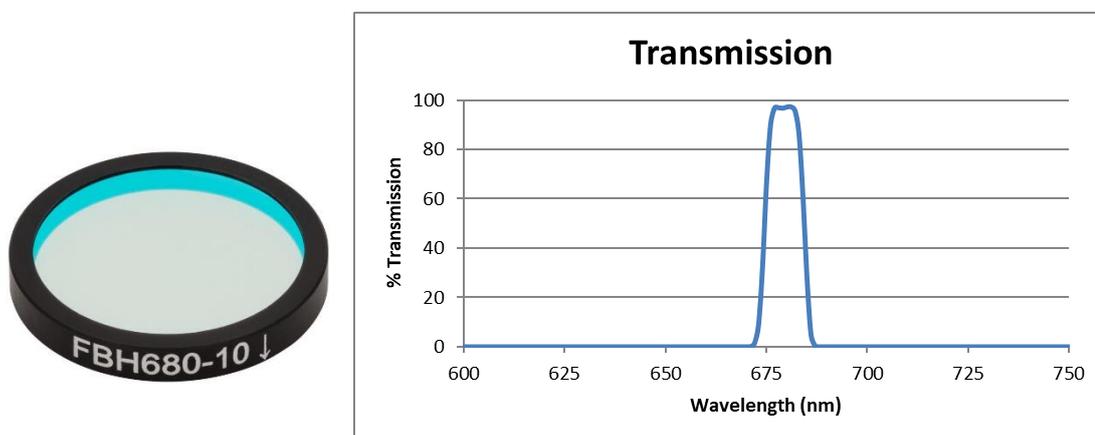


Figura 3.15 – Filtro ótico da Thorlabs utilizado e respetivo diagrama de transmissão.

### 3.3.2 Circuito de leitura e Microcontrolador

O circuito de leitura é responsável por devolver o valor de corrente medido pelo fotodetector, correspondente ao valor de clorofila, num sinal de tensão sem interferência de ruídos. Esse circuito de leitura corresponde ao amplificador *lock-in* apresentado anteriormente, projetado para uma frequência de 1 kHz.

O microcontrolador comanda todas as operações do sistema. Será responsável por gerar as ondas de referência para o amplificador *lock-in* bem com realizar a recolha e tratamento dos dados. Como o consumo é um fator importante no projeto deste sensor, o microcontrolador escolhido é a STM32L082KZ. Esta permite realizar medições com um bom grau de sensibilidade e controlar todo o circuito de forma rápida com um baixo consumo de energia. Analisando com mais detalhe a sensibilidade do microcontrolador podemos constatar que, as medições realizadas são feitas com recurso aos ADCs disponíveis no microcontrolador. De acordo com o datasheet os ADCs apresentam uma resolução de 12 bits, o que permite que sejam recolhidos 4096 valores diferentes em cada medição. Uma vez que podem medir até um máximo de 3 V, dividindo a tensão máxima que pode medir pelo número de medições que pode realizar pode concluir-se que estes ADCs conseguem medir variações na ordem dos 732  $\mu\text{V}$ .

Estas duas partes do sistema foram assembladas numa única placa de circuito impresso (PCB) cujo circuito resultante é apresentado nas Figura 3.16 e Figura 3.17, tornando-se assim possível avançar para a parte da montagem do protótipo e iniciar testes práticos.

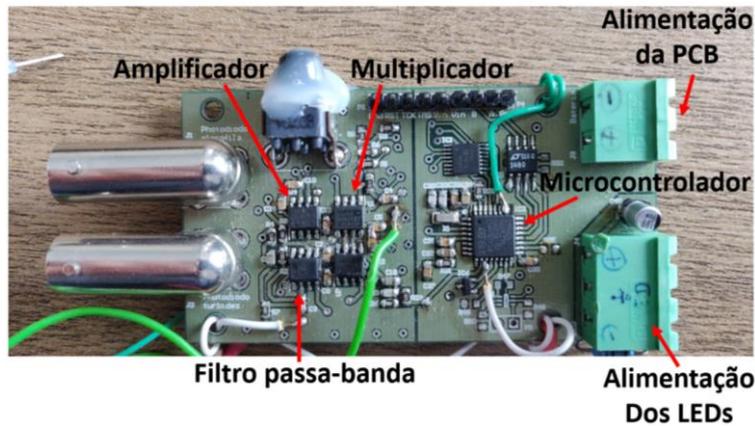


Figura 3.16 – Parte de cima da placa eletrónica.

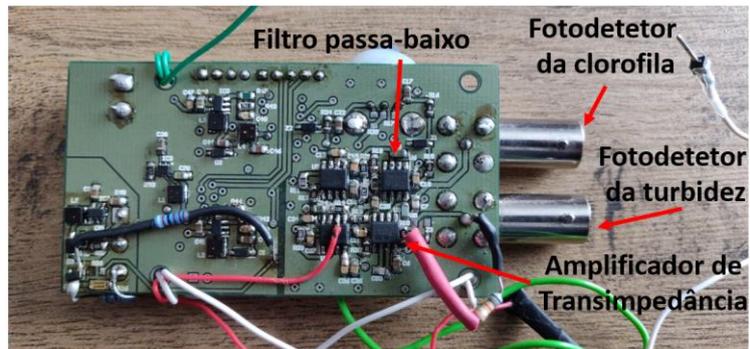


Figura 3.17 – Parte de baixo da placa eletrónica.

### 3.4 Conclusão

Conhecidas as várias partes que dão corpo ao sensor, bem como os seus conceitos e princípios de funcionamento é agora possível passar para os testes com protótipo.

Conectando a câmara de medição com o circuito de controlo e leitura passamos a ter um sistema totalmente operacional. Descrevendo o processo de funcionamento do sistema pode dizer-se que este opera realizando ciclos de medição, que se repete consoante a frequência de medições que se pretende realizar por dia. Considerando que um ciclo de medição demora aproximadamente 1 minuto, se não existir nenhum tempo de espera entre ciclos serão realizadas 1440 medições por dia. Um ciclo de medição corresponde à constituição de uma trama com as medições da clorofila para os quatro diferentes ganhos, da turbidez, da luz ambiente que chega ao fotodetector, da temperatura e da carga da bateria, terminando com o envio dessa trama através da porta série para o datalogger.

# Capítulo 4

## Caracterização do protótipo existente

### 4.1 Introdução

Neste capítulo serão apresentados os testes realizados para a primeira caracterização do protótipo existente. Inicialmente foram realizados alguns testes para perceber o estado do sensor e quais as alterações que seriam necessárias realizar logo à partida. Tendo estes testes e alterações concluídos, o próximo passo foi migrar o *setup* do protótipo de laboratório para um que permita a realização de testes de campo. Com um dispositivo apto para testes de campo foram realizados testes de calibração e de campo nos laboratórios do ECIMAT em Vigo. Destes testes, além de uma calibração do sensor recorrendo a um fluorímetro convencional, resultaram várias melhorias e correções a implementar no sensor.

### 4.2 Testes e correções iniciais

A primeira coisa a fazer foi a realização de alguns testes para perceber o estado em que o projeto se encontrava e quais os pontos a melhorar e evoluir.

Nesta fase de testes o sensor ainda não tinha os seus ADCs em funcionamento, logo ainda não se encontrava apto para medir e recolher os dados. Os resultados nesta fase foram medidos recorrendo a um multímetro digital para medir a tensão na entrada do ADC e ao software *LabVIEW* da National Instruments.

#### 4.2.1 Comparação do sistema atual com a versão anterior

O primeiro teste realizado pretendeu comparar o funcionamento da nova versão que utiliza como microcontrolador a STM com a versão anterior que ainda utiliza Arduino (Figura 4.1). A realização deste teste consistiu em realizar medições nas duas versões utilizando as mesmas soluções. A câmara de

medição utilizada é a mesma para as duas versões uma vez que é compatível com ambos os circuitos de atuação e controlo.

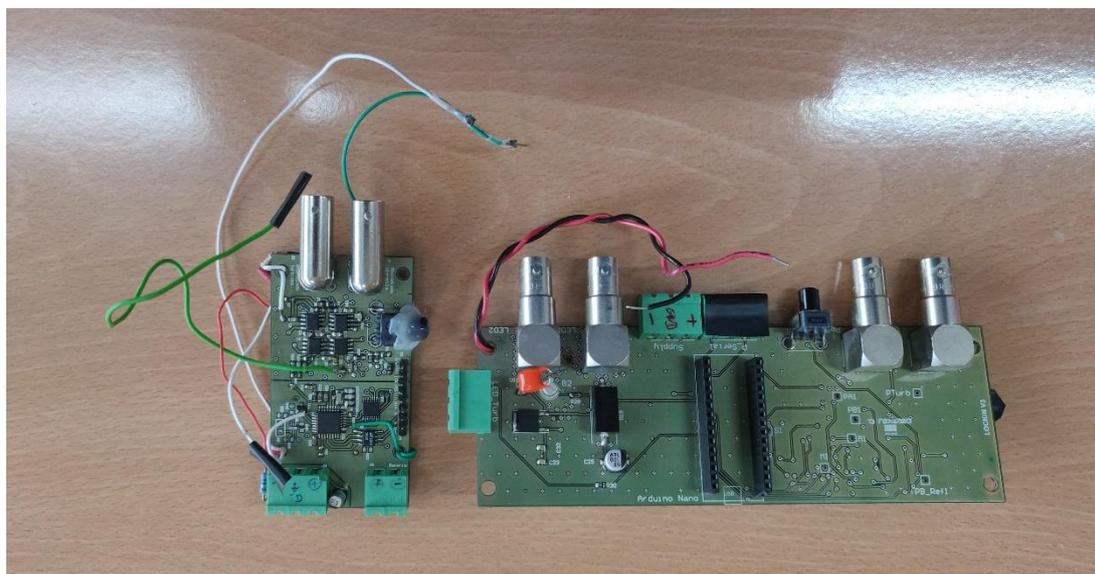


Figura 4.1 – Placas de eletrônica do sistema com STM do lado esquerdo e com Arduino do lado direito.

Neste teste foram utilizadas três soluções, a Referência ( $0 \mu\text{g/L}$ ),  $0,5 \mu\text{g/L}$  e  $1 \mu\text{g/L}$ . O objetivo deste teste é perceber com base nos resultados das medições se o circuito que recorre à STM como microcontrolador apresenta uma resposta tão boa ou melhor quando comparado com o circuito que recorre ao Arduino. Na Figura 4.2 encontram-se as medições de tensão obtidas durante a medição de cada uma das 3 soluções, utilizando a versão com Arduino, sendo que foram realizadas 3 medições a cada solução, ao longo de 20 segundos.

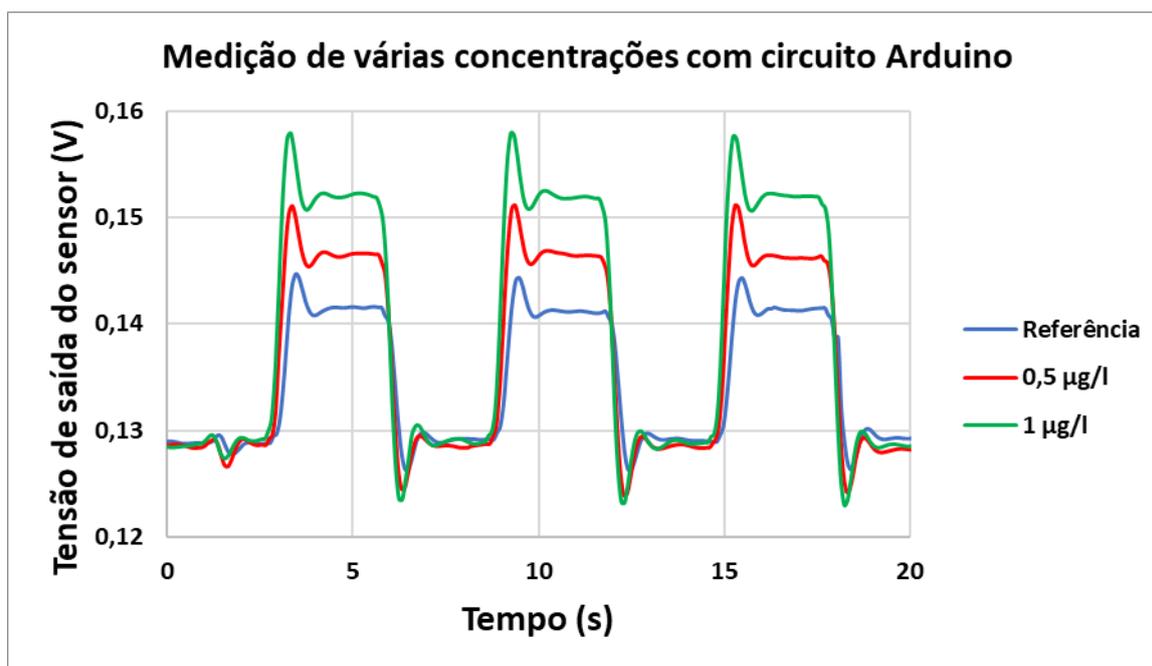


Figura 4.2 - Evolução da tensão no ADC durante as medições feitas com o circuito do arduino.

No gráfico da Figura 4.3 encontram-se os resultados da tensão obtida à entrada do ADC, na medição de cada um das 3 soluções, utilizando a versão com STM. Para cada solução, foram realizadas 4 medições consecutivas, espaçadas aproximadamente 4 segundos. As medições são realizadas consecutivamente com o ganho 100, 10, 1 e 0,1, respetivamente aos 4, 8, 12 e 16 segundos aproximadamente.

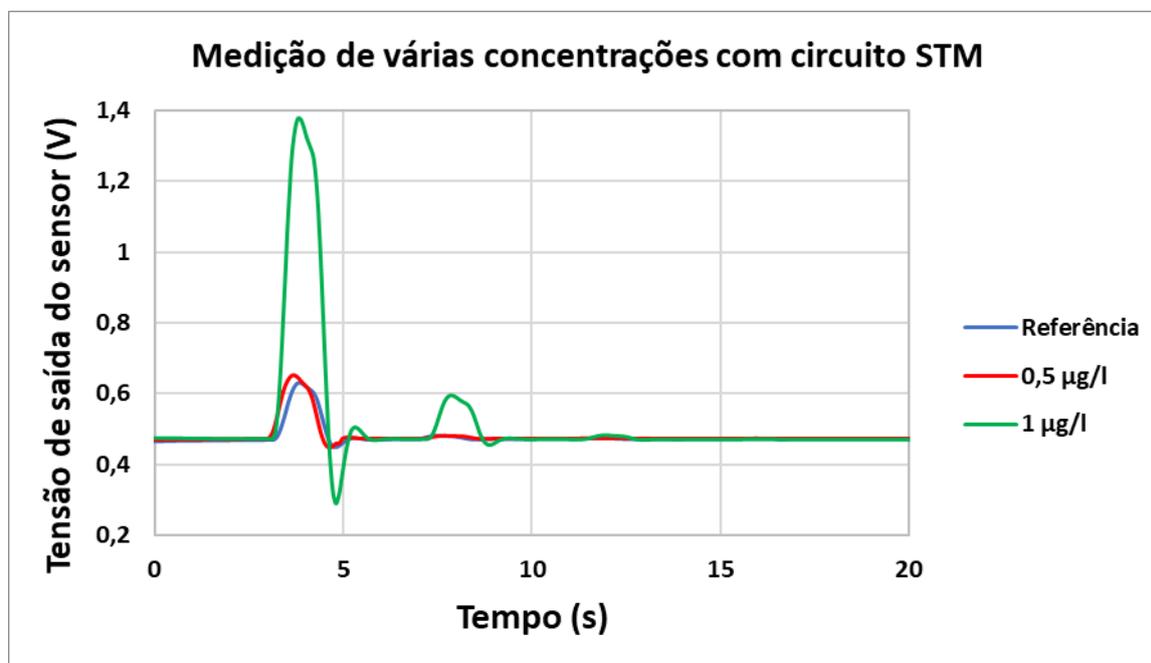


Figura 4.3 – Evolução da tensão durante as medições feitas com o circuito da STM.

Comparando os resultados evidencia-se que ambas as versões apresentam uma boa sensibilidade na sua resposta. Contudo, a versão com STM destaca-se mostrando que com o recurso dos seus vários ganhos torna-se mais fácil notar oscilações no valor de concentração medida, com valores mais elevados de tensão. Reparando nas medições feitas para as concentrações de 0,5 e 1 µg/L percebe-se que o incremento retornado nos resultados é mais evidente na versão com STM quando se analisa as medições feitas com o ganho 100.

#### 4.2.2 Aumento da intensidade dos LEDs

No decorrer dos primeiros testes verificou-se que na versão com STM a intensidade luminosa dos LEDs era mais baixa que na versão com Arduino, tendo sido inclusive medida a corrente que os alimentava e constatando-se que as correntes de alimentação eram de 57 mA e de 88 mA para as respetivas versões. Como a intensidade de excitação da clorofila pode afetar bastante as medições realizadas pelo sensor, foi aumentada a corrente fornecida aos LEDs. Esse aumento foi feito tendo em conta também a necessidade de o circuito possuir baixos consumos.

Para realizar esse aumento foi estudado o circuito que alimenta os *LEDs* e verificou-se que bastaria diminuir o valor da resistência R36 (Figura 4.4). Para realizar essa diminuição foi colocada uma resistência de 30  $\Omega$  em paralelo com a R36, diminuindo assim para metade o valor da resistência resultante. Isso faz com que em teoria os *LEDs* passassem a ser alimentados por uma corrente de 114 mA.

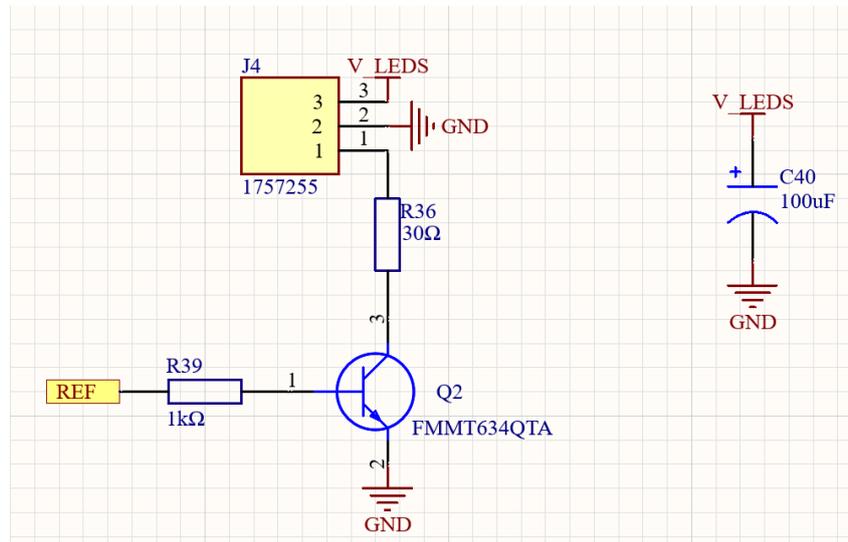


Figura 4.4 – Esquemático do circuito de alimentação dos *LEDs*.

O aumento da corrente de alimentação dos *LEDs* foi a primeira alteração realizada no circuito, realizando-se em seguida novos testes para comprovar se esse aumento na alimentação dos *LEDs* produz uma melhoria na sensibilidade das medições realizadas. Neste novo teste foi utilizado um espectro de concentrações composto por seis soluções. Os resultados encontram-se representados no gráfico da Figura 4.5.

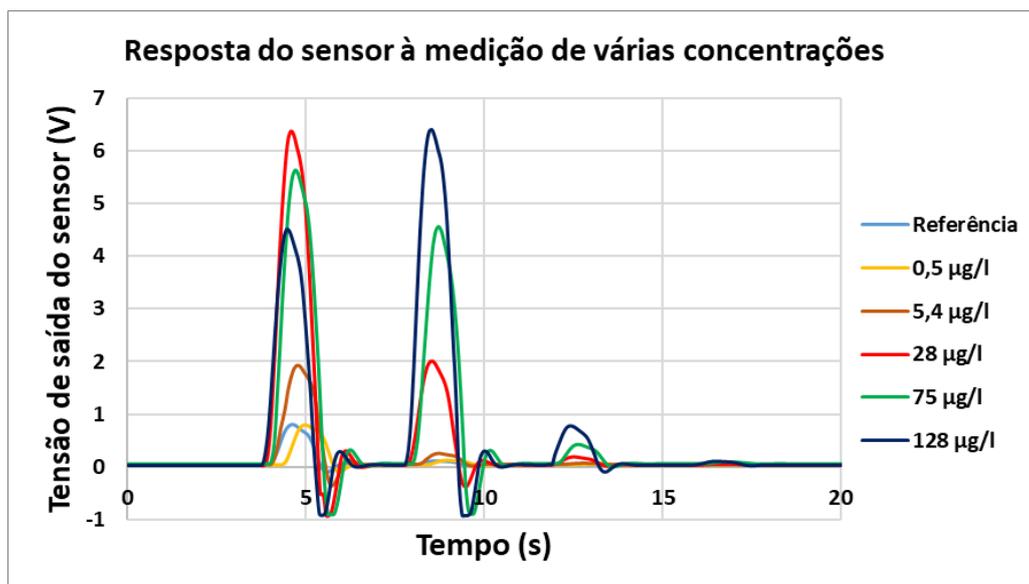


Figura 4.5 - Evolução da tensão no ADC durante as medições de diferentes concentrações de clorofila, após aumento da intensidade dos *LEDs*.

Olhando para os resultados obtidos, verifica-se que o uso de quatro ganhos é vantajoso. Como as concentrações de 28  $\mu\text{g/L}$ , 75  $\mu\text{g/L}$  e 128  $\mu\text{g/L}$  são elevadas, os resultados das medições realizadas com o ganho 100 são os valores do sistema em saturação, ou seja, estes valores não devem ser considerados, verificando-se o mesmo para o ganho 10 nas concentrações de 75 e 128  $\mu\text{g/L}$ . Estas concentrações são tão elevadas que os valores obtidos nas medições representam a saturação do sistema, não devendo ser considerados estes valores e apenas analisar os ganhos mais baixos.

Desconsiderando os resultados mencionados acima e analisando os restantes, verifica-se que a resposta do sensor teve uma melhoria na sensibilidade. Comparando a amplitude do valor medido para a concentração de 0,5  $\mu\text{g/L}$  verifica-se que antes do aumento de corrente tínhamos uma amplitude de 200 mV, sendo que depois do aumento essa amplitude passou para 800 mV. Em suma, verifica-se que com o aumento da corrente de alimentação dos LEDs dá-se um aumento na intensidade luminosa que eles imitem para excitar a clorofila, o que resulta numa maior emissão de fluorescência.

### 4.2.3 Utilização dos ADCs

Todos os testes anteriores foram realizados medindo a saída do amplificador *lock-in* recorrendo a um multímetro digital. Como se pretende que o sensor realize medições de forma autónoma e sem necessidade aparelhos extra, a próxima etapa corresponde à colocação dos ADCs (Analog-to-Digital Converter) do microcontrolador em funcionamento.

Como tal, procedeu-se à ativação e programação dos ADCs, sendo ainda necessário realizar uma sincronização do momento em que o ADC realiza a leitura e o pico de fluorescência emitida pela clorofila (Figura 4.6).

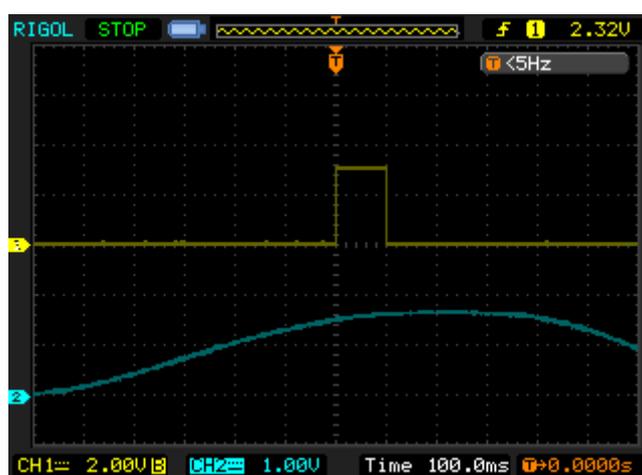


Figura 4.6 - Sincronização do momento de leitura dos ADCs.

A onda representada a amarelo representa o funcionamento do ADC, sendo que a região com o pulso quadrado é o tempo em que o ADC se encontra ativo a realizar a medição. A onda a azul representa a resposta do fotodetector perante a fluorescência emitida pela clorofila após ser excitada pelos LEDs. Para que a medição do ADC fosse o mais correta possível e de maior sensibilidade, o momento em que se encontra a medir foi devidamente ajustado para coincidir com o momento do pico tensão da fluorescência da clorofila. Note-se que o atraso nesta tensão deve-se essencialmente ao filtro passa baixo do circuito.

Concluída a ativação e sincronismo do momento de leitura do *ADCs*, realizou-se um teste para comprovar que o *ADC* apresenta valores de medição iguais ou semelhantes aos medidos recorrendo ao multímetro digital. Nas Figura 4.7 e Figura 4.8 encontram-se os resultados obtidos das medições feitas com recurso ao multímetro digital.

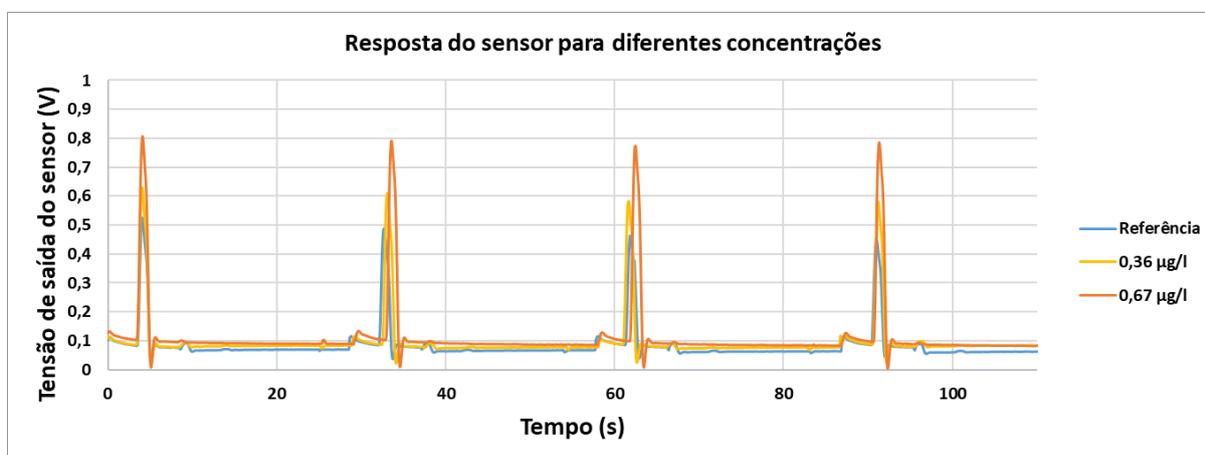


Figura 4.7 - Medições realizadas com o multímetro digital para comparar com as medições do ADC, concentrações mais baixas.

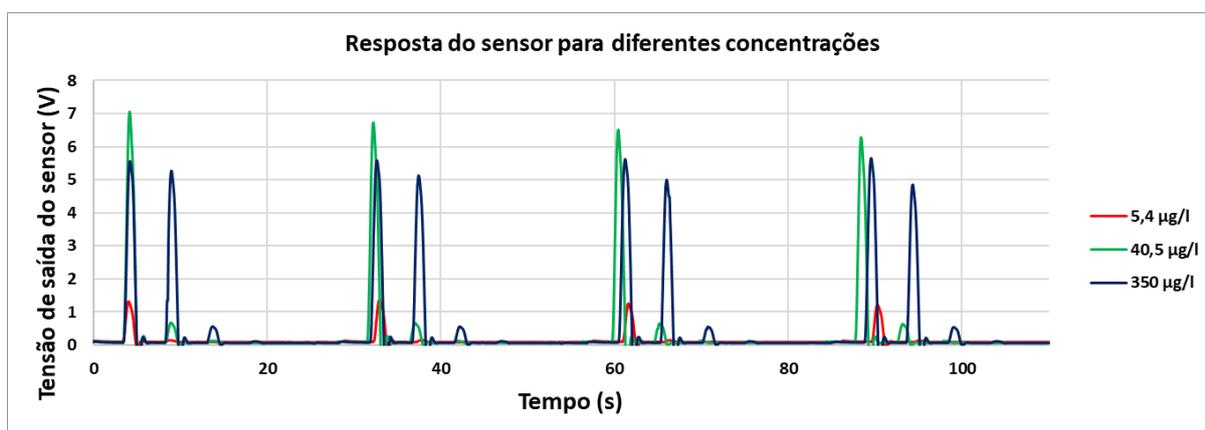


Figura 4.8 - Medições realizadas com o multímetro digital para comparar com as medições do ADC, concentrações mais elevadas.

Em simultâneo à medição com o multímetro foram realizadas as medições com os *ADCs*. Da análise dos resultados dos gráficos foram retirados os valores dos picos de cada medição, de modo a

realizar uma comparação com os valores medidos com recurso aos ADCs do microcontrolador. Essa comparação encontra-se representada na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação dos valores medidos pelo multímetro digital e pelo microcontrolador para diferentes concentrações.

Concentração	Medição	Referência -Água				0,36 µg/L				0,67 µg/L				5,4 µg/L				40,5 µg/L				350 µg/L			
		Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100
Pulso 1	Multímetro	0.070	0.072	0.094	0.524	0.084	0.085	0.097	0.630	0.089	0.091	0.099	0.808	0.075	0.082	0.135	1.311	0.079	0.137	0.680	7.046	0.122	0.568	5.276	5.563
	ADC	0.121	0.120	0.100	0.550	0.123	0.123	0.114	0.657	0.138	0.140	0.145	0.844	0.125	0.131	0.182	1.354	0.129	0.185	0.727	3.000	0.171	0.617	3.000	3.000
Pulso 2	Multímetro	0.067	0.069	0.091	0.487	0.079	0.080	0.093	0.612	0.087	0.090	0.097	0.792	0.074	0.081	0.138	1.363	0.081	0.138	0.670	6.718	0.124	0.567	5.129	5.570
	ADC	0.122	0.121	0.100	0.518	0.125	0.122	0.111	0.641	0.136	0.136	0.144	0.829	0.123	0.129	0.185	1.401	0.129	0.186	0.715	3.000	0.173	0.613	3.000	3.000
Pulso 3	Multímetro	0.064	0.066	0.091	0.462	0.078	0.079	0.093	0.583	0.084	0.086	0.094	0.772	0.075	0.081	0.133	1.250	0.080	0.136	0.654	6.504	0.122	0.557	5.002	5.628
	ADC	0.122	0.120	0.096	0.492	0.125	0.125	0.111	0.617	0.133	0.135	0.140	0.813	0.124	0.130	0.179	1.284	0.129	0.184	0.699	3.000	0.171	0.605	3.000	3.000
Pulso 4	Multímetro	0.063	0.065	0.090	0.448	0.086	0.086	0.100	0.582	0.082	0.084	0.093	0.786	0.075	0.079	0.126	1.212	0.080	0.135	0.642	6.271	0.122	0.551	4.856	5.568
	ADC	0.122	0.119	0.096	0.486	0.124	0.125	0.111	0.621	0.131	0.133	0.139	0.823	0.123	0.128	0.171	1.248	0.128	0.182	0.687	3.000	0.171	0.598	3.000	3.000

Na Tabela 2 encontram-se calculadas as diferenças percentuais entre as medições realizadas pelo multímetro digital e pelo sensor.

Tabela 2 – Diferenças percentuais entre os valores medidos pelo multímetro digital e pelo microcontrolador para as diferentes concentrações.

Concentração	Erro %	Referência -Água				0,36 µg/L				0,67 µg/L				5,4 µg/L				40,5 µg/L				350 µg/L			
		Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100	Ganho 0,1	Ganho 1	Ganho 10	Ganho 100
Pulso 1		73%	67%	7%	5%	46%	44%	18%	4%	54%	53%	47%	4%	67%	60%	34%	3%	63%	35%	7%	-	40%	9%	-	-
Pulso 2		82%	76%	9%	6%	59%	52%	19%	5%	56%	52%	48%	5%	65%	60%	34%	3%	60%	35%	7%	-	40%	8%	-	-
Pulso 3		92%	81%	5%	6%	60%	59%	19%	6%	58%	57%	49%	5%	65%	60%	35%	3%	61%	35%	7%	-	40%	9%	-	-
Pulso 4		94%	82%	7%	8%	45%	45%	11%	7%	59%	58%	50%	5%	65%	62%	35%	3%	61%	35%	7%	-	40%	9%	-	-

Analisando e comparando os dados recolhidos, verifica-se que, apesar da leitura recorrendo aos ADCs do microcontrolador apresentar menor resolução, os valores medidos são muito próximos dos medidos com o multímetro digital. Percebe-se que nas diluições de menor concentração, verifica-se uma diferença maior entre os valores medidos recorrendo aos dois métodos. A medição com os ADCs apresenta também uma menor gama de medição, realizando medições apenas desde os 0 até aos 3 V. Para as diluições de maior concentração, quando nos ganhos maiores é retornado um valor de 3 V significa que foi atingido o limite de medição com aquele ganho. Assim sendo, as medições feitas com esse ganho passam a ser desconsideradas, passando a analisar as medições do ganho de valor mais baixo imediatamente a seguir. Embora existam ligeiras diferenças nos valores medidos, com estes resultados percebe-se que os dados das medições podem ser recolhidos com os ADCs sem que existam alterações significativas nos valores medidos.

### 4.3 Construção da estrutura para realizar testes de campo

Uma vez percebido o funcionamento do sistema e feitos alguns testes iniciais, o próximo passo consiste em construir uma estrutura que permita submeter o sensor a testes em ambiente real. A realização de testes de campo é importante para se perceber quais os problemas, falhas e aspetos a melhorar que o sistema apresenta quando colocado em funcionamento em ambiente real. A montagem da estrutura baseou-se na escolha de materiais que sejam resistentes e que facilitem a colocação do sensor a realizar medições, permitindo sobretudo isolar a eletrónica da água do mar.

A base da estrutura é uma caixa estanque de alumínio com tampa de membrana da BOPLA [61]. Esta necessitou de ser devidamente adaptada, sendo-lhe colocada uma estrutura com ferros, para permitir uma fácil instalação e fixação do sensor. Além dessa adaptação foi necessário fazer três furos na tampa da caixa, um para colocar a câmara de medição, um para passar um sensor de temperatura e um final para passar o cabo de dados ligado ao datalogger que fica à superfície. Todos os furos feitos foram devidamente isolados com resina epóxi para garantir que a caixa se mantém a prova de água, sendo colocados buçins nos furos onde se passaram os fios para melhorar o isolamento e evitar a ocorrência de torção dos cabos. Na Figura 4.9 é possível ver a estrutura final com todas as adaptações e com todos os componentes acoplados.

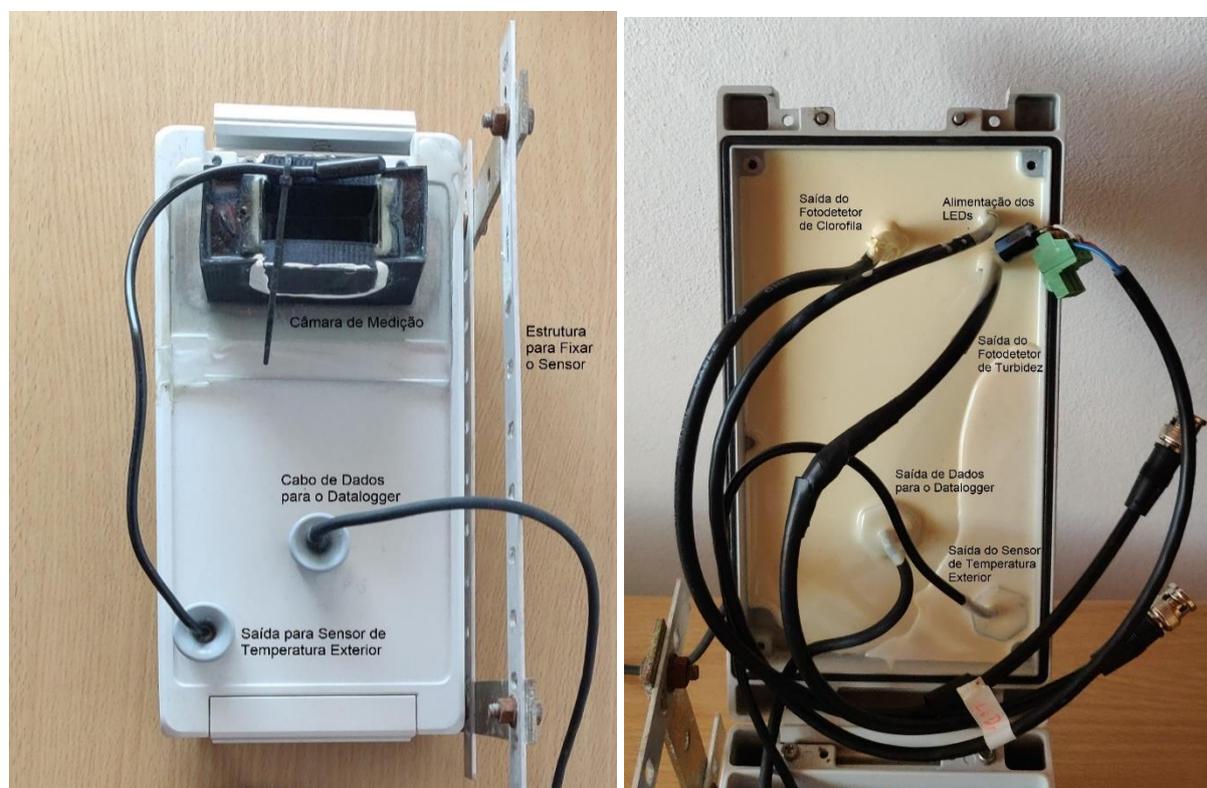


Figura 4.9 – Protótipo construído para a realização de testes.

### 4.3.1 Datalogger

A construção de um datalogger adveio da necessidade de armazenar os dados obtidos ao longo das medições. Este é um sistema separado do restante sensor para facilitar a recolha de dados, ao ser um equipamento individual possibilita que fique à superfície e que os dados possam ser acedidos a qualquer instante sem necessidade de mexer no sensor. Permite ainda a ligação de vários sensores em rede, dado o protocolo utilizado ser RS-485. A comunicação do microcontrolador com o datalogger é feita com um taxa de transmissão definida para 115200 bps, ou seja são transmitidos 115200 bits por segundo. O datalogger recebe a cada ciclo de medição uma trama conforme a Figura 4.10, enviada pelo microcontrolador, com os valores recolhidos à qual acrescenta a data e hora a que foi recebida.

Temperatura da PCB	Luz Ambiente	Turbidez	Clorofila Ganho 0,1	Clorofila Ganho 1	Clorofila Ganho 10	Clorofila Ganho 100	Offset	Carga da Bateria	Temperatura Externa
--------------------	--------------	----------	---------------------	-------------------	--------------------	---------------------	--------	------------------	---------------------

Figura 4.10 - Trama de dados enviada pelo microcontrolador para o datalogger.

Essa trama é de seguida guardada no cartão microSD dentro de um ficheiro de texto intitulado com o dia e mês em que a medição foi realizada. Ao receber a primeira trama do dia é gerado um novo ficheiro para guardar os dados das medições desse dia.

A montagem de um datalogger com estas funcionalidades requer essencialmente três componentes, um relógio de tempo real (RTC), um módulo microSD e um microcontrolador (Figura 4.11). O relógio de tempo real é responsável por fornecer a data e hora para acrescentar à trama de dados, permitindo facilmente identificar posteriormente o exato dia e hora em que as medições foram realizadas. O módulo microSD além de permitir expandir a memória disponível no microcontrolador, aumentado consideravelmente a quantidade de dados que é possível guardar, permite um acesso aos dados recolhidos de forma fácil e rápida. Ao guardar os dados num cartão microSD o seu acesso torna-se muito fácil, basta ler o cartão microSD e em poucos instantes temos acesso a todos os dados recolhidos pelo sensor ao longo do tempo. O microcontrolador utilizado é um arduino nano, representando o elemento-chave do datalogger. Este é o responsável por receber a trama de dados enviada pelo microcontrolador, acrescentar-lhe a data e hora, que vai buscar ao RTC, e por fim guardar essa trama no ficheiro correspondente no cartão microSD.

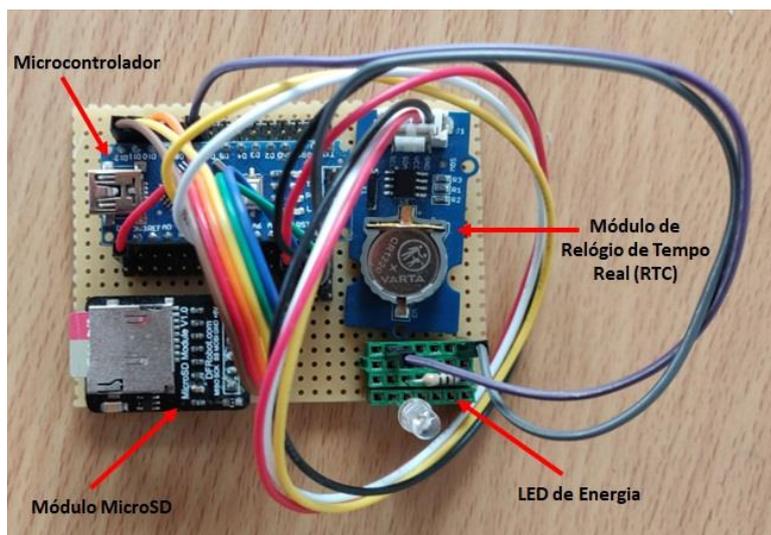


Figura 4.11 – Módulo do datalogger construído.

Este datalogger permite ainda que os dados sejam simultaneamente guardados e apresentados num terminal, permitindo quando possível a monitorização e análise dos valores medidos em tempo real. Como os dados são guardados em ficheiros de texto a sua migração para Excel onde podem ser tratados e analisados é rápida e fácil.

## 4.4 Testes de campo nos laboratórios ECIMAT

A realização de uma calibração do sensor representa a próxima etapa após a construção da estrutura que permite colocar o sensor a fazer medições em ambiente real. Para isso foram realizados um conjunto de testes nos laboratórios CIM\_ECIMAT em Vigo, pertencentes a Universidade de Vigo. Este grupo de testes visou não só a realização da calibração do sensor perante um fluorímetro digital de bancada, como também a perceção das fragilidades e pontos a melhorar, realizando-se testes de temperatura e luz ambiente e um teste de campo onde foram recolhidas medições em mar.

### 4.4.1 Teste de calibração

O teste de calibração foi o principal motivo da deslocação aos laboratórios de Vigo e aproveitando a oportunidade foram realizados dois testes de calibração. A execução de dois testes permite a comparação de resultados e sobretudo a validação dos resultados recolhidos.

Na Figura 4.12 encontra-se uma fotografia do *setup* utilizado para a realização dos testes de calibração.



Figura 4.12 - Bancada de realização dos testes de calibração.

Relativamente aos testes de calibração, o seu processo pode ser dividido em duas etapas. Na primeira são feitas as diluições de onde é retirada uma amostra para medir no fluorímetro e são efetuadas as medições no sensor. Na segunda as amostras retiradas são medidas no fluorímetro digital e o valor medido é convertido em quantidade de clorofila em  $\mu\text{g/L}$ .

#### 4.4.1.1 Etapas do teste de calibração

No que diz respeito às etapas para a realização da calibração do sensor usando o fluorímetro digital, como referido anteriormente, destacam-se duas etapas principais que são realizadas separadamente. Cada uma das etapas pode ser decomposta num conjunto de passos simples, que se repetem para medir cada uma das diluições usadas na calibração do sensor.

Após serem feitas as diluições, a primeira etapa consiste em executar a medição da diluição *in vivo* com o sensor e retirar uma amostra dessa diluição para medir no fluorímetro. Para retirar a amostra deve cumprir-se os seguintes passos:

1. Colocar o filtro no sistema de vácuo;
2. Deitar um pouco da diluição da qual pretendemos fazer a amostra, até que o filtro fique com alguma coloração. Para cada amostra deve ser anotada qual a quantidade de diluição que foi usada;
3. Filtrar, utilizando o sistema de vácuo;
4. Retirar o filtro e colocar num frasco de amostra;
5. Juntar 5 ml de acetona para extrair a clorofila;
6. Colocar na câmara frigorífica durante toda a noite a 5 °C.

Na realização dos testes de calibração primeiro era retirada a amostra e logo a seguir era feita a medição com o sensor. Tentando garantir que quer o fluorímetro, quer o sensor, mediam a solução sem variação do valor de concentração. Na Figura 4.13 encontra-se o material utilizado na realização dos testes.

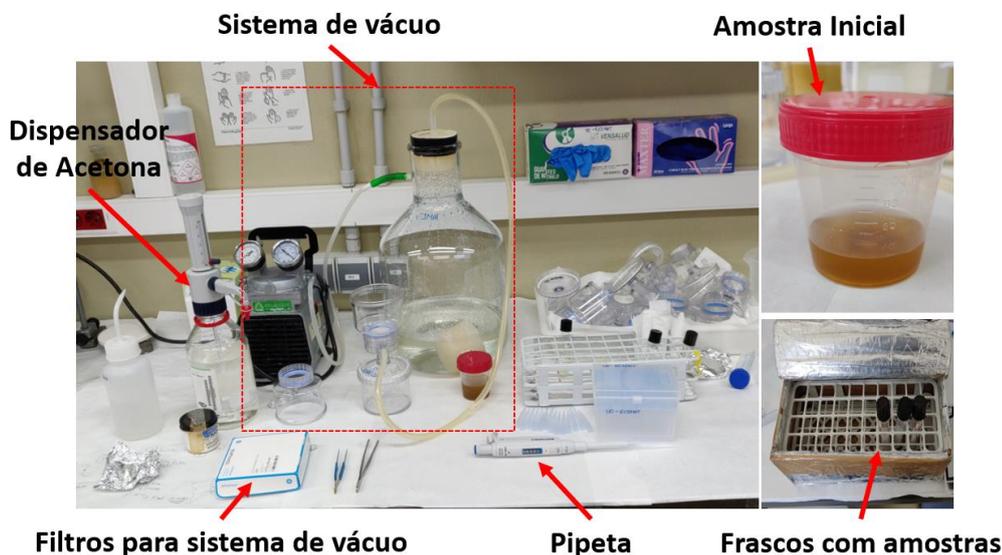


Figura 4.13 - Material utilizado na primeira fase do teste de calibração.

A segunda etapa consiste basicamente em realizar as medições no fluorímetro digital das amostras recolhidas, devendo ser seguidos os seguintes passos:

1. Retirar as amostras da câmara frigorífica, ligar o fluorímetro e configurá-lo para leitura de clorofila (Chl-Na -> Measure Fluorescence RAW);
2. Medir em primeiro lugar o valor da acetona, que terá de ser subtraído em todas as medições;
3. Medir as amostras, medindo sempre da menor para a maior concentração (para evitar contaminações);
  - Deitar um pouco da próxima amostra a medir no tubo de leitura e enxaguar, para lavar o tubo com a amostra a medir e “descontaminar” da amostra anterior;
  - Deitar o resto no tubo de leitura e colocar no fluorímetro;
4. Realizar a medição e retirar os valores;
5. Converter os resultados dados em quantidade de clorofila em  $\mu\text{g/L}$ , utilizando a fórmula visível na Figura 4.14, onde se pode ver também o fluorímetro utilizado nos testes.

Analisando as variáveis que constituem a fórmula podemos concluir que “Fluorescencia” é a fluorescência na amostra medida pelo fluorímetro, “Blanco” é a fluorescência medida na acetona pelo

fluorímetro, “Vol acet (ml)” é o volume em ml de acetona adicionada a cada amostra, no caso 5 ml e “Vol filtr (ml)” é o volume em ml de amostra utilizada no processo de filtragem da solução.



Figura 4.14 – Etapas da segunda fase do teste de calibração.

Este conjunto de passos representam as instruções a seguir para se poder realizar medições do valor de clorofila com o fluorímetro digital disponível no laboratório.

#### 4.4.1.2 Resultados

Retirados os resultados das medições quer com o sensor, quer com o fluorímetro, é possível de comparar os dados recolhidos. Observando os resultados do primeiro teste de calibração realizado, verifica-se que a resposta do sensor em função da resposta do fluorímetro é bastante satisfatória. A concentração de clorofila de 0,001 representa a referência (ausência de clorofila), que dado o valor ser 0 não é possível representar na escala logarítmica. Tendo em conta a evolução dos valores medidos em cada um dos quatro ganhos em função do correspondente valor em µg/L medido pelo fluorímetro (Figura 4.15), constata-se uma resposta que pode ser traduzida em retas de calibração.

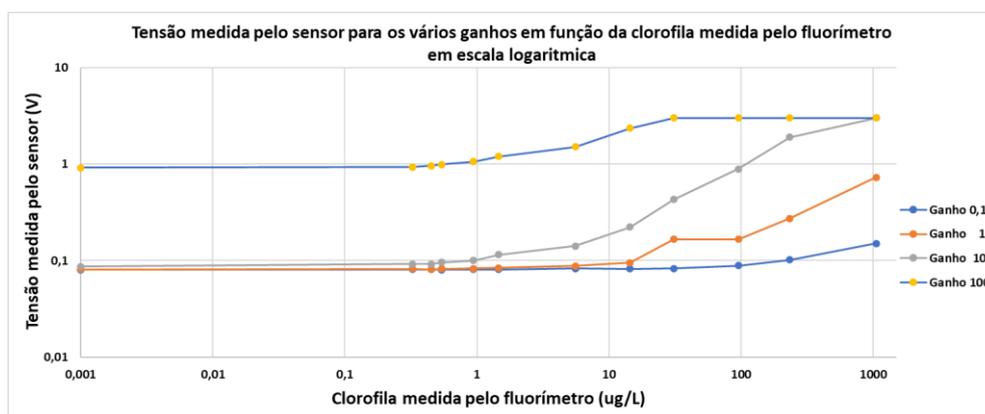


Figura 4.15 - Evolução dos vários ganhos do sensor em função da clorofila medida pelo fluorímetro.

Da análise do gráfico compreende-se que os ganhos mais baixos, nomeadamente o ganho 0,1 e o ganho 1, tem medições pouco precisas para as baixas concentrações medidas. Como tal os ganhos 10 e 100 serão analisados mais em pormenor uma vez que ao contrário dos outros dois apresentam uma boa resposta para baixas concentrações. O valor da referência foi retirado de cada medida, obtendo-se os gráficos a seguir, com as respetivas equações de calibração (Figura 4.16 e Figura 4.17).

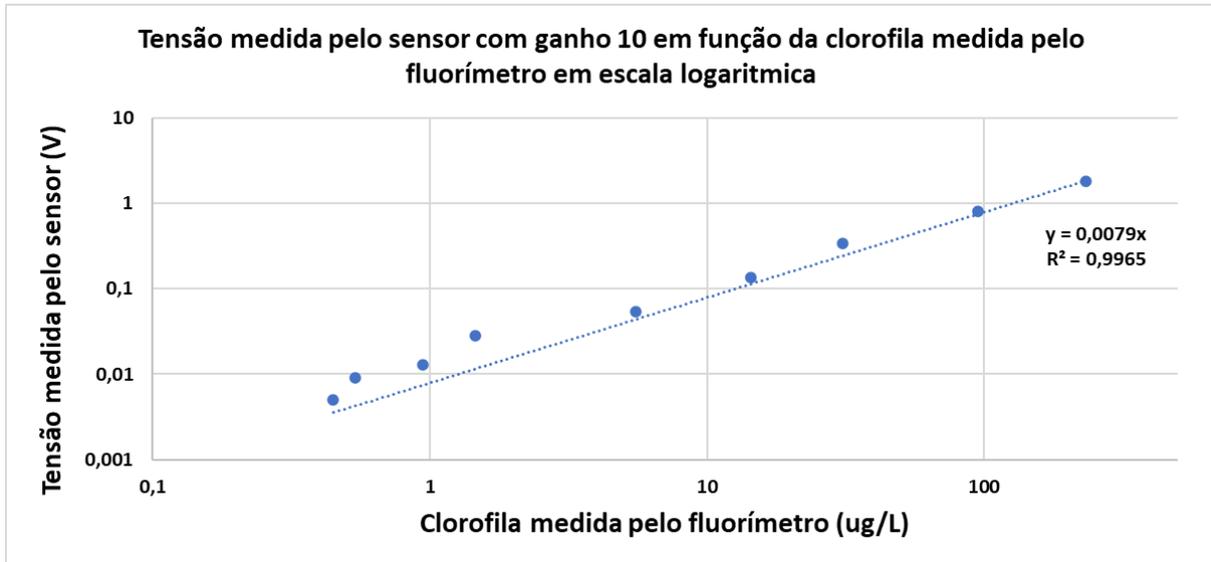


Figura 4.16 - Retas de calibração obtida do ganho 10, primeiro teste.

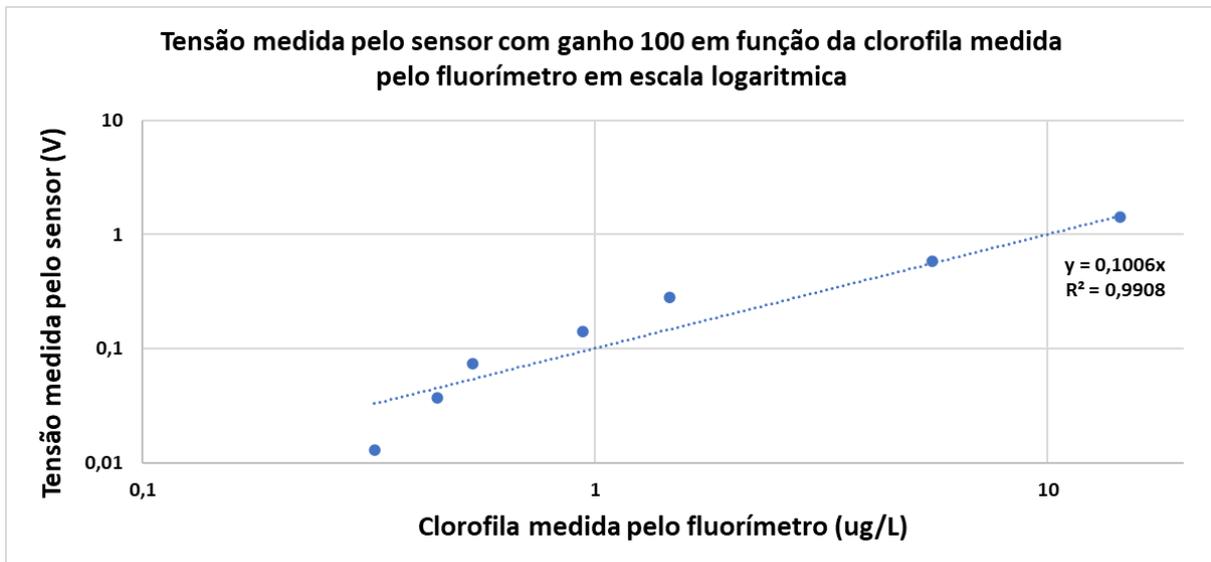


Figura 4.17 - Retas de calibração obtida do ganho 100, primeiro teste.

Do estudo dos gráficos com as retas de calibração para os ganhos 10 e 100 percebe-se que a resposta não é uma reta perfeita, provavelmente devido a erros de medida, contudo a resposta do sensor apresenta uma relação linear com a resposta do fluorímetro, o que para um primeiro teste é bastante satisfatório. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é de 0,99.

Apesar da boa resposta, como se pode verificar pelos resultados obtidos, neste teste de calibração foram medidos poucos pontos. Para colmatar essa lacuna e obter uma reta de calibração mais parecida com a verdadeira resposta do sensor foi feito um novo teste de calibração.

Na realização do segundo teste, para além do aumento do número de diluições medidas, tentou-se realizar todo o processo com maior rigor que no primeiro teste. Mais medições realizadas resultam em mais pontos para traçar as retas de calibração do sensor, obtendo-se dessa forma resultados mais completos. Nos gráficos seguintes apresentam-se as retas de calibração do sensor, traçadas com os dados recolhidos no segundo teste (Figura 4.18 e Figura 4.19).

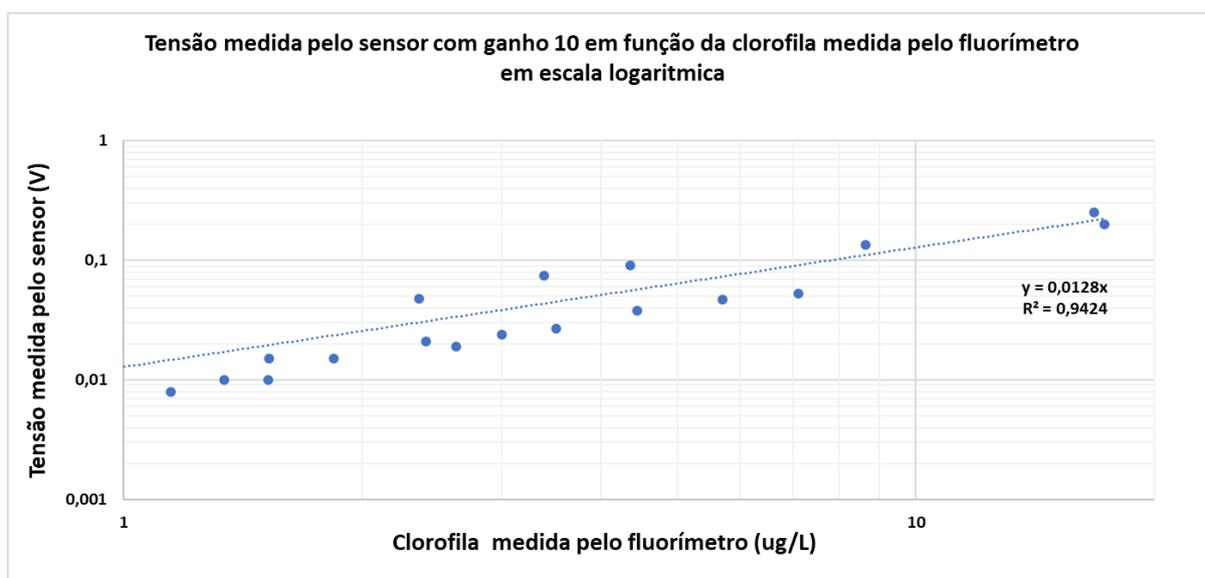


Figura 4.18 - Reta de calibração obtida do ganho 10, segundo teste.

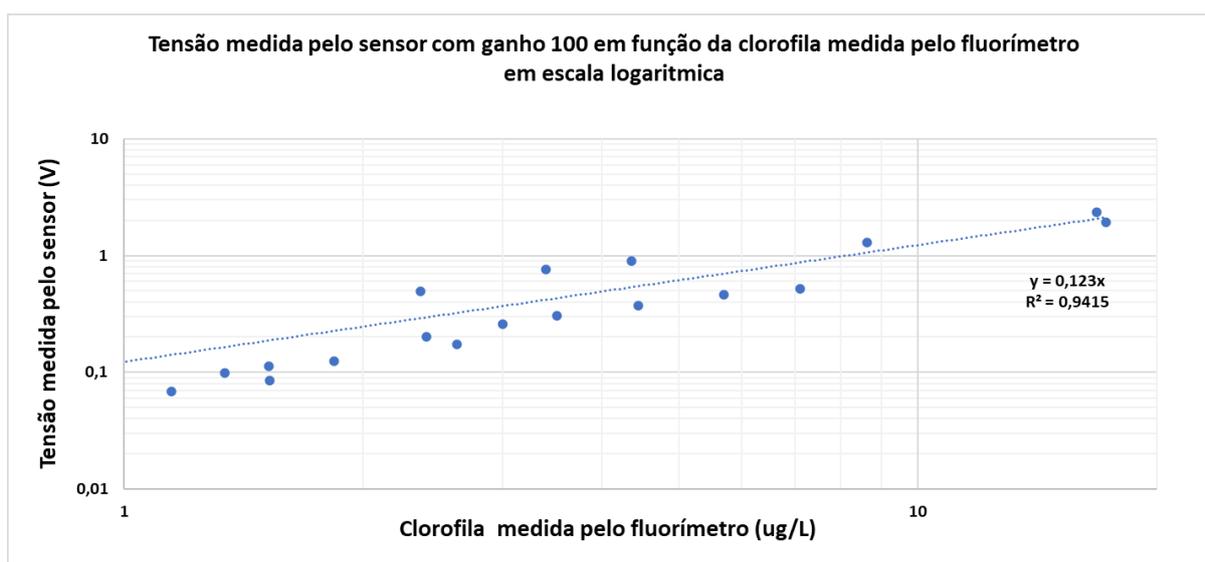


Figura 4.19 - Reta de calibração obtida do ganho 100, segundo teste.

Dos resultados obtidos neste segundo teste de calibração verifica-se que a resposta do sensor quando comparado com a do fluorímetro continua bastante satisfatória. Todavia, o  $R^2$  baixou de 0,99

para 0,94, o que representa um maior desvio entre as medições feitas pelo sensor e pelo fluorímetro, tendo-se verificado também uma ligeira alteração no declive da reta.

Como neste teste se tentou ter um maior rigor, o valor de referência foi sendo medido ao longo do teste com alguma frequência. Dessa forma a atenuação das medições em função da referência pode ser feita sempre com valores o mais reais possível, realizando-se assim um ajuste mais preciso para os valores reais medidos pelo sensor.

Das várias medições da referência resultou um gráfico que mostra a sua evolução ao longo do teste de calibração (Figura 4.20).

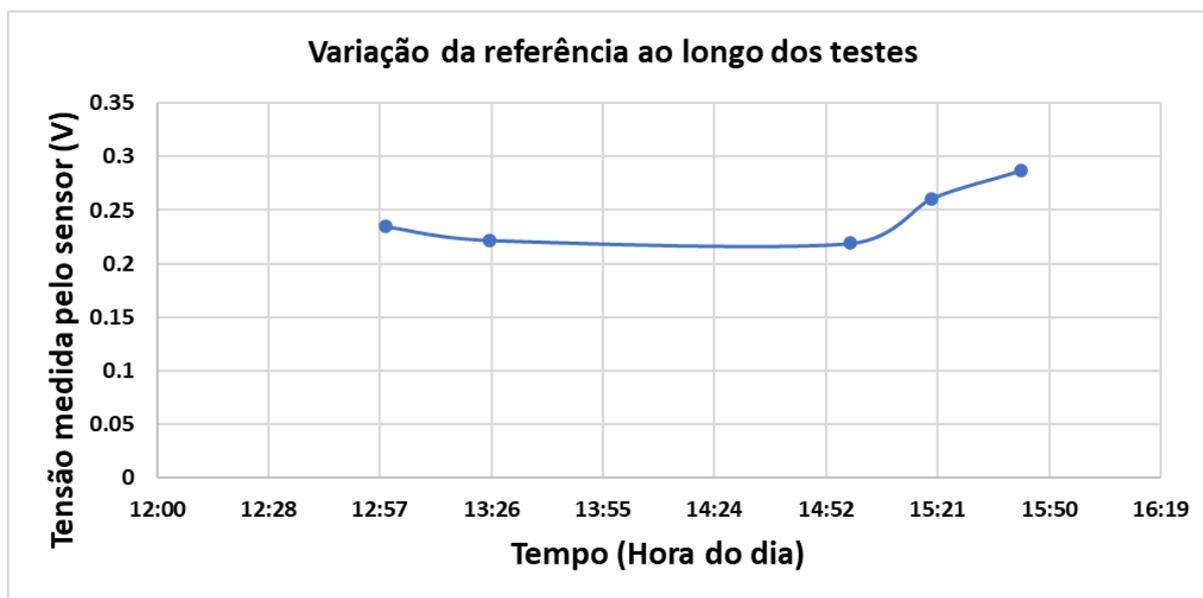


Figura 4.20 - Evolução da referência ao longo do segundo teste de calibração.

Com a realização destes dois testes de calibração torna-se possível, utilizando o declive das retas obtidas, fazer a conversão das medições em Volts do sensor para  $\mu\text{g/L}$  de concentração de clorofila.

#### 4.4.2 Teste de mar

No que diz respeito a testes do sensor em mar foi realizado um teste durante cerca de cem minutos. Neste teste o sensor foi colocado voltado para baixo (evitando a luz solar direta), preso a um dos pesos de uma plataforma flutuante, conforme a Figura 4.21.



Figura 4.21 - Condições de realização do teste de mar.

Este foi o primeiro teste do sensor em ambiente real, mar, com os sistemas de medição (ADCs) a funcionar corretamente e permitindo obter valores. Os resultados estão apresentados na Figura 4.22.

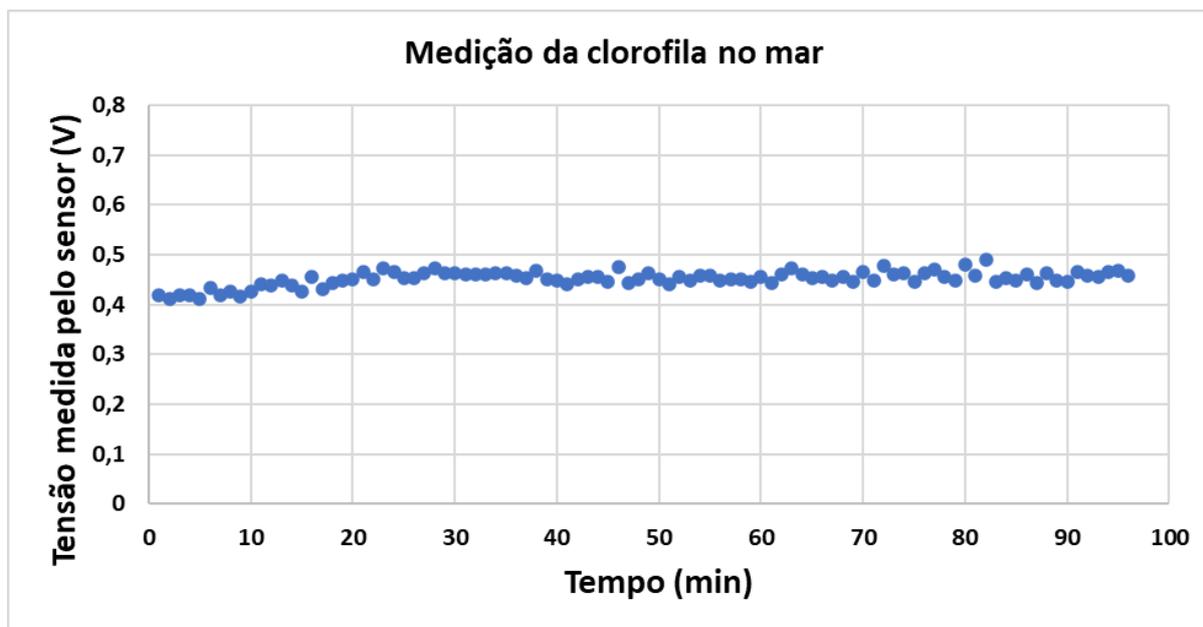


Figura 4.22 – Valores de clorofila, em tensão, medidos pelo sensor no mar, utilizando um ganho de 100.

Dos resultados obtidos verifica-se que a resposta do sensor é estável. Tendo em conta o pouco tempo de realização do teste a concentração de fitoplâncton no mar não poderia oscilar muito, o que confirma e valida de certo ponto os resultados das medições feitas pelo sensor.

Outro método de confirmação utilizado foi retirar uma amostra da água do mar durante o tempo de teste, que foi depois medida no fluorímetro digital. Com o valor da amostra medido no fluorímetro e uma vez feita a calibração do sensor, verificou-se que o valor apresentado pelo sensor durante as

medições em mar correspondia à concentração de clorofila medido pelo fluorímetro, de cerca de 2,7  $\mu\text{g/L}$ , após retirado o offset de uma leitura de referência (Figura 4.23).

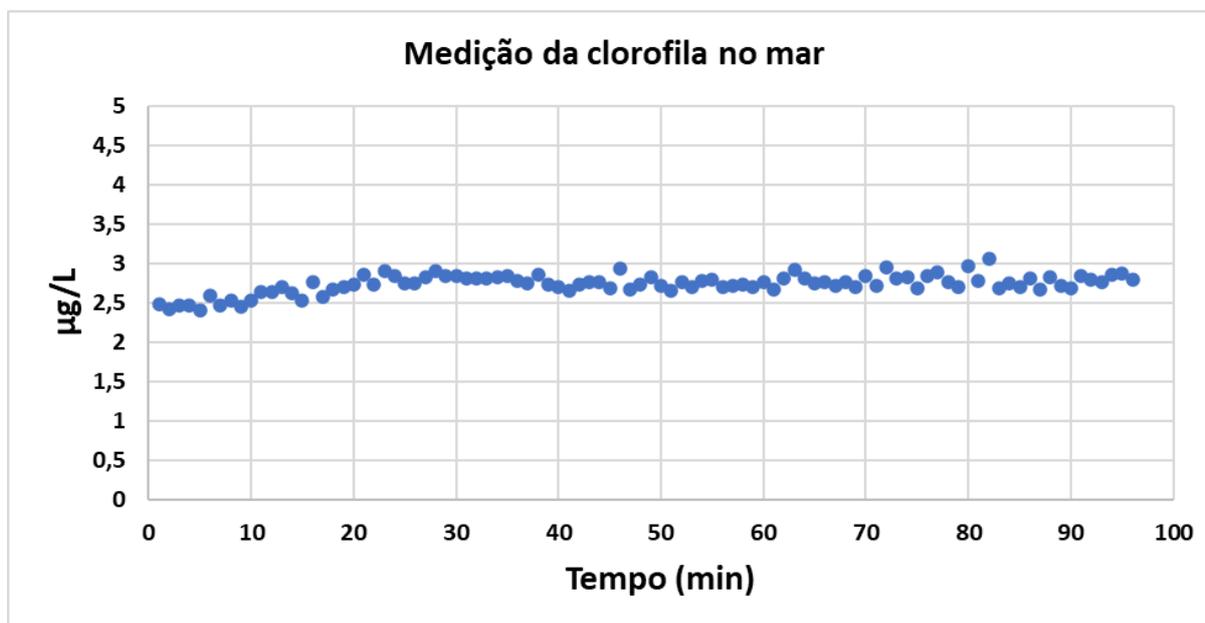


Figura 4.23 - Valores de clorofila, em  $\mu\text{g/L}$ , medidos pelo sensor no mar, utilizando um ganho de 100.

#### 4.4.3 Testes de temperatura

Ao longo dos testes percebeu-se que a variação da temperatura poderia afetar a resposta do sensor e conseqüentemente nas medições de clorofila. Para tentar perceber quais os efeitos da temperatura realizaram-se três testes.

Os dois primeiros visaram perceber qual a influência da temperatura quer na caixa do sensor (fotodetector e *LEDs*) quer na placa de eletrónica (*lock-in* e microcontrolador). Já o terceiro teste teve como objetivo perceber como responde o sensor tanto em aumentos como diminuições da temperatura da água onde está inserido. Os três testes foram feitos utilizando a mesma diluição, água do mar filtrada. Como a quantidade de clorofila presente na água filtrada é muito baixa, só no maior ganho é que se notam alterações nas medições. Por isso só são apresentados resultados para o ganho 100.

Para ter a certeza de que os valores de temperatura medidos pela eletrónica do sensor eram corretos, uma vez que a sua medição nunca tinha sido devidamente calibrada, a temperatura foi também monitorizada ao longo dos testes com um termómetro. Verificou-se que o sensor interno e o termómetro eram idênticas, pelo que posteriormente consideraram-se apenas as medições do sensor.

#### 4.4.3.1 Variação de temperatura na caixa do sensor/fotodetector/LEDs

Este teste foi realizado aproveitando a câmara de 5 °C disponível no laboratório. Durante algum tempo, o sensor sem a placa de eletrónica foi colocado na câmara frigorífica para baixar a sua temperatura. Após a caixa ficar a uma temperatura próxima de 5 °C, retirou-se da câmara e iniciaram-se as medições utilizando como diluição água do mar filtrada (referência). Os valores medidos pelo sensor à medida que a temperatura subia até à temperatura ambiente estão exibidos em forma de gráfico na Figura 4.24. Os circuitos eletrónicos foram mantidos no exterior da caixa, à temperatura ambiente.

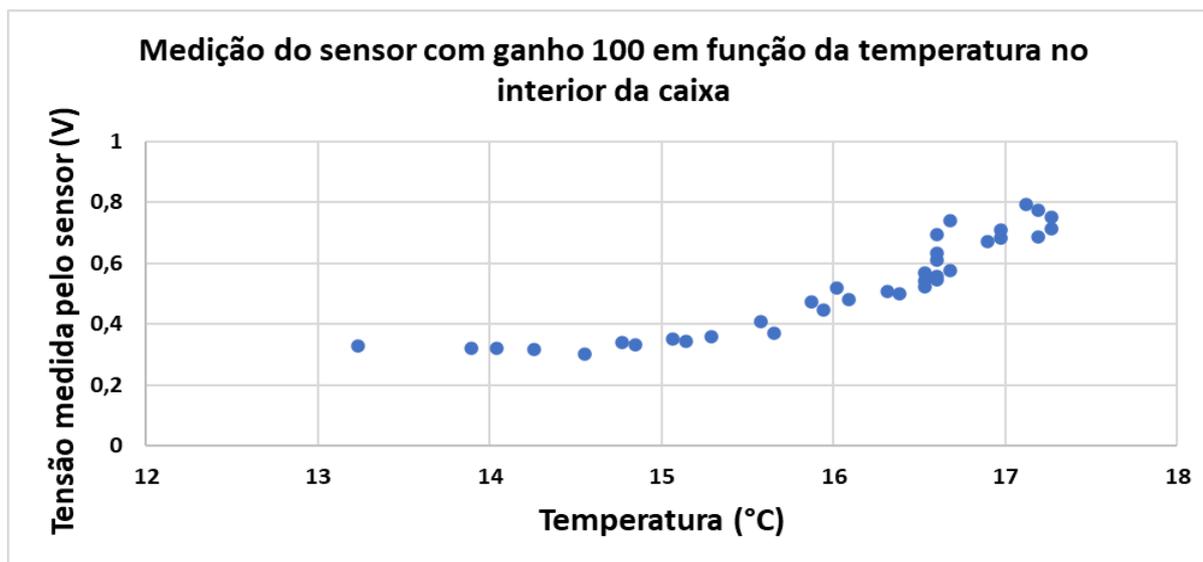


Figura 4.24 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da temperatura da caixa que envolve o sensor.

Observando o gráfico obtido é possível perceber que à medida que a temperatura sobe, aproximando-se da temperatura ambiente, o valor medido pelo sensor para a mesma solução vai aumentando. Este comportamento era expectável, dado os fotodíodos serem sensíveis à temperatura, ao utilizarem semicondutores

#### 4.4.3.2 Variação da temperatura na placa de eletrónica

Este teste foi feito de forma muito semelhante ao anterior, contudo desta vez foi colocada a arrefecer apenas a placa de eletrónica, sendo a câmara com o sensor mantida à temperatura ambiente.

Como o sensor de temperatura já implementado se encontra na placa de eletrónica, neste teste as medições de temperatura são mais precisas. Dessa forma, os valores de temperatura iniciais são mais baixos quando comparado com os valores do teste anterior. Os resultados encontram-se representados na Figura 4.25.

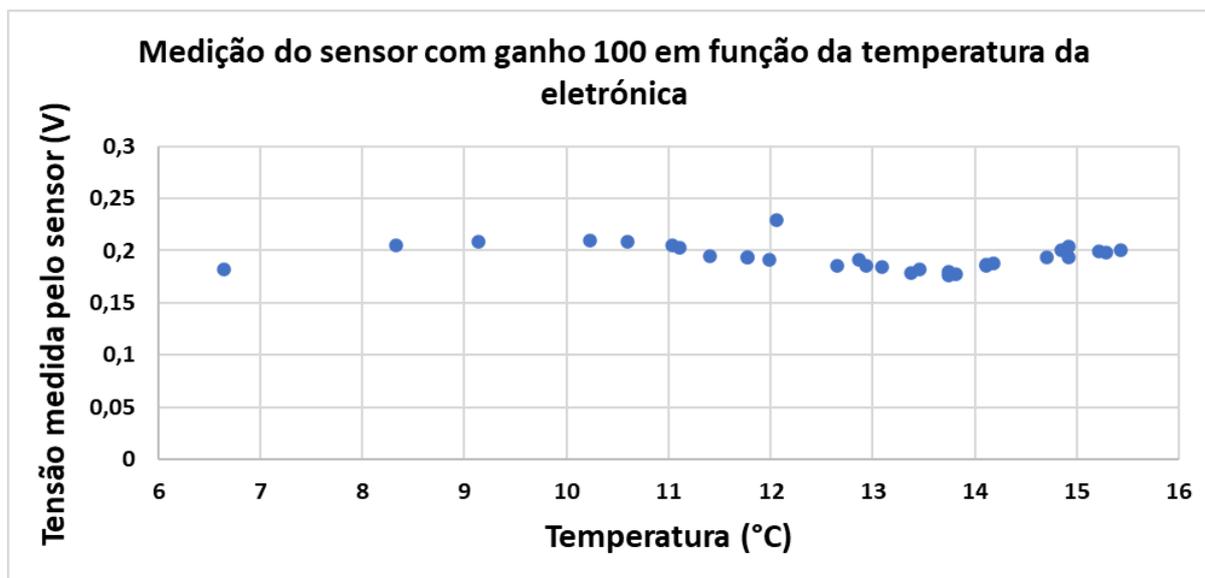


Figura 4.25 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da temperatura da placa de eletrônica.

Examinando os resultados obtidos, verifica-se que a variação de temperatura sobre a placa de eletrônica aparenta não ter um efeito muito expressivo nas medições efetuadas pelo sensor. Todavia, existem ligeiras oscilações nos valores medidos, o que pode demonstrar a existência de um efeito sobre as medições realizadas.

#### 4.4.3.3 Variação da temperatura da água com o sensor submerso

A realização do terceiro teste consistiu em colocar água do mar filtrada a arrefecer na câmara de -20 °C até atingir a temperatura de 6 °C. Atingida essa temperatura retirou-se a água da câmara frigorífica e submergiu-se nela o sensor, iniciando-se assim as medições. O objetivo deste teste foi verificar as influências na resposta do sensor ao aumento e diminuição da temperatura da água onde se encontra submerso. A temperatura da água foi sendo constantemente monitorizada recorrendo a um termómetro.

Na tentativa evitar interferências extra, como o caso da luz ambiente, o teste foi realizado com o sensor completamente tapado. As condições de realização do teste e os resultados obtidos com ao longo da variação da temperatura da água são apresentados respetivamente nas Figura 4.26 e Figura 4.27.



Figura 4.26 - Condições de realização do teste de variação de temperatura.

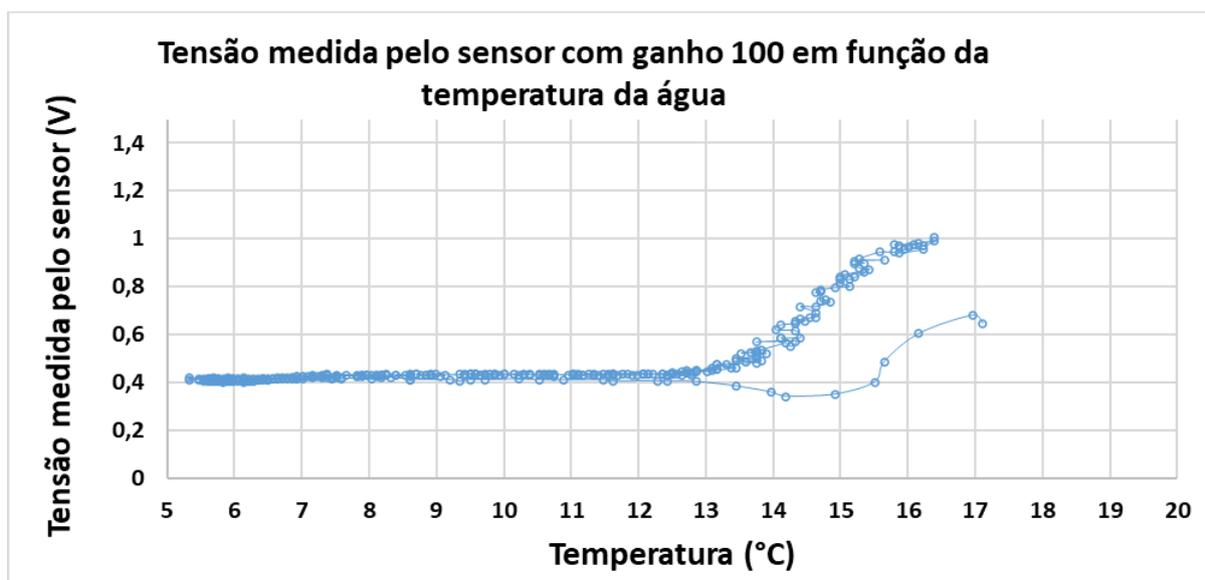


Figura 4.27 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da temperatura da placa de eletrónica.

Estudando a resposta do sensor percebe-se que a partir dos 13 °C à medida que a temperatura da água aumentava, a tensão medida pelo sensor também aumentava consideravelmente. Este teste não é, no entanto, totalmente coerente com a variação encontrada no teste da Figura 4.24, onde se verificou uma dependência das leituras do sensor apenas com a temperatura da câmara (leds e fotodiodos) com comportamento ligeiramente diferente. Neste teste verifica-se aumento da tensão a partir do 13 °C, no anterior a partir dos 15°C. Esta diferença pode estar relacionada com a inercia térmica do sistema e o local onde são realizadas as medições.

No gráfico da Figura 4.28, é possível comprovar que os esforços para anular a interferência da luz ambiente foram conseguidos. Verifica-se que as medições da luz ambiente se mantiveram a zero de forma constante. Esta anulação era importante dado que o teste foi realizado no exterior do laboratório.

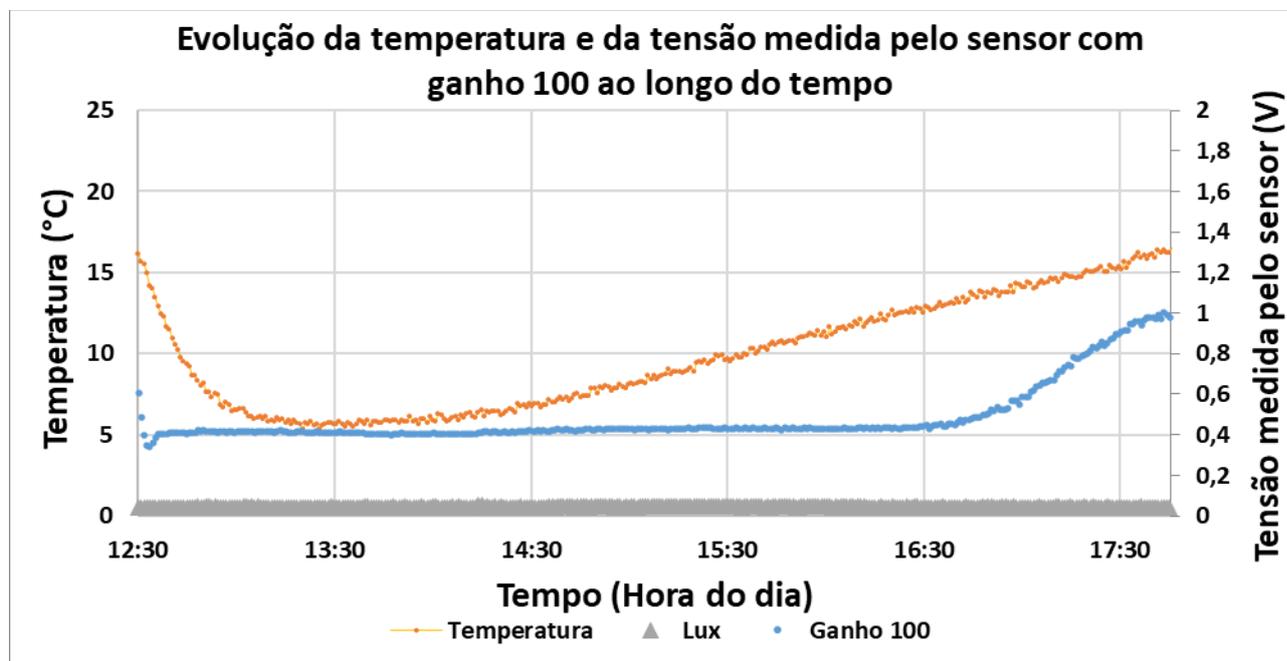


Figura 4.28 - Evolução da medição do sensor com ganho 100, da temperatura e da luminosidade ao longo do teste realizado.

Considerando os três testes com variações de temperatura realizados é possível depreender que a temperatura tem influência no valor de clorofila medido pelo sensor. Desse forma, será necessário estudar quais os componentes ou partes do sensor que são mais sensíveis às variações de temperatura, de forma a encontrar maneira de compensar os efeitos da temperatura.

#### 4.4.4 Teste luz ambiente

Na tentativa de inferir qual o efeito da luz ambiente nas medições do valor de clorofila, foi realizado um teste em que o sensor foi deixado, num recipiente no exterior do laboratório, submerso em água do mar filtrada a medir desde o final do dia até à manhã seguinte. Com um teste desta duração, que apanha o pôr e nascer do sol, é possível ter uma primeira noção dos efeitos que a incidência direta de luz ambiente pode ter nas medições realizadas pelo sensor. Nas Figura 4.29 e Figura 4.30 encontra-se a evolução da luz ambiente e da tensão medida pelo sensor bem como a tensão medida em função da luz ambiente, onde a tensão medida pelo sensor representa a medição de concentração de clorofila.

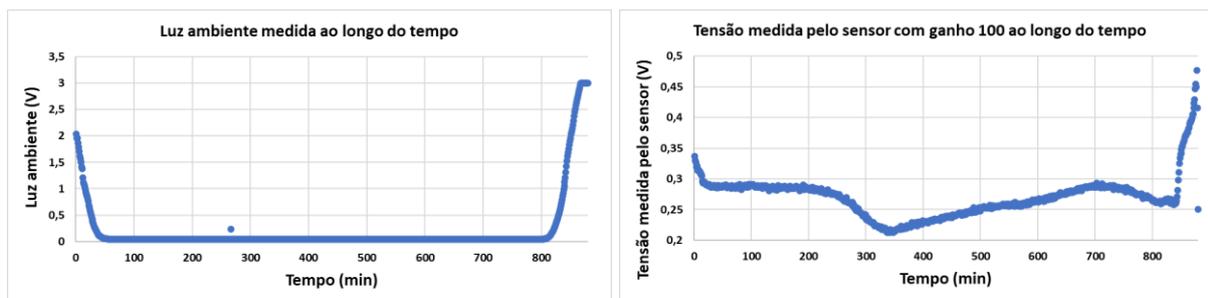


Figura 4.29 – Evolução da luz ambiente e da tensão medida pelo sensor ao longo do tempo.

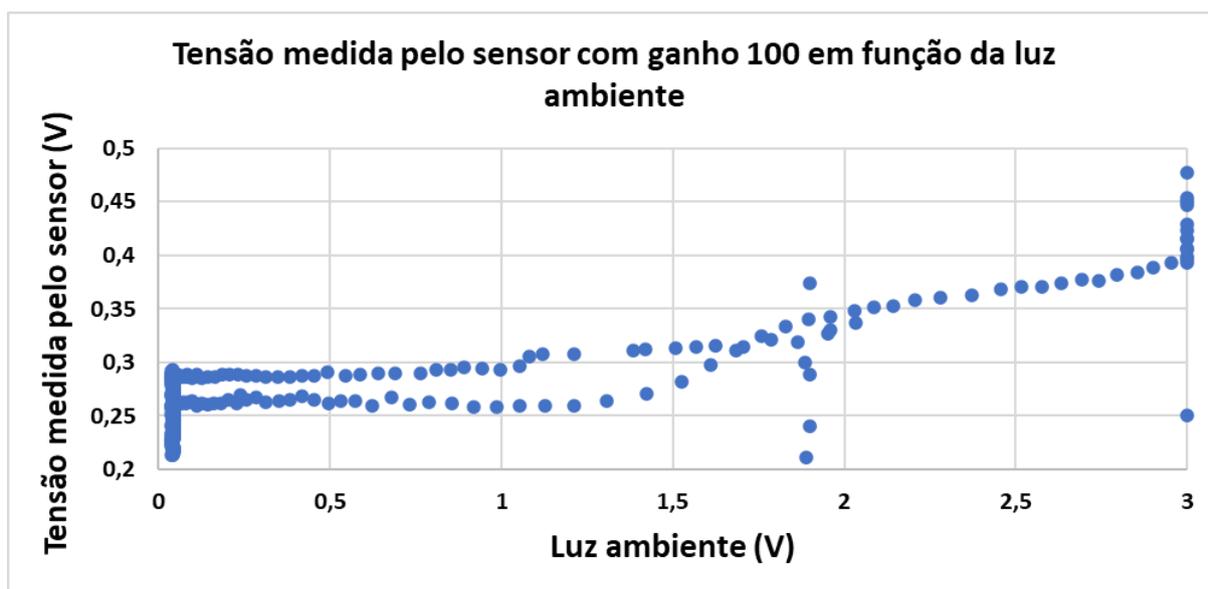


Figura 4.30 - Tensão medida pelo sensor com ganho 100 em função da luz ambiente.

Gerando um gráfico com os valores recolhidos ao longo do teste, parece ser obtida uma curva em histerese, onde a parte superior representa os valores da diminuição da luz ambiente e a inferior representa o nascer do sol. Isto significa que os resultados podem diferir para o aumento e diminuição da luz ambiente, não havendo, no entanto, informação suficiente para fundamentar esta observação.

#### 4.4.5 Teste de medição da referência durante a noite

Para validar a consistência das medições realizadas pelo sensor, este foi deixado durante uma noite a medir a mesma solução, água do mar filtrada corrente. O teste foi realizado no laboratório recorrendo a um dos tanques disponíveis e na tentativa de os resultados serem o mais reais possível, tentou-se evitar todas as interferências possíveis. Para evitar grandes oscilações na temperatura a solução medida é água corrente filtrada, para evitar a luz ambiente o sensor foi completamente tapado. As condições do teste são visíveis na seguinte Figura 4.31.



Figura 4.31 - Condições do teste de medição continua da referência.

Verificando a evolução dos resultados ao longo do tempo, onde seria expectável uma tensão constante, foi detetada outra variável que influencia as medições do sensor. A curva apresentada é similar à descarga de uma bateria (Figura 4.32). Com alguns testes com uma fonte de tensão ajustável, constatou-se que a tensão da bateria (que reflete a carga da bateria) também altera as medições realizadas. Como a bateria ficou completamente sem carga durante o teste, pode concluir-se que, a descida abrupta da tensão medida pelo sensor representa a fase final da carga da bateria que alimenta o sensor.

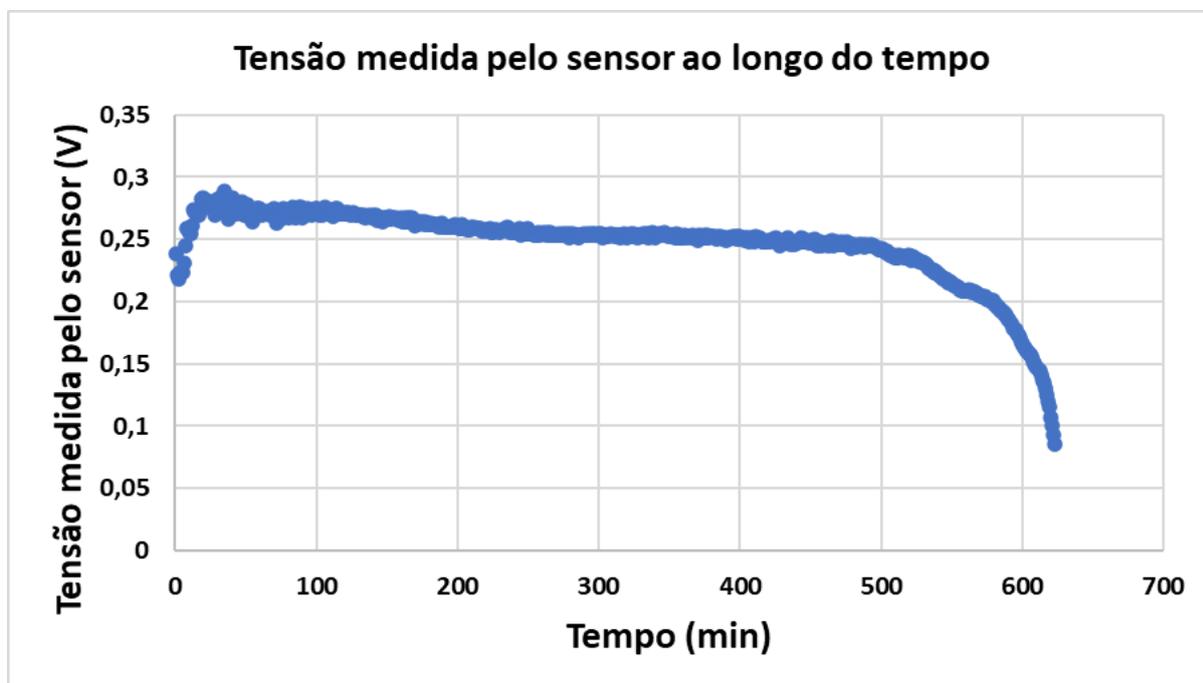


Figura 4.32 - Tensão medida pelo sensor ao longo da noite.

Após análise do circuito, os resultados obtidos podem dever-se ao facto de que com menos tensão fornecida aos *LEDs* menor será a sua luz emitida e, conseqüentemente menor a excitação que

estes provocam na clorofila. Estes resultados fazem com que seja necessário a realização de novos testes dedicados a analisar e confirmar se a carga da bateria provoca alterações nas medições, e como corrigir esta dependência

#### **4.4.6 Problemas encontrados e melhorias a implementar**

Com os testes realizados é possível retirar algumas conclusões sobre os problemas encontrados e a necessidade de realizar melhorias e novos testes. Essas conclusões encontram-se sistematizadas nos seguintes tópicos:

- A necessidade de realizar novos testes relativos à temperatura para descobrir como esta dependência pode ser atenuada;
- Durante os testes constatou-se que o sensor responsável por medir a turbidez não funcionava corretamente, sendo necessário perceber o motivo, corrigir e realizar a respetiva calibração deste sensor;
- Relativamente ao efeito da luz ambiente é necessário realizar novos testes que mostrem qual o seu real impacto e como pode ser atenuado ou corrigido;
- Verificar se a carga da bateria tem efeitos sobre as medições do sensor, e caso existam efeitos perceber como os corrigir;
- No caso do *offset*, a sua fácil variação através do potenciômetro mostrou ser algo que pode não ser vantajoso. Isto porque pode variar de forma involuntária como ocorreu no primeiro teste realizado, introduzindo variações indesejáveis nos resultados dos testes. Uma das soluções, que foi já implementada, é a fixação do valor de *offset* de forma física;
- Percebeu-se durante a realização dos testes que a monitorização continua da bateria pode ser algo vantajoso. Dessa forma, torna-se mais fácil perceber qual o estado da alimentação do sensor e pode evitar-se deslocações desnecessárias;
- Uma nova funcionalidade que se percebeu que pode ser útil implementar é a monitorização da temperatura da água exterior ao sensor, que determina a temperatura da câmara de leitura.

Estes tópicos resumem de forma simples os problemas encontrados ao longo dos testes realizados, bem como as novas funcionalidades a serem implementadas para melhorar o desempenho do sensor.

# Capítulo 5

## Otimizações e validações

### 5.1 Dependência com a temperatura

A variação da temperatura representa uma das variáveis que tem efeito sobre as medições realizadas pelo sensor. Tendo em vista esse efeito foram realizadas algumas alterações no sensor para corrigir a sua influência, sendo posteriormente testadas e validadas as alterações.

#### 5.1.1 Implementação de medição da temperatura exterior

De forma a facilitar os testes para verificar os efeitos das variações de temperatura e mesmo para permitir uma medição de dados mais completa, foi implementado um sensor de temperatura na parte exterior da caixa do sensor, Figura 5.1.

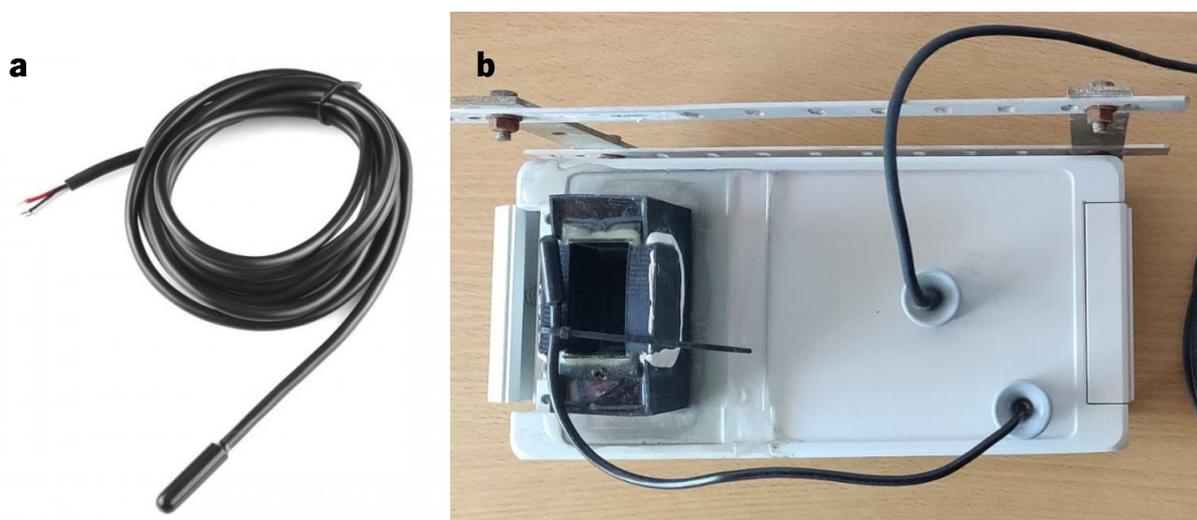


Figura 5.1 – Sensor DS18B20 usado, a). Estrutura do sensor com o sensor de temperatura acoplado na camara de medição, b).

O sensor de temperatura utilizado é o DS18B20, que como já vem encapsulado pode ser logo implementado e utilizado, sendo completamente à prova de água. Este sensor é de fácil utilização, possui

apenas três pinos e necessitando apenas de um circuito simples para ser colocado em funcionamento. O esquemático da sua montagem encontra-se na representado na Figura 5.2.

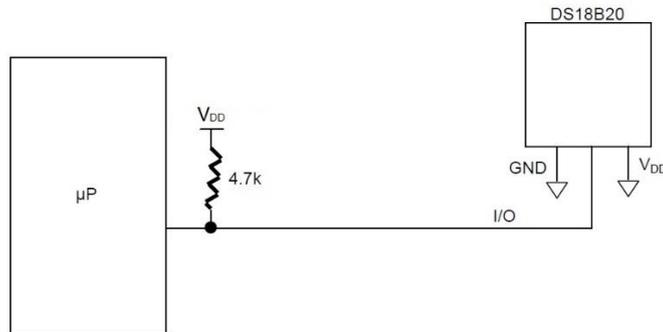
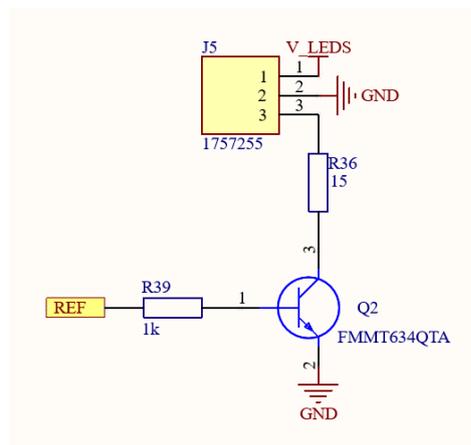


Figura 5.2 - Esquemático de montagem do sensor de temperatura.

O valor medido pelo sensor de temperatura é lido e processado pelo microcontrolador, que após ser convertido em graus Celsius é acrescentado à trama de dados correspondente ao ciclo de medição em curso. A influência da temperatura da água nas medições pode assim ser corrigida.

### 5.1.2 Análise e correção

Realizando uma análise a sensibilidade do hardware do sensor à temperatura percebeu-se que a corrente nos LEDs é exponencialmente dependente da temperatura, devido ao facto do transistor estar a funcionar na zona ativa, inicialmente pensado para que a corrente de alimentação fosse o mais sinusoidal possível.



Atendendo a que na zona ativa:

$$I_{LED} = I_c = hFE * I_b \quad (1)$$

$$I_b = \frac{(V_{REF} - V_d)}{R_{39}} \quad (2)$$

Sendo que:

- $V_d$  é a tensão direta do diodo que varia 2 mV com cada grau, não interfere significativamente, dado  $V_{REF}$  ser um valor do DAC que chega a 3.3V.
- hFE é o ganho típico que varia muito com a temperatura, Figura 5.3. Mais temperatura, mais ganho, mais luz nos leds.

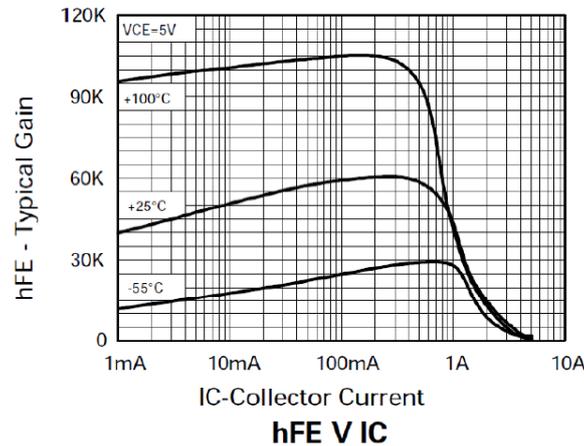


Figura 5.3 – Gráfico da variação do ganho típico do transistor em função da temperatura, retirado do datasheet.

A solução passa por alterar a resistência R39, para que o transistor passe a funcionar em saturação, não dependendo de hFE. Sendo também necessário ajustar no software o array a partir do qual é gerada a onda de referência,  $V_{ref}$ , para que o duty-cycle não fique muito grande, ou seja, o led passa a estar quase sempre ligado (Figura 5.4 e Figura 5.5).

Com estas alterações a corrente nos LEDs será:

$$I_{LED} = \frac{(V_{LEDs} - V_{led} - V_{CE})}{R_{36}} \quad (3)$$

- Em que  $V_{led}$  é a tensão direta nos leds, e  $V_{CE}$  a tensão coletor emissor em saturação.

Realizando as alterações descritas acima, a resistência R39 passa a ter um valor de 10 kΩ e a forma da onda de referência deixa de ser sinusoidal e passa a ser quadrada.

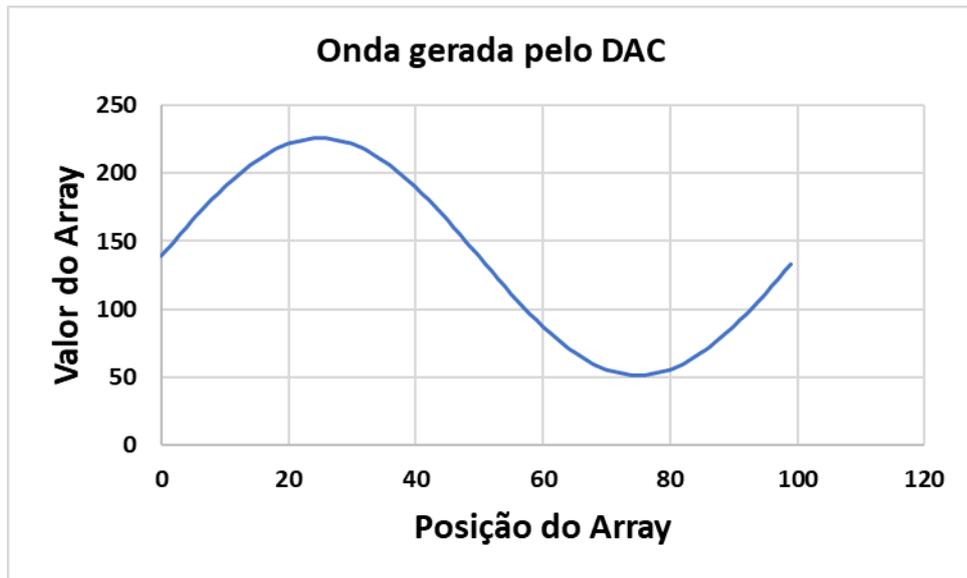


Figura 5.4 - Onda inicialmente gerada pelo DAC.

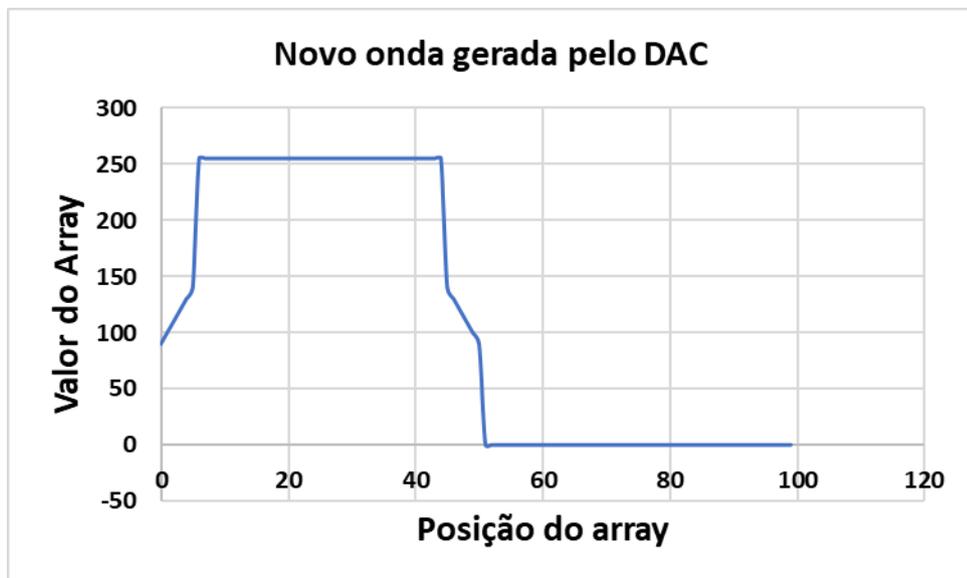


Figura 5.5 - Onda atualmente gerada pelo DAC.

Com o atual array para gerar a onda de referência passou-se a garantir que os LEDs funcionam com um duty-cycle de 50%. Um dos aspetos que foi necessário ter em conta com a alteração do duty-cycle foi o momento de entrada do transistor em saturação. Para que essa entrada não ocorresse de forma brusca, foram definidos pequenos incrementos na zona de transição (nas posições do array 0-5 e 45-50).

### 5.1.3 Teste e validação

Uma vez realizadas as alterações, foram realizados testes para verificar se o problema estava corrigido. Esses testes foram realizados com o sensor submerso num aquário onde a água se encontrava

em circulação através duma bomba, evitando deposição da clorofila e consequentes alterações nos valores medidos. Esse aquário foi colocado numa arca frigorífica para arrefecer a água até uma temperatura de cerca de 7°C. Atingida essa temperatura retirou-se o aquário da arca deixando a água aquecer até à temperatura ambiente, repetindo-se a seguir uma vez mais o processo de arrefecer. O ciclo de subida e descida da temperatura eliminam o efeito da inercia térmica, dado não se esperar histerese. As variações de temperatura ao longo do teste, bem como os resultados das medições de clorofila, são apresentados nos gráficos das Figura 5.6 e Figura 5.7.

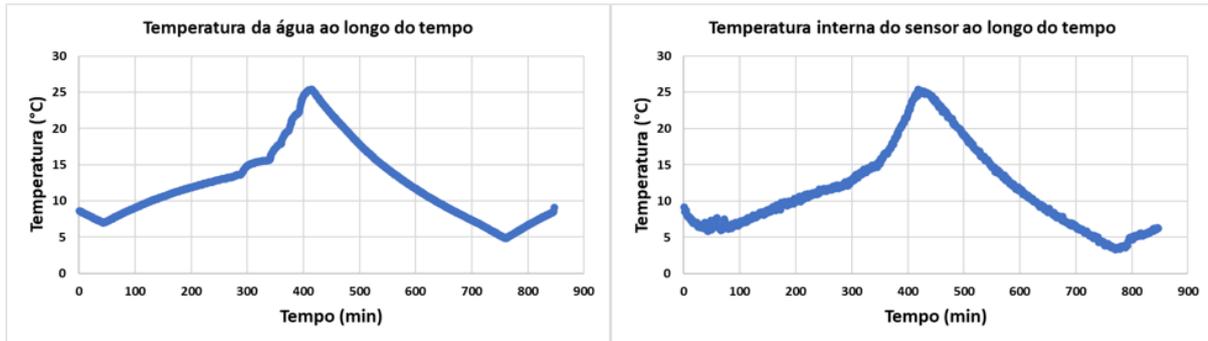


Figura 5.6 - Variação da temperatura ao longo do teste.

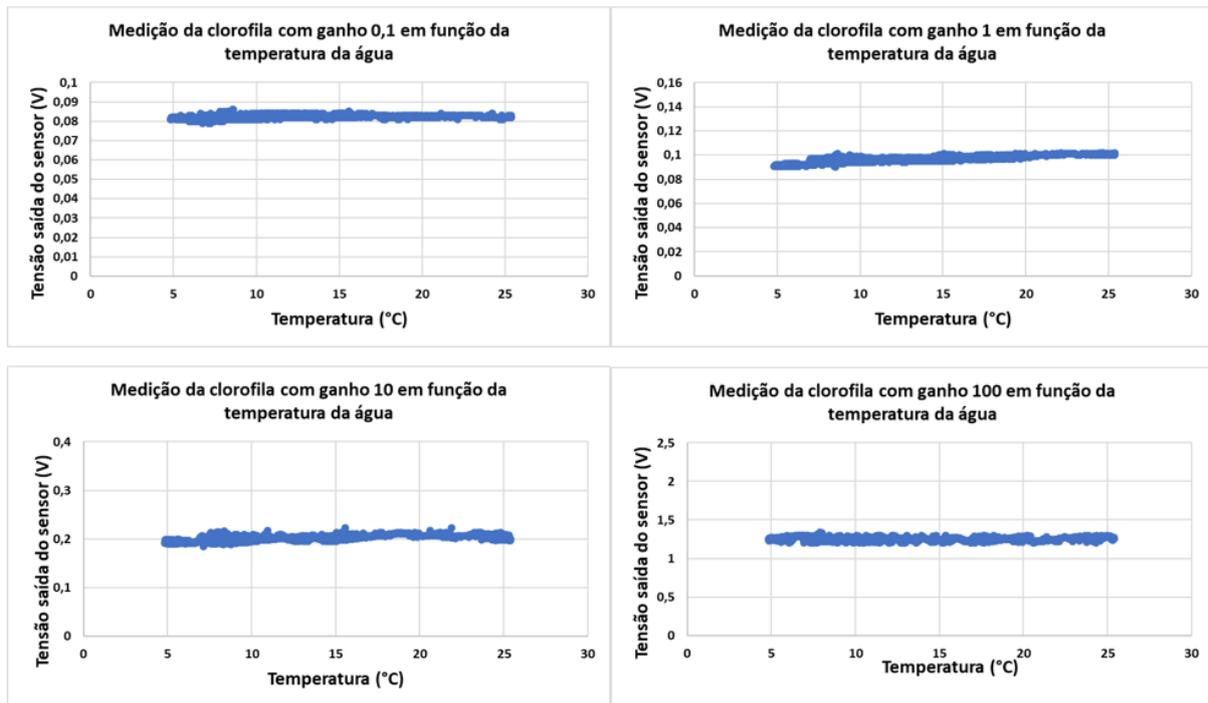


Figura 5.7 – Medição da tensão que representa a quantidade de clorofila, em função da variação da temperatura.

Nos gráficos da Figura 5.7 verifica-se que a influência da temperatura nas medições foi bastante reduzida, sendo bem visível que as medições efetuadas para os vários ganhos se mantiveram praticamente constantes à medida que a temperatura variava.

## 5.2 Dependência com a carga da bateria

A possibilidade de a carga da bateria afetar as medições realizadas pelo sensor surgiu quando, num dos testes, se verificou que à medida que a bateria ficava sem carga as medições realizadas começavam a deixar de ir ao encontro do esperado. Para avaliar a influencia nas medições foram realizados alguns testes, sendo inclusive implementada a sua constante monitorização pelo sensor. A comprovação desta dependência com a carga da bateria é evidente através dos resultados apresentados na Figura 5.8 obtidos a partir da realização de um teste com uma solução de clorofila, onde o sensor foi deixado a medir até que a bateria esgotasse a sua carga.

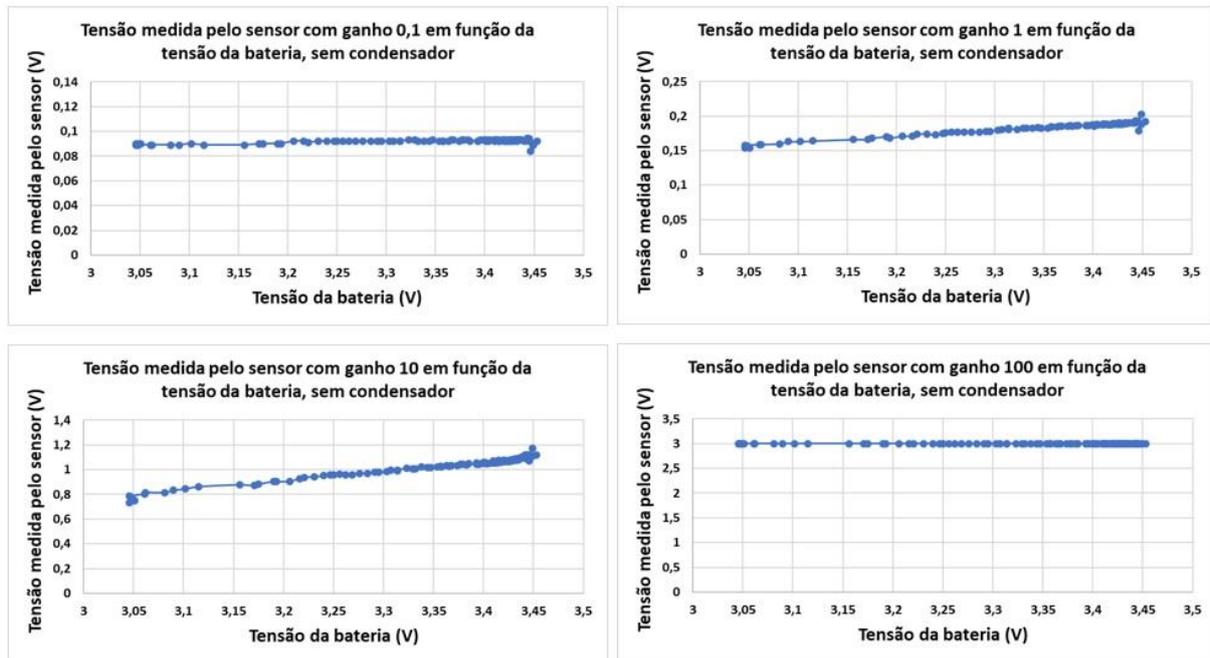


Figura 5.8 - Resultados do teste sem compensação da alimentação.

### 5.2.1 Medição da tensão da bateria

A monitorização do estado de carga da bateria foi uma das novas funcionalidades implementadas, tendo como objetivo saber de forma fácil e em permanência qual o estado da bateria e se é necessário proceder ao seu carregamento. O circuito adicionado ao sensor encontra-se representado na Figura 5.9.

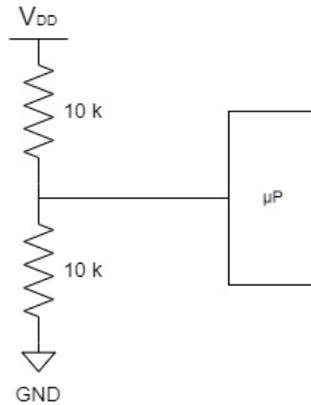


Figura 5.9 - Esquemático do circuito divisor de tensão que permite medir a carga da bateria.

Para realizar a medição foi necessário ativar um novo ADC no microcontrolador para medir esta nova variável e implementar um pequeno circuito de divisor de tensão, dado que a carga máxima da bateria é de 4 V.

### 5.2.2 Análise e correção

No primeiro teste foi utilizada uma fonte de tensão substituindo a bateria. Neste teste o valor de tensão começou em 4 V e foi sendo diminuído gradualmente em intervalos de 0,5 V em 0,5 V até se atingir a tensão de 2,6 V. Não era necessário ir até um valor tão baixo visto que a partir dos 3 V a STM deixa de funcionar, mas foi-se para efeitos de estudo. A corrente de alimentação dos LEDs foi monitorizada ao longo do teste, podendo-se ver os resultados dessa monitorização na Figura 5.10.

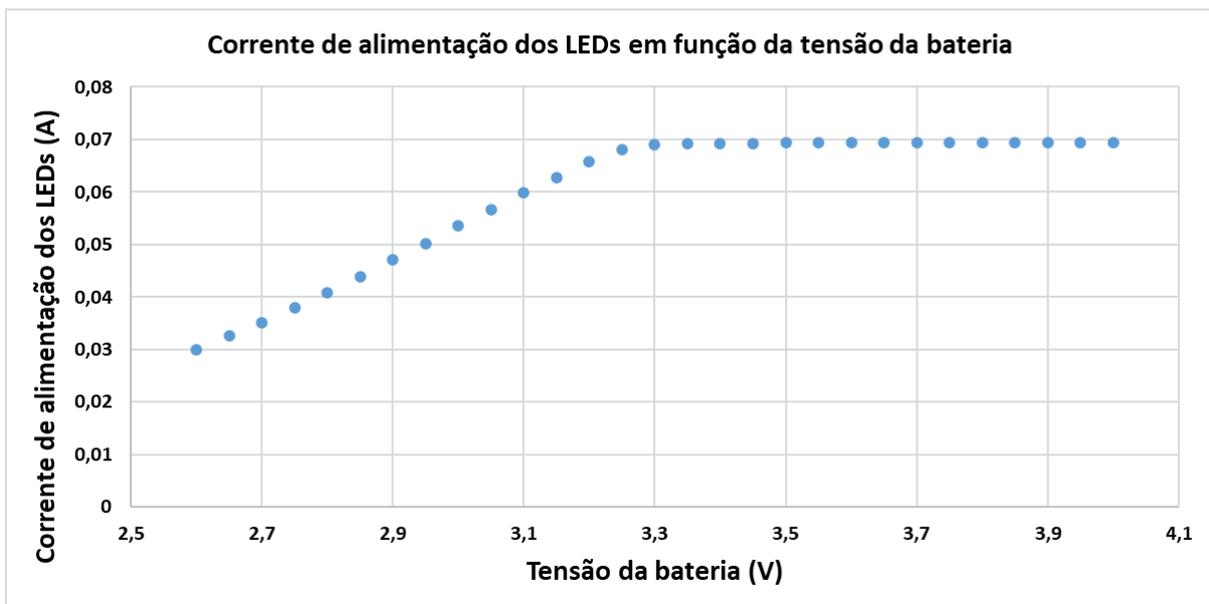


Figura 5.10 - Corrente de alimentação dos LEDs em função da carga da bateria.

Considerando os resultados mostrados no gráfico acima é possível perceber que a partir dos 3,3 V o valor de corrente fornecida aos LEDs começa a baixar consideravelmente. Essa diminuição do valor de corrente de alimentação dos LEDs vai fazer com que estes não brilhem com tanta intensidade e conseqüentemente não excitam tanto a clorofila, o que fará com que exista uma diminuição nos valores medidos sem que exista na prática uma diminuição da concentração de clorofila.

Verificou-se que a tensão de alimentação dos LEDs tinha um pico de abaixamento ao ligar os leds, com uma progressiva recuperação. A Figura 5.11 mostra a evolução da tensão no coletor do transistor que liga o led (ver Figura 5.12), quando este é ligado e desligado.



Figura 5.11 - Evolução da tensão no coletor do transistor ao longo de um pulso.

O mesmo abaixamento é notado na tensão de alimentação dos LEDs representada V\_LEDS na Figura 5.12.

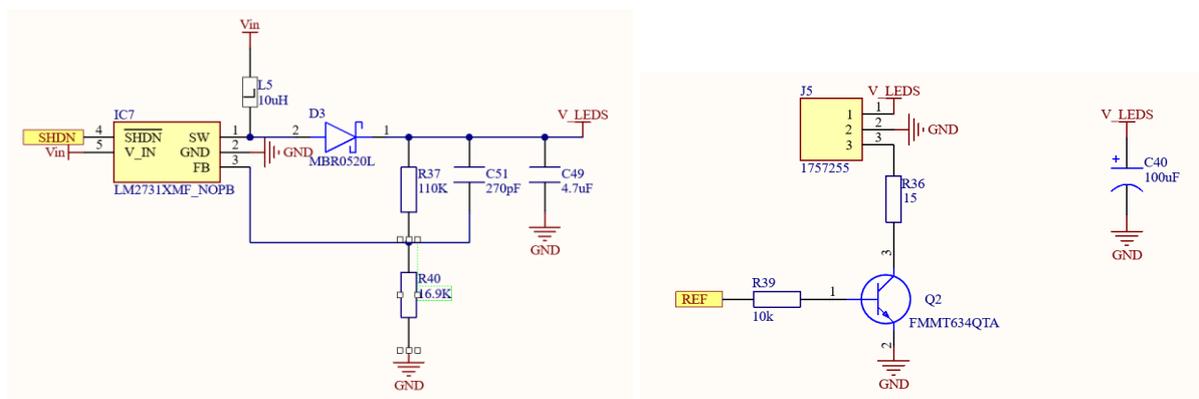


Figura 5.12 - Esquemático da fonte de alimentação e do circuito do atuação dos LEDs.

A solução para este problema passa por aumentar a capacidade do condensador que está na alimentação dos LEDs, representado na Figura 5.12 como C40, para que o regulador não tenha de fornecer instantaneamente a corrente requerida pelos LEDs.

Para perceber qual o condensador mais indicado realizou-se um teste com vários valores de capacidade. Foram colocados sucessivamente vários condensadores de diferentes valores em paralelo com o de 100  $\mu$ F, já existente na placa, de forma a aumentar o seu valor até que o problema seja atenuado ou resolvido (Figura 5.13 e Figura 5.14).

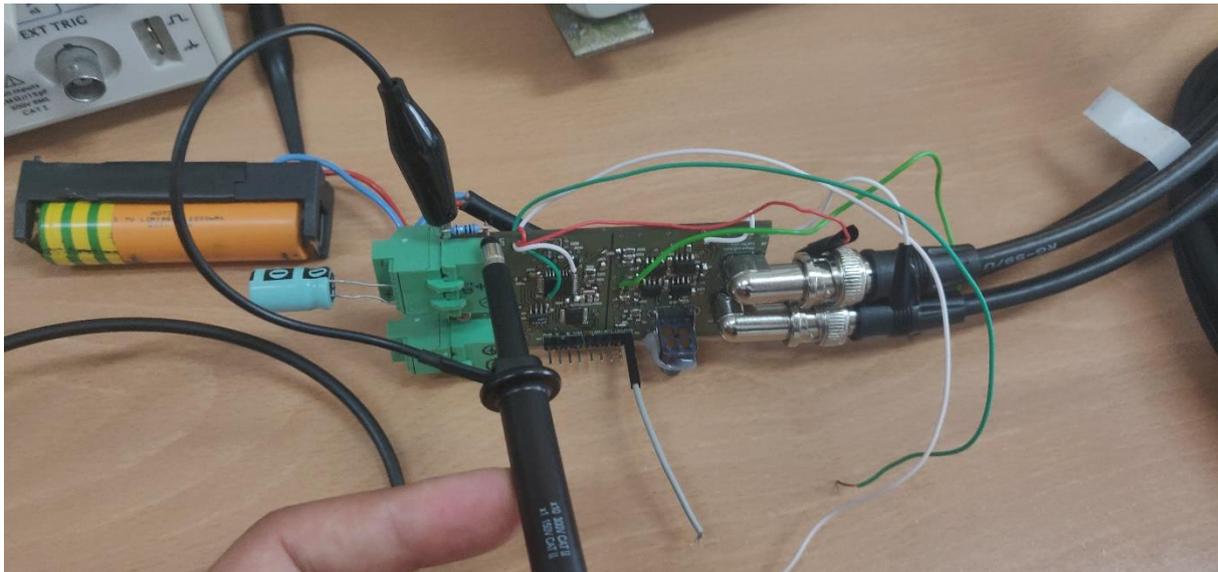


Figura 5.13 - Exemplo de um dos casos analisados neste teste.

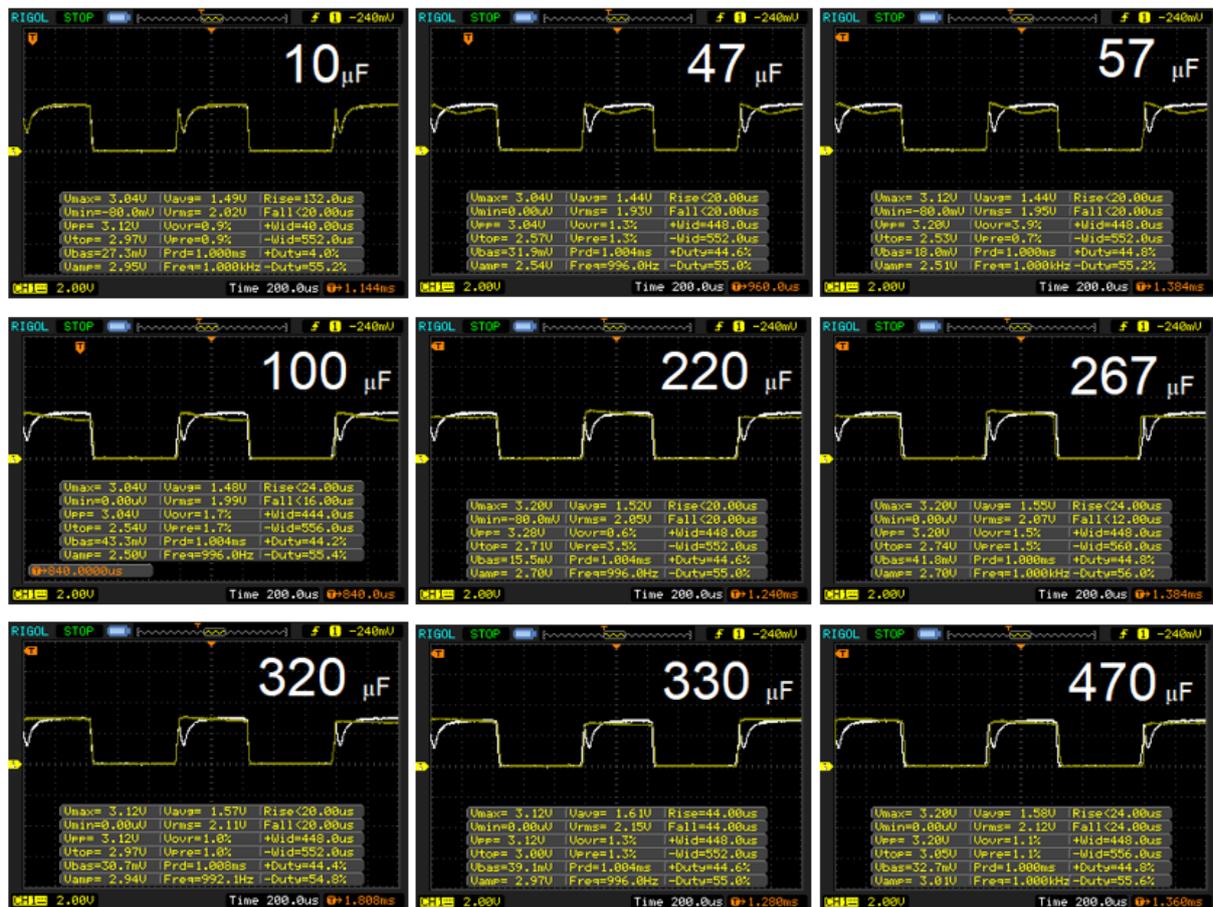


Figura 5.14 - Resultados do teste de variação do valor do condensador dos LEDs.

Nos resultados mostrados acima, a onda a branco representa a onda original só com a compensação que já está na placa, apenas com o condensador de 100 µF. Em cada gráfico está indicado o valor do condensador que foi adicionado, ou seja, o valor acrescentado aos 100 µF iniciais. Dos vários valores utilizados percebe-se que a partir dos 330 µF a resposta obtida passa a ser completamente

estável, deixando de se verificar por completo a variação que se observa para valores mais baixos. Dessa forma, esse foi o valor do condensador escolhido para compensar a alimentação dos Leds, passando a ter como valor total um condensador de 430  $\mu\text{F}$ .

### 5.2.3 Teste e validação

Para comprovar que o problema do efeito da bateria/alimentação dos LEDs ficou resolvido, realizou-se um último teste. Utilizando uma solução de clorofila realizaram-se medições utilizando o condensador de 330  $\mu\text{F}$  a compensar a alimentação dos LEDs. As medições foram realizadas até que a bateria esgotasse a sua carga (Figura 5.15).

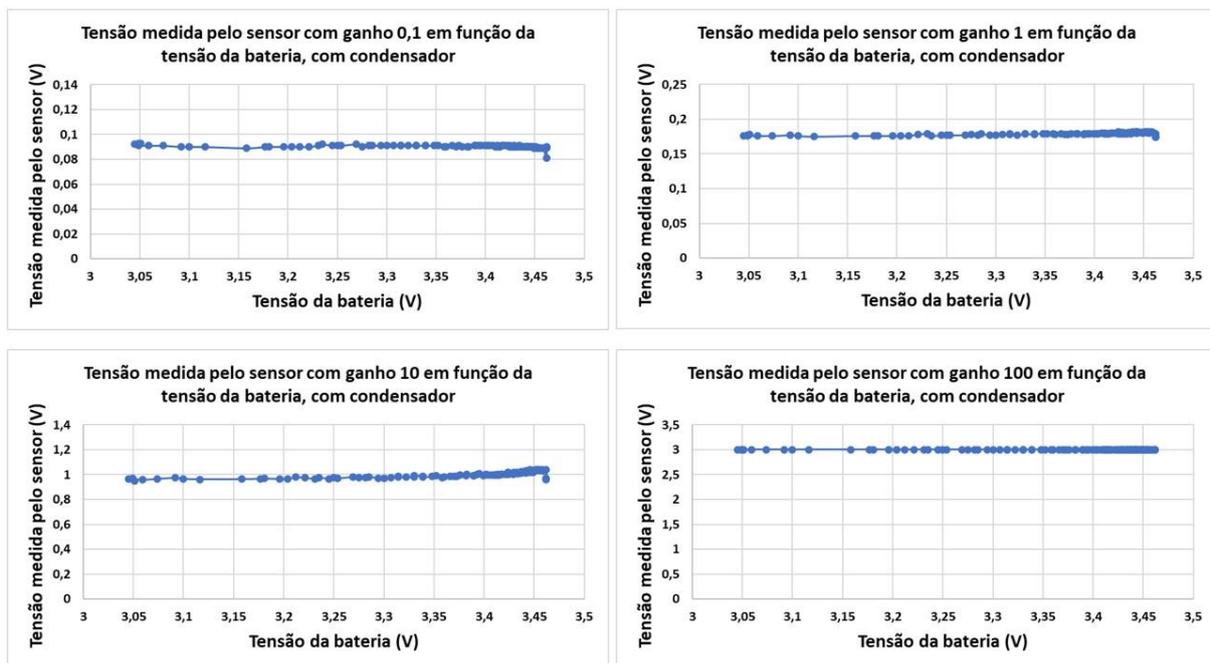


Figura 5.15 - Resultados do teste com compensação da alimentação.

Analisando os resultados e comparando com os do teste apresentados no início sem compensação da alimentação (Figura 5.8), é possível perceber a grande diferença que existe entre as medições realizadas sem e com aumento do valor do condensador de compensação. Nos resultados retirados sem compensação da alimentação verifica-se que o valor de clorofila medido vai diminuindo à medida que a bateria descarrega. Por sua vez, nos resultados com compensação verifica-se que o valor das medições mantém-se estável. Dessa forma, demonstra-se que os efeitos da diminuição da carga da bateria nas medições do sensor estão corrigidos.

## 5.3 Dependência com a turbidez da água

Ao longo dos testes realizados percebeu-se que a parte do sensor responsável pela medição da turbidez não estava em funcionamento. Foram analisadas as conexões do fotodetector e percebeu-se que as ligações estavam feitas com a polaridade invertida, o que fazia com que todos os resultados obtidos fossem sempre zero.

### 5.3.1 Calibração do sensor de turbidez

Uma vez corrigida a questão das polaridades e com esta parte já em funcionamento, o passo seguinte foi realizar uma calibração do sensor de turbidez. Os testes de calibração foram feitos recorrendo ao uso de concentrações *standard*, feitas a partir de formazina 4000 NTU (*Nephelometric Turbidity Unit*). As concentrações feitas seguem uma relação de diminuição para metade relativamente à anterior, tendo sido utilizadas na calibração concentrações com os respetivos valores 500 NTU; 250 NTU; 125 NTU; 62,5 NTU; 31,25 NTU; 15,625 NTU; 7,8125 NTU; 3,91 NTU; 1,955 NTU; 0,9775 NTU; 0,4886 NTU e 0 NTU (referência). Os resultados encontram-se representados no gráfico da Figura 5.16.

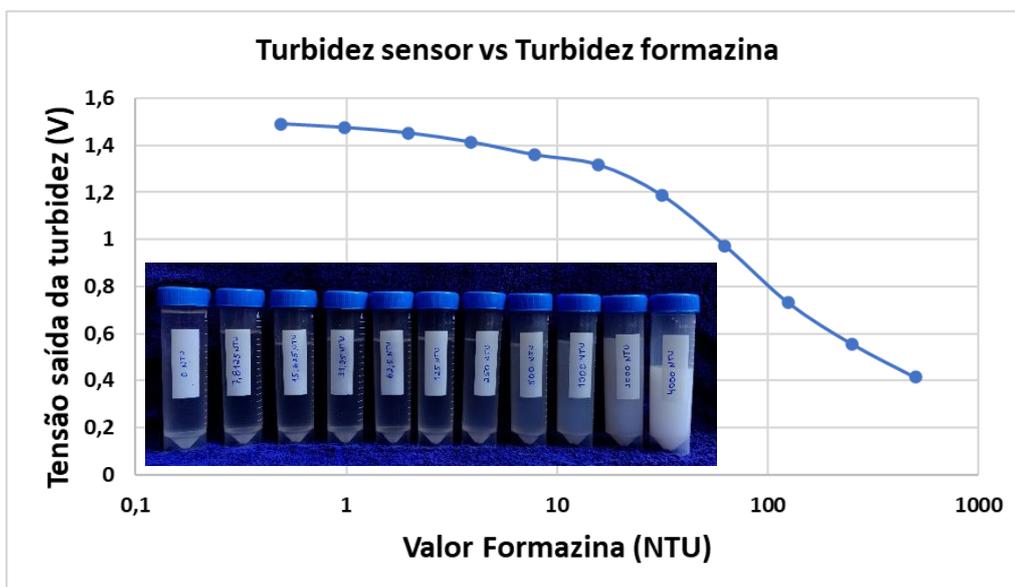


Figura 5.16 - Curva de calibração do sensor de turbidez.

A interpretação dos dados resultantes das medições realizadas pelo sensor de turbidez deve ser feita da seguinte forma, quando existe ausência de turbidez o sensor retorna um valor de 1,5 V, diminuindo esse valor à medida que a turbidez aumenta, conforme se verifica pelo gráfico.

Do gráfico é possível perceber que o sensor consegue ler e distinguir valores de turbidez entre 0 e 500 NTU, começando a perder sensibilidade à medida que se aproxima dos 0,4 NTU.

No caso da turbidez, para obter medições mais abrangente, foram implementados dois ganhos. Utilizando um diodo zener é possível aplicar esses dois ganhos, um para sinais abaixo do valor do diodo e outro para valores maiores, possibilitando obter maior resolução para valores menores sem reduzir a escala de leitura. Portanto, os resultados são apresentados na forma de duas retas, cada uma representando os valores medidos através do ganho aplicado (Figura 5.17).

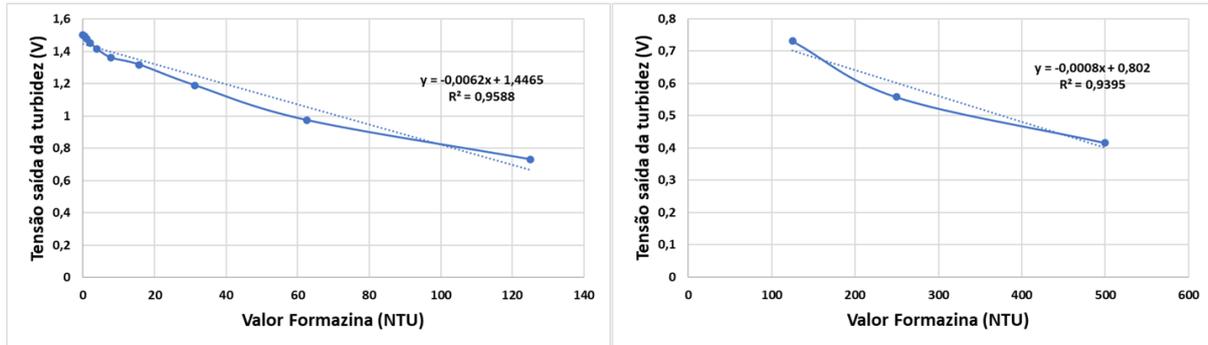


Figura 5.17 - Declives que permitem determinar a turbidez em NTU.

### 5.3.2 Análise

Realizada a calibração do sensor de turbidez, tentou-se perceber como afeta a sua variação as medições de clorofila. A partir de uma solução com uma concentração de clorofila fixa e estável foram feitas várias soluções com diferentes valores de turbidez, apresentando-se de seguida os resultados obtidos (Figura 5.18).

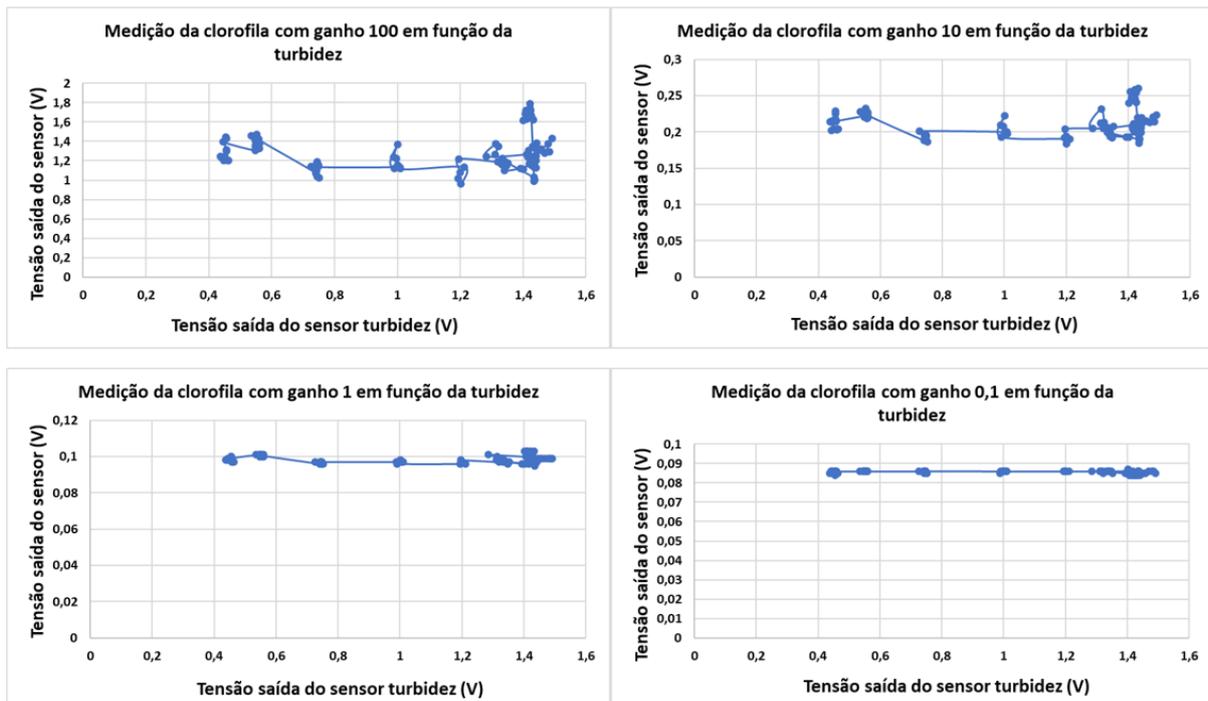


Figura 5.18 – Resultados de teste de medição da clorofila em função da variação do valor de turbidez.

Da análise dos resultados percebe-se que existem oscilações ao longo do teste no valor de clorofila medido pelo sensor, estas oscilações podem ocorrer graças a interferências causadas pela turbidez ou à formazina que também pode ter componentes que interfiram nas medições. Como se pode constatar para o ganho 100 os valores oscilaram entre 1,8 V e 0,9 V o que parece indicar que a turbidez influencia as medições. No ganho 10 existe também uma oscilação nos valores medidos, contudo já não é tão expressiva como no ganho 100, neste os valores oscilam entre os 0,26 V e os 0,184 V. Nos restantes ganhos estas oscilações já não são perceptíveis dado que a concentração de clorofila a ser medida é baixa.

Estes resultados demonstram que existe uma possível influência da turbidez nas medições de clorofila realizadas pelo sensor, porém não é possível apenas com estes resultados concluir qual a expressão que traduz a relação entre as duas variáveis. Seria necessário realizar testes com alguma substância que permita variar a turbidez sem alterar a concentração de clorofila. Dessa forma não é possível neste momento compensar as medições de clorofila em função das variações de turbidez.

## **5.4 Dependência da luz ambiente**

A luz ambiente representa outra das variáveis que influencia as medições realizadas pelo sensor. Para evitar a sua interferência nas medições foi inclusive colocado um filtro ótico que restringe os comprimentos de onda medidos aos de interesse, contudo é possível que mesmo assim existam influências. Dos testes já realizados com incidência no estudo dos efeitos da luz ambiente, os resultados indicam uma possível interferência da luz ambiente nas medições de clorofila feitas pelo sensor. Como tal foram realizados novos testes de forma a validar a existência de interferência e a possibilidade de a compensar ou corrigir.

Os testes realizados foram feitos utilizando três soluções de concentrações diferentes, que foram medidas para tentar perceber qual o padrão (Figura 5.19, Figura 5.20 e Figura 5.21). Estes testes realizaram-se com luz ambiente solar, onde para ter ausência de luz ambiente o que se fez foi tapar completamente a câmara de medição, indo destapado gradualmente de forma a aumentar o valor de luz ambiente que chega ao fotodetector, sendo que o último estágio é quando a câmara fica completamente destapada.

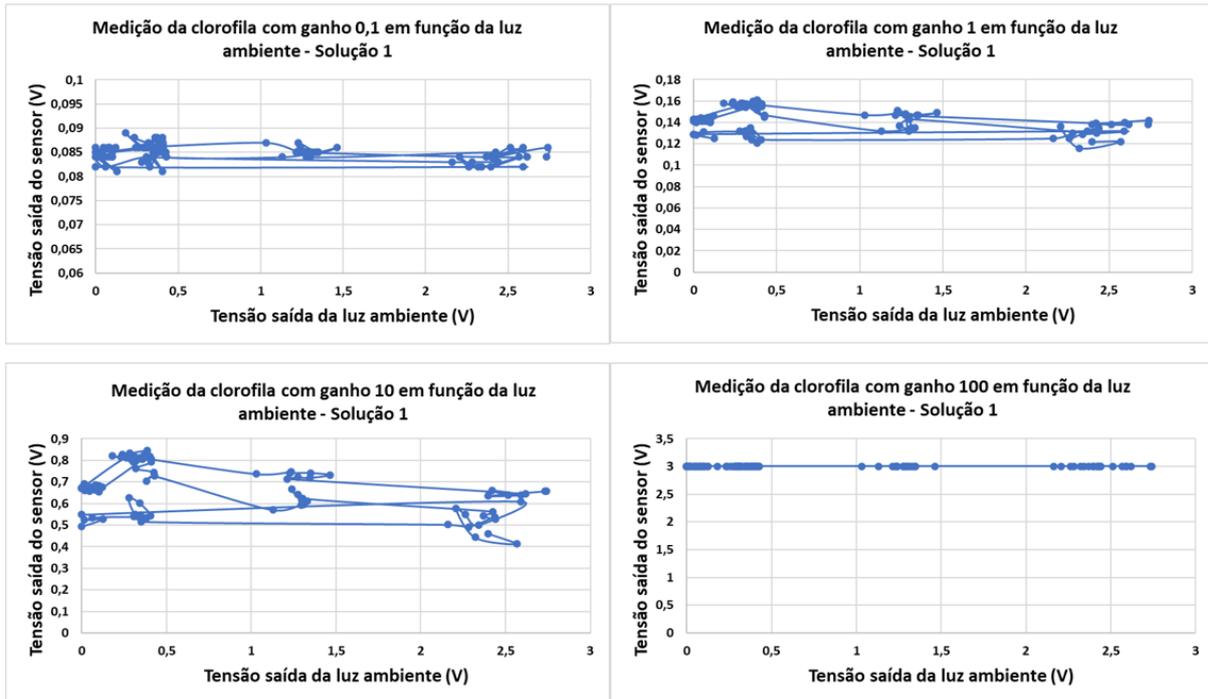


Figura 5.19 - Resultados de variação da luz ambiente para a solução 1.

Dos resultados obtidos das medições da solução 1 (Figura 5.19), verifica-se que ao longo do teste, à medida que a intensidade da luz ambiente varia, existe uma diminuição do valor percebido pelo sensor. Nos ganhos 10 e 1 é onde a oscilação dos valores medidos é mais perceptível, variando entre 0,413 V e 0,844 V e entre 0,116 V e 0,161 V, respetivamente.

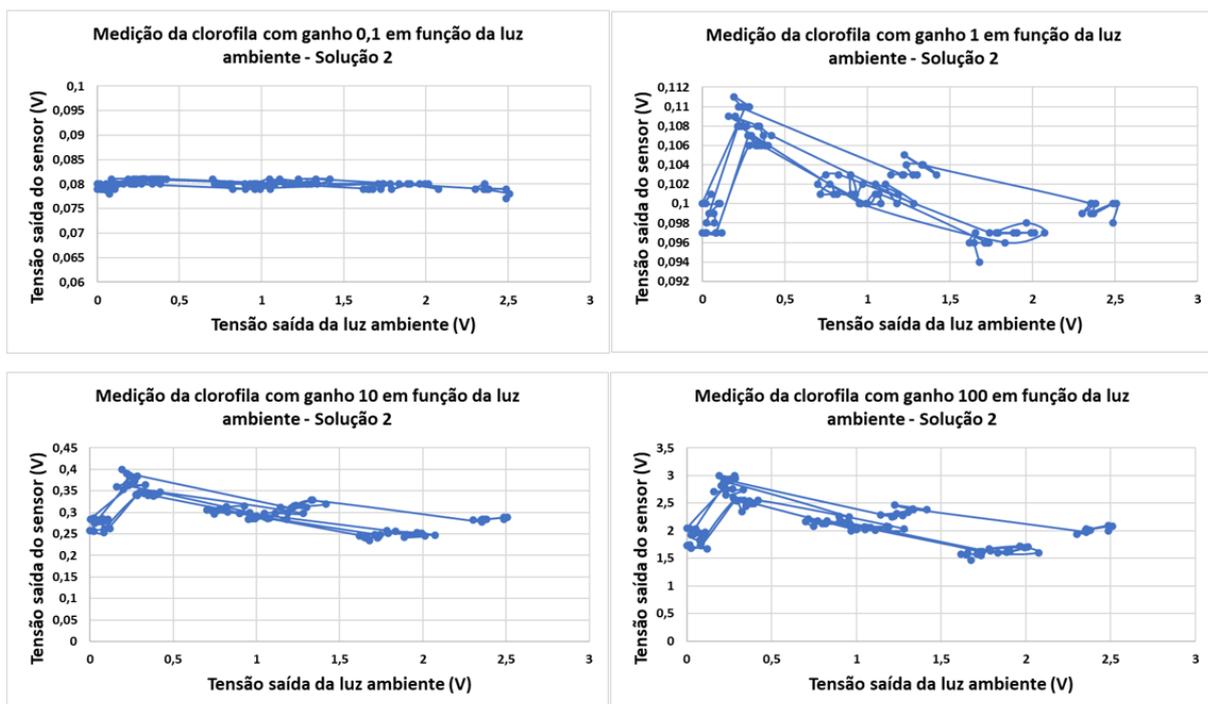


Figura 5.20 - Resultados de variação da luz ambiente para a solução 2.

No teste com a solução 2 (Figura 5.20) as oscilações já são mais expressivas, podendo observar-se nos três maiores ganhos. No ganho 100 a oscilação é entre 1,47 V e 3 V, no ganho 10 é entre 0,234 V e 0,399 V e no ganho 1 é entre 0,094 V e 0,111 V.

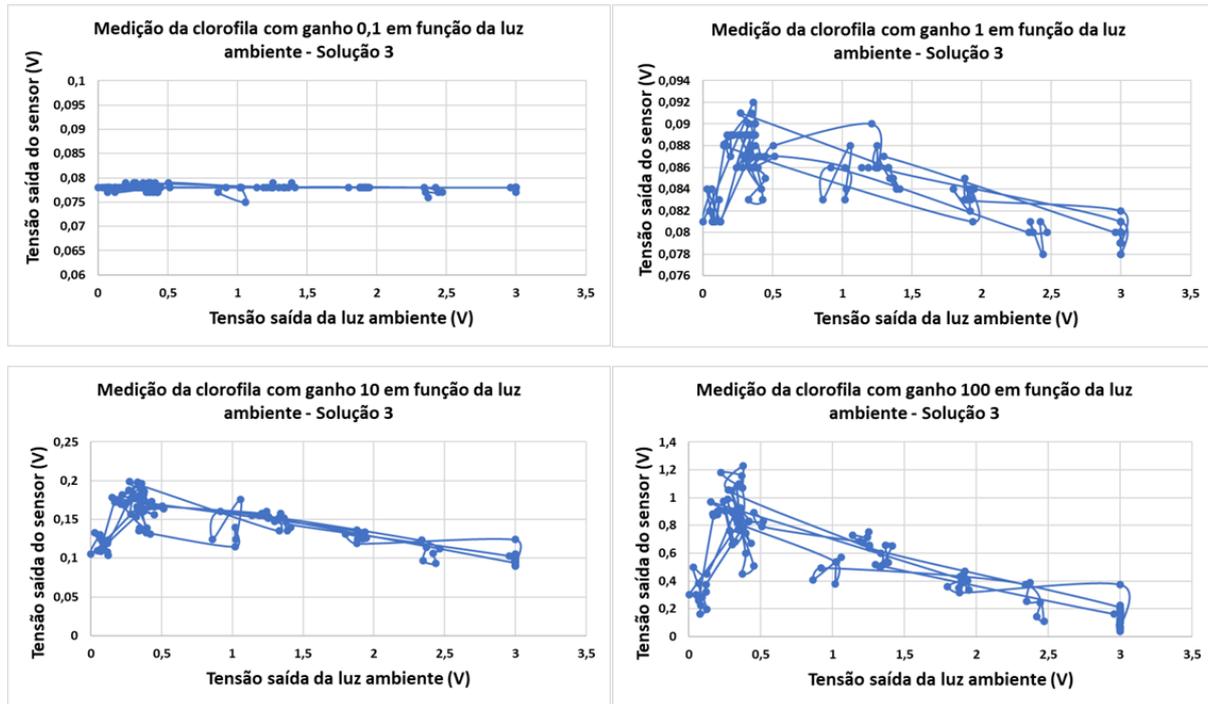


Figura 5.21 - Resultados de variação da luz ambiente para a solução 3.

No caso da solução 3 (Figura 5.21), a que tem menor concentração de clorofila, verificaram-se também oscilações expressivas, tendo no ganho 100 uma variação de valores que vai desde os 0,04 V até aos 1,229 V, no ganho 10 desde os 0,09 V até aos 0,199 V e no ganho 1 desde os 0,078 V até aos 0,092 V.

Olhando para todos os resultados, percebe-se que à medida que aumenta o valor de luz ambiente que chega à solução de clorofila menor é o valor medido. Estes resultados podem ser devido ao efeito de *fluorescence quenching*, onde o excesso de energia fornecida ao fitoplâncton, devido à sua exposição durante períodos de elevada e variável radiação, pode causar fotoinibição da fotossíntese. O que resulta numa maior dissipação de energia sobe a forma de calor através da extinção não fotoquímica, levando a uma diminuição do rendimento de fluorescência[62]. Mas também pode ser devido a uma resposta não linear do fotodetector, que passa a ter mais luz a incidir sobre ele.

Para evitar a ocorrência deste efeito em ambiente real, o sensor deve ser colocado no mar a alguma profundidade para que a luz seja dispersa e voltado para baixo, de forma a evitar que chegue luz a zona de medição. O teste feito em mar representa um exemplo de que seguindo as duas condições referidas são obtidos resultados sem este efeito. A Figura 5.22 mostra a evolução da luz ambiente num teste real, e a Figura 5.23 a evolução da medida de clorofila durante o mesmo teste.

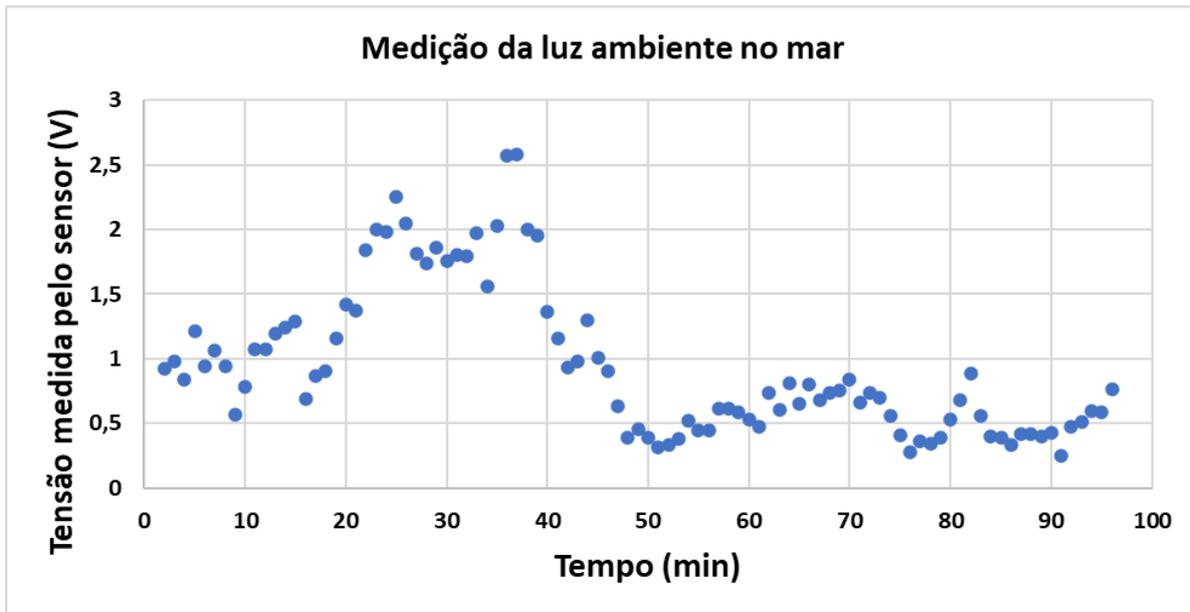


Figura 5.22 - Luz ambiente, em tensão, medida pelo sensor no mar.

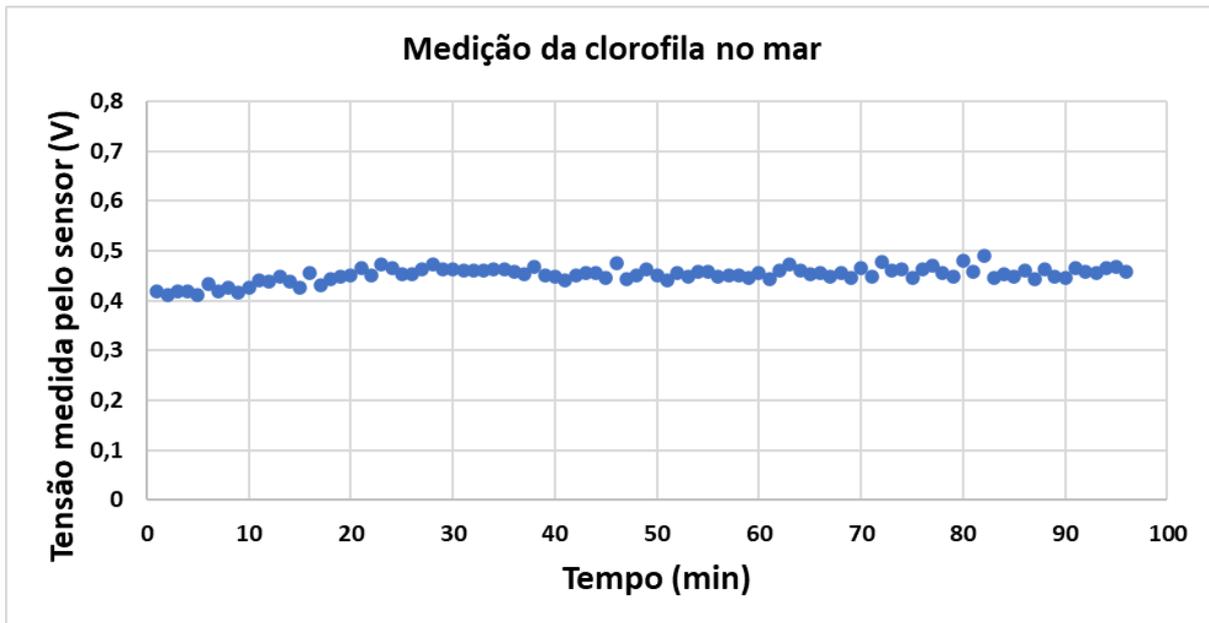


Figura 5.23 – Clorofila medida pelo sensor

Tendo em conta os resultados obtidos, verifica-se que se a luz solar não incidir diretamente no fotodetector, mesmo que exista alguma luz ambiente perceptível, esta parece já não causar o efeito de *quenching*. Os resultados mostram que apesar de serem perceptíveis variações da luz ambiente, o resultado das medições de clorofila não tiveram grandes oscilações.

## 5.5 Consumo de corrente e autonomia

O consumo do sensor foi medido para que se possa saber qual a autonomia do sistema mediante a bateria escolhida para o alimentar. Para conhecer os reais consumos realizou-se um teste em que se mediu a corrente consumida para alimentar o sensor durante alguns ciclos de medição. Tendo em conta que, um ciclo de medição tem uma duração de 43 s é possível analisar no gráfico da Figura 5.24 os consumos para quatro ciclos de medição.

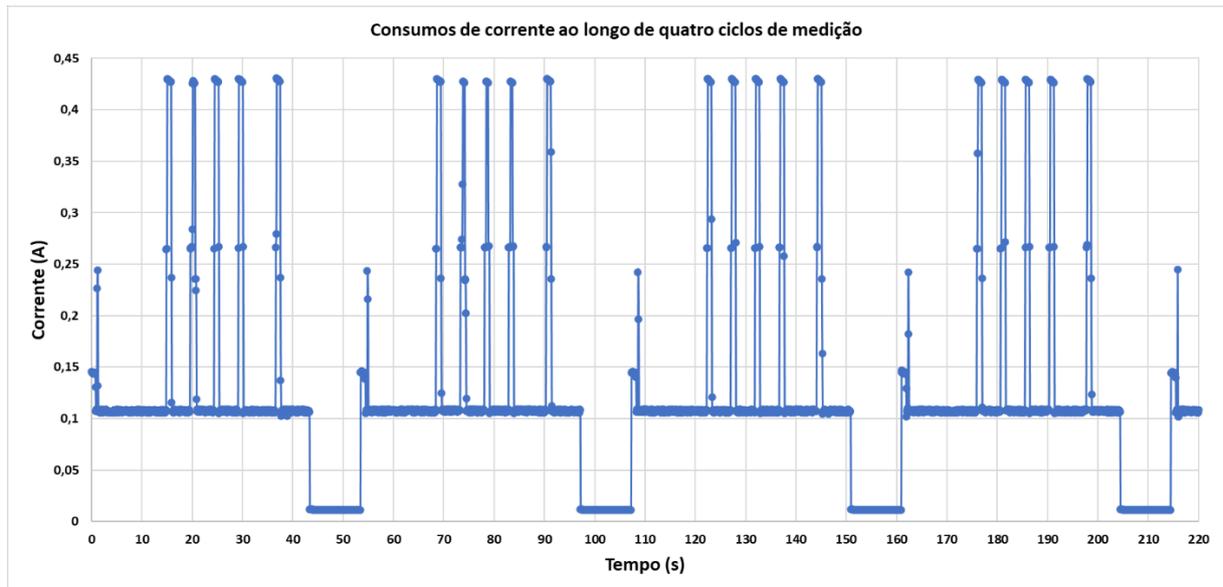


Figura 5.24 – Consumos de corrente ao longo de quatro ciclos de medição.

Tendo em conta os resultados obtidos pode inferir-se que dos 43 s de cada ciclo, 5 s correspondem ao tempo em que os LEDs estão ligados para medição da clorofila e turbidez e os restantes 38s correspondem ao tempo entre os pulsos de medição e ao processamento dos dados para envio pela porta série, sendo que entre cada ciclo o sistema fica durante 11 s em standby. O tempo de standby pode ser ajustando conforme a frequência de medições que se pretende realizar. No que diz respeito aos consumos verifica-se que quando os LEDs se encontram ligados existe um consumo médio de corrente de 428 mA. No período entre medições e o processamento dos dados como apenas é necessário alimentar os reguladores e o microcontrolador o consumo desce para 110 mA. No modo standby o consumo desce ainda mais para apenas 11 mA.

Uma vez conhecidos os consumos para todos os estados do sistema é então possível calcular a autonomia do sistema. A bateria utilizada para alimentar o sensor durante os testes que tem uma capacidade de 2200 mAh e considerando a frequência de medições também utilizada ao longo dos testes de uma medição por cada 54 segundos aproximadamente, pode concluir-se que temos uma autonomia de 18h sendo realizadas 1080 medições nesse período.

Tendo em conta que temos:

- Bateria de 2200 mAh;
- Tempo de amostragem de 54 s.

Da análise do gráfico da figura 5.24 é possível concluir os valores da Tabela 3.

Tabela 3 - Consumos para um ciclo de amostragem de 54 s.

Consumo	Corrente I (mA)	Tempo (s)	Carga (mAh)
<b>Sensor e LEDS ON</b>	428	5	0,59
<b>Sensor ON</b>	110	38	1,16
<b>Standby</b>	11	11	0,03
<b>Total</b>	-	54	1,79

Dividindo a carga total consumida pelo tempo de amostragem sabe-se o consumo médio de corrente do sistema.

$$I_{\text{media}} \text{ (mA)} = \frac{\text{Carga}_{\text{Total}} \text{ (mAh)}}{\text{Tempo}_{\text{Amostragem}} \text{ (h)}} \quad (4)$$

$$I_{\text{media}} \text{ (mA)} = 119,3 \text{ mA}$$

Tendo o consumo médio é então possível calcular a autonomia.

$$\text{Autonomia (h)} = \frac{\text{Carga}_{\text{Bateria}} \text{ (mAh)}}{I_{\text{media}} \text{ (mA)}} \quad (5)$$

Para a bateria considerada temos:

$$\text{Autonomia (h)} = 18\text{h}$$

Se alterarmos a frequência de medições para uma por hora, 24 medições por dia, passamos a ter uma autonomia de 7 dias. Resumindo os dados na Tabela 4 e fazendo os cálculos temos:

- Bateria de 2200 mA;
- Tempo de amostragem de 3600 s.

Tabela 4 – Consumos para um ciclo de amostragem de 3600 s.

Consumo	Corrente I (mA)	Tempo (s)	Carga (mAh)
<b>Sensor e LEDS ON</b>	428	5	0,59
<b>Sensor ON</b>	110	38	1,16
<b>Standby</b>	11	3557	10,87
<b>Total</b>	-	3600	12,62

Obtendo:

$$I_{\text{media}} \text{ (mA)} = 12,62 \text{ mA}$$

O que dá:

$$\text{Autonomia (h)} = 174 \text{ h} = 7 \text{ dias}$$

Desta forma, verifica-se que é possível aumentar a autonomia do sensor através da diminuição da frequência de medições ou outra alternativa seria também aumentar a capacidade da bateria.

## 5.6 Teste de sensibilidade/calibração

Uma vez feitas as melhorias e alterações, realizou-se um novo teste para perceber qual a sensibilidade que o sensor apresenta para cada um dos ganhos, sendo que dos resultados obtidos é também possível retirar as equações que representam a resposta do sensor. Assim é possível enquadrar a resposta do sensor dentro de quatro gamas, correspondendo cada a gama a cada um dos ganhos do sensor.

Este novo teste foi realizado nos laboratórios em Vigo utilizando um conjunto de várias concentrações, de forma a atingir os limites de sensibilidade de todos os ganhos do sensor.

Os resultados deste teste encontram-se representados nos gráficos da Figura 5.25, onde cada gráfico representa a resposta do sensor para cada um dos ganhos.

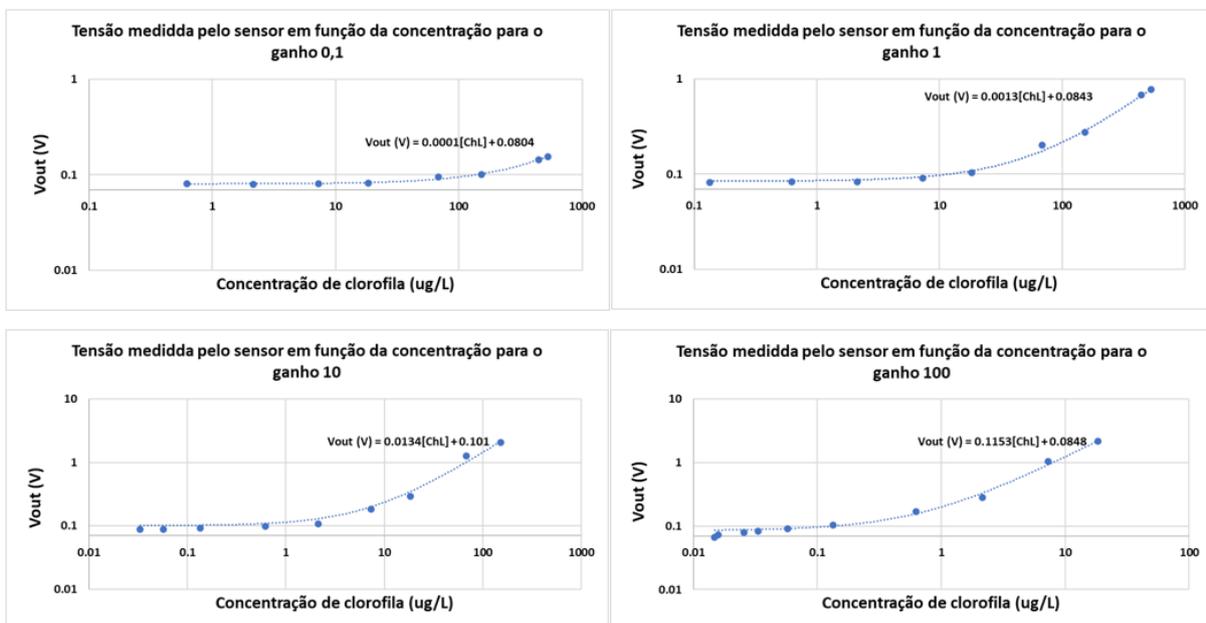


Figura 5.25 - Resultados do teste de sensibilidade.

Dos resultados obtidos, para além de se poder retirar a sensibilidade do sensor é ainda possível retirar quatro gamas de sensibilidade do sensor bem como as suas equações de resposta, que

correspondem a cada um dos ganhos. Para o ganho 100, o mais elevado, o limite de detetabilidade é de 0,01  $\mu\text{g/L}$  podem o sensor com este ganho medir até 25  $\mu\text{g/L}$ . Para o ganho 10 a deteção inicia-se em 1 até 215  $\mu\text{g/L}$ . O ganho 1 apresenta uma gama de deteção que vai desde 10 até valores superiores a 1000  $\mu\text{g/L}$ . Por último, o ganho 0,1 apenas deteta concentrações muito elevadas. Este ganho inicia a sua gama de medição nas 100  $\mu\text{g/L}$  e analisando a sua curva e equação estima-se que tenha capacidade para medir até concentrações de 29194  $\mu\text{g/L}$  (teoricamente, não validado).

Tendo em conta todos os resultados, pode concluir-se que o sensor apresenta capacidade para medir concentrações que podem ir desde 0,01  $\mu\text{g/L}$  até valores superiores a 1000  $\mu\text{g/L}$  utilizando o espectro de todos os ganhos em conjunto.

## 5.7 PCB final

A realização de uma placa de circuito impresso (PCB) final onde foram incluídas todas as alterações e melhorias acrescentadas ao sistema representou o último passo feito no projeto. Na Figura 5.26 encontra-se a placa montada.

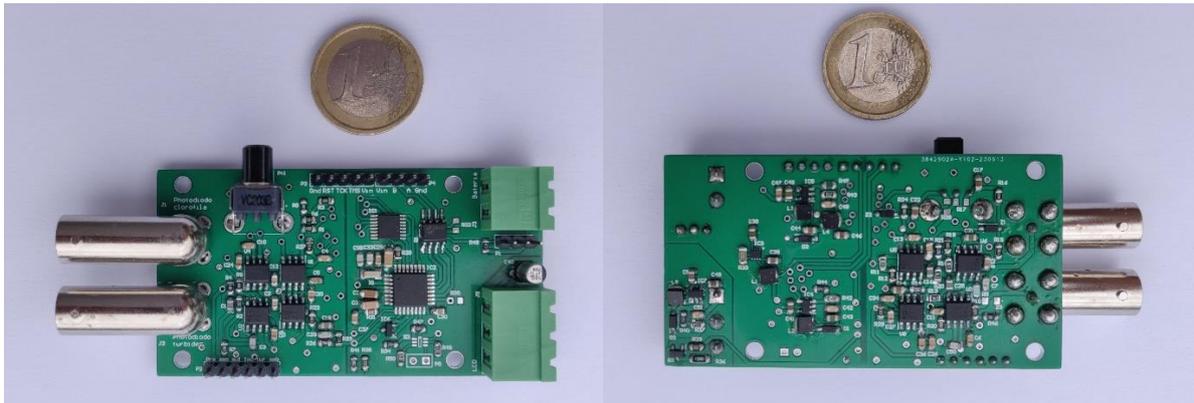


Figura 5.26 – Nova PCB montada com as correções e melhorias implementadas.

Toda a restante documentação relevante, como esquemático, lista de material necessário para construção do protótipo e o software mais relevante encontra-se incluída em anexo.

# Capítulo 6

## Conclusão

### 6.1 Conclusões

Neste trabalho de dissertação de mestrado foi apresentado o desenvolvimento e teste de um sistema de monitorização de fitoplâncton para medições in-situ que faz uso da técnica de espectroscopia de fluorescência. O dispositivo desenvolvido pretende oferecer aos utilizadores uma nova alternativa no que diz respeito ao acompanhamento da evolução e desenvolvimento do fitoplâncton nos ambientes marítimos e fluviais.

Numa primeira fase foram realizados teste ao protótipo existente para perceber quais os seus problemas e limitações. Desses teste resultou uma lista de questões a corrigir e melhorar, nomeadamente a necessidade de realizar novos testes relativos à temperatura e a luz ambiente para descobrir como o seu impacto nas medições poderia ser atenuada. A verificação das ligações e funcionamento da parte do sensor responsável por medir a turbidez, uma vez que não estava a funcionar. A implementação da monitorização da tensão da bateria e estudo do seu impacto nas medições realizadas, bem como a instalação de um novo sensor de temperatura para realizar a monitorização da temperatura da água na camara de medição de modo a perceber se oscilações do seu valor tinham impacto nas medições de clorofila.

A segunda fase consistiu em analisar, estudar e implementar as correções dos problemas e melhorias descobertos na primeira fase. Relativamente às questões de temperatura, além da implementação do novo sensor de temperatura foi também necessário realizar alterações ao nível do circuito e software de atuação dos LEDs, compensado dessa forma o seu impacto nas medições. A implementação da monitorização da bateria e o estudo do seu impacto revelaram que esta era também uma das variáveis que afetava as medições dos sensor, sendo necessário compensar a alimentação dos LEDs dado que a partir dos 3,3 V constatou-se que existia um pico de abaixamento na sua alimentação. A solução passou por aumentar o valor do condensador na alimentação dos LEDs para ajudar o regulador que os alimenta a fornecer a corrente necessária no momento em que estes são ativados. Quanto ao

sensor de turbidez percebeu-se que as suas ligações estavam feitas de forma inversa, o que não permitia o seu funcionamento. Após a correção dessa situação foi necessário realizar a calibração do sensor para poder traduzir as suas medições em valores de turbidez. Dos testes para estudo da luz ambiente percebeu-se que existe uma diminuição do valor de clorofila medido à medida que a luz que irradia a câmara de medição aumenta. Estes resultados podem ser devido ao excesso de energia fornecida ao fitoplâncton podendo causar fotoinibição da fotossíntese, o que resulta numa diminuição do rendimento de fluorescência. Mas também pode resultar de uma resposta não linear do fotodetector, que passa a ter mais luz a incidir sobre ele.

Além dos testes feitos para análise dos problemas encontrados foi também realizado um teste para analisar os consumos e autonomia do sensor e outro para perceber qual a sensibilidade de detetabilidade nas várias escalas após todas as correções e melhorias. Do teste de autonomia constatou-se que o sensor com uma bateria de 2200 mAh pode ter valores diferentes de autonomia, sendo algo que depende diretamente da frequência com que o utilizador pretende realizar a recolha de medições. Concluiu-se que com a realização de uma medição por minuto a bateria apenas dura 18h, mas se diminuirmos a frequência de medições para uma por hora a bateria passa a durar 7 dias. Desta forma pode dizer-se que existem duas formas de aumentar a autonomia do sensor, uma passa pela diminuição da frequência de medições e a outra passa pelo aumento da capacidade da bateria que o alimenta. Do teste de sensibilidade foi possível retirar as gamas do sensor para cada um dos seus ganhos, o que resulta numa escala de medições que pode ir desde as 0,01 µg/L até valores bastante superiores a 1000 µg/L se considerarmos por quatro ganhos.

Em suma, o sensor obtido após a realização das correções e melhorias permite oferecer ao utilizador um equipamento de baixo custo e que realiza medições in-situ com total autonomia no processo de recolha e armazenamento dos dados recolhidos. Este equipamento recolhe essencialmente medições de clorofila, turbidez e temperatura da água, permitindo também ao utilizador saber o exato momento da recolha de cada medição, uma vez que a data e hora são registados quando uma medição é realizada, e acompanhar a evolução da carga da bateria facilitando uma melhor gestão da sua autonomia e necessidade de recarregamento.

## 6.2 Sugestões para trabalho futuro

Com as correções e melhorias realizadas ao longo da execução deste trabalho o sensor desenvolvido deu um passo na sua otimização, contudo existem alguns aspetos que ainda podem ser melhorados. Deste modo, sugerem-se alguns tópicos como trabalho futuro:

- Primeiramente, a realização de testes de calibração, para validação da nova PCB.
- Relativamente a turbidez sugere-se que sejam realizados novos testes para perceber a relação entre o valor de turbidez medido e o impacto direto que tem na medição de clorofila. Passando a realizar a compensação das medições realizadas em função da turbidez.
- No que toca a luz ambiente percebeu-se ao longo dos testes e resultados que esta é também uma variável que afeta as medições. Uma das soluções encontradas passa por colocar o sensor a realizar as medições numa posição em que não tenha incidência direta de luz ambiente. Dessa forma, uma sugestão de trabalho futuro passa por explorar a possibilidade de evoluir o sensor para um sistema que possa realizar medições sem necessidade de evitar a luz ambiente e que até seja capaz de compensar a influência desta variável.
- O biofouling representa uma das principais dificuldades no que diz respeito à monitorização em mar com sistemas óticos. Está projetado no circuito um sistema de anti-biofouling que ainda não está implementado. Uma sugestão de trabalho futuro passa por realizar a sua implementação, teste e validação para que o sensor esteja capacitado para realizar medições durante longos períodos sem necessidade de intervenção humana para realizar a sua limpeza.
- Uma das alterações que pode facilitar a utilização do sensor em ambiente de monitorização permanente é a passagem da bateria de alimentação do sensor para o seu exterior. Essa alteração faz com que deixe de ser necessário retirar o sensor debaixo de água para tocar a bateria, permitindo a sua troca de forma mais rápida.

Estas são as principais melhorias sugeridas a realizar no sistema tendo em conta o trabalho desenvolvido. No entanto, tendo em vista um dispositivo mais completo e preciso no que diz respeito à monitorização e acompanhamento do crescimento do fitoplâncton podem ser implementadas outras melhorias como a monitorização de mais variáveis que influenciam de forma direta o ciclo de vida do fitoplâncton, como o pH e salinidade. Assim, existe além das melhorias sugeridas, outras que podem ser realizadas para evoluir e aperfeiçoar o sensor obtido.

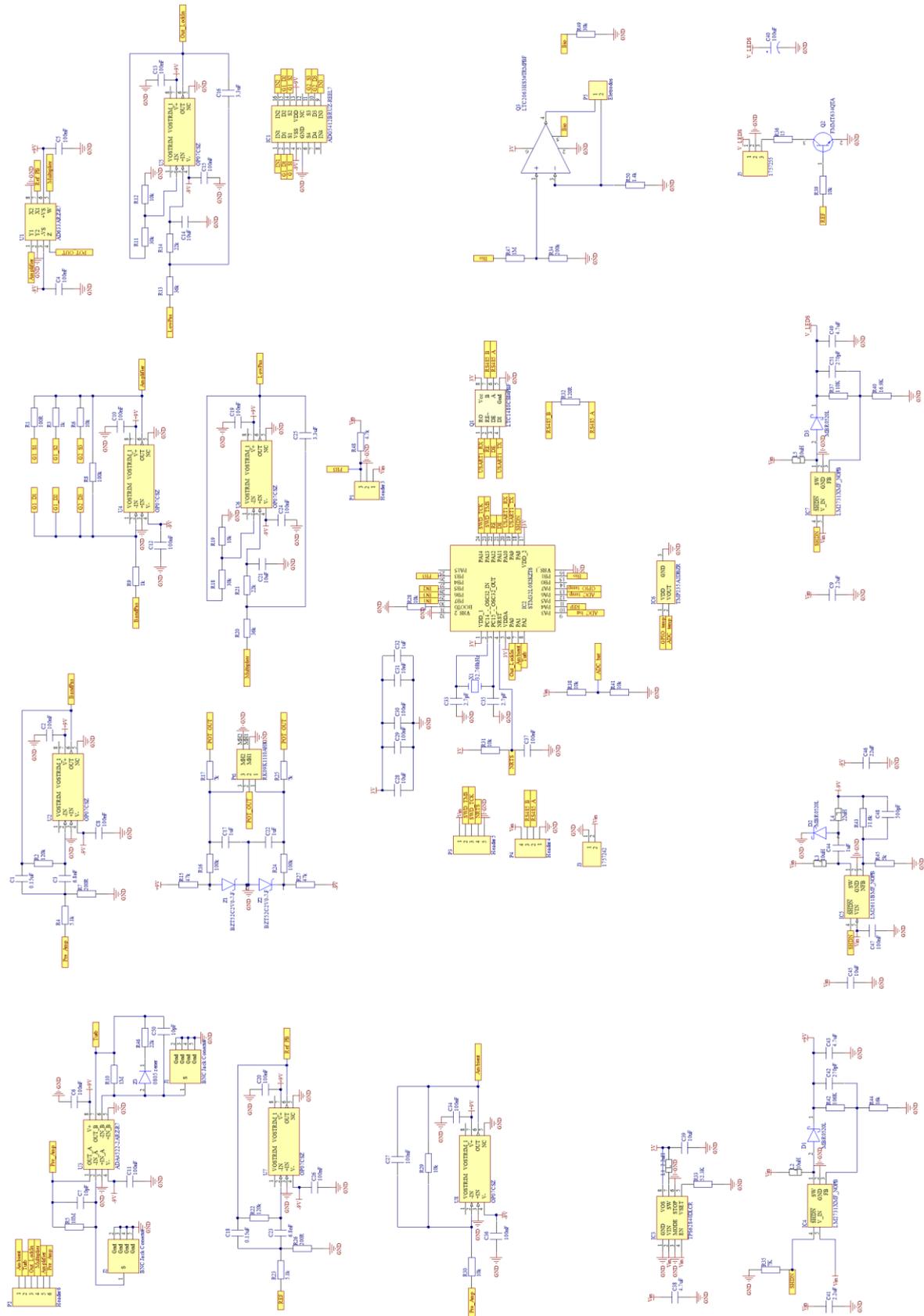
## Referências Bibliográficas

- [1] “INAG, I.P. 2009. Manual para a avaliação da qualidade biológica da água. Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P.”.
- [2] “Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation - Graham Harris - Google Livros.” [https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Yt7dBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT8&dq=Phytoplankton-Ecology&ots=1W5wOf\\_tdX&sig=M6bmTsVGIbD8EEDhi2RzeCTJWNc&redir\\_esc=y#v=onepage&q=Phytoplankton-Ecology&f=false](https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=Yt7dBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT8&dq=Phytoplankton-Ecology&ots=1W5wOf_tdX&sig=M6bmTsVGIbD8EEDhi2RzeCTJWNc&redir_esc=y#v=onepage&q=Phytoplankton-Ecology&f=false) (accessed Jun. 02, 2022).
- [3] M. Winder and U. Sommer, “Phytoplankton response to a changing climate,” *Hydrobiologia*, vol. 698, no. 1, pp. 5–16, Nov. 2012, doi: 10.1007/S10750-012-1149-2/FIGURES/1.
- [4] E. T. Peltomaa, S. L. Aalto, K. M. Vuorio, and S. J. Taipale, “The importance of phytoplankton biomolecule availability for secondary production,” *Front Ecol Evol*, vol. 5, no. OCT, p. 128, Oct. 2017, doi: 10.3389/FEVO.2017.00128/BIBTEX.
- [5] “What are phytoplankton?” <https://oceanservice.noaa.gov/facts/phyto.html> (accessed Jun. 06, 2022).
- [6] “Allain V., Griffiths S., Bell J. and Nicol S. 2015. Monitoring the pelagic ecosystem effects of different levels of fishing effort on the western Pacific Ocean warm pool. Issue-specific national report. Oceanic Fisheries Programme, Secretariat of the Pacific Community, Nouméa, New Caledonia.”
- [7] U. Sommer and K. Lengfellner, “Climate change and the timing, magnitude, and composition of the phytoplankton spring bloom,” *Glob Chang Biol*, vol. 14, no. 6, pp. 1199–1208, Jun. 2008, doi: 10.1111/J.1365-2486.2008.01571.X.
- [8] K. D. Friedland *et al.*, “Phenology and time series trends of the dominant seasonal phytoplankton bloom across global scales,” *Global Ecology and Biogeography*, vol. 27, no. 5, pp. 551–569, May 2018, doi: 10.1111/GEB.12717.
- [9] “Blooms off Both North American Coasts.” <https://earthobservatory.nasa.gov/images/86377/blooms-off-both-north-american-coasts> (accessed Jul. 06, 2022).
- [10] D. Kim, T. Oda, T. Muramatsu, D. Kim, Y. Matsuyama, and T. Honjo, “Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 132, no. 4, pp. 415–423, Aug. 2002, doi: 10.1016/S1532-0456(02)00093-5.
- [11] T. Nakashima, Y. Miyazaki, Y. Matsuyama, W. Muraoka, K. Yamaguchi, and T. Oda, “Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium  $\gamma$ -proteobacterium,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 73, no. 3, pp. 684–690, Dec. 2006, doi: 10.1007/S00253-006-0507-2/TABLES/2.
- [12] G. M. Hallegraeff, “Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge,” *Journal of Phycology*, vol. 46, no. 2, pp. 220–235, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x.
- [13] “ESA - Search.” <https://www.esa.int/eseach?q=red+tides> (accessed Jul. 06, 2022).
- [14] “ESA - Algae blooms.” [https://www.esa.int/Applications/Observing\\_the\\_Earth/Algae\\_blooms](https://www.esa.int/Applications/Observing_the_Earth/Algae_blooms) (accessed Jul. 06, 2022).
- [15] J. Beardall, S. Stojkovic, and S. Larsen, “Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton Living in a high CO<sub>2</sub> world,” *Plant Ecol Divers*, vol. 2, no. 2, pp. 191–205, 2009, doi: 10.1080/17550870903271363.
- [16] “What are Phytoplankton?” <https://earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton> (accessed Dec. 31, 2021).
- [17] J. F. Tweddle, M. Gubbins, and B. E. Scott, “Should phytoplankton be a key consideration for marine management?” *Mar Policy*, vol. 97, pp. 1–9, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.MARPOL.2018.08.026.
- [18] “How much oxygen comes from the ocean?” <https://oceanservice.noaa.gov/facts/ocean-oxygen.html> (accessed Jan. 06, 2022).
- [19] B. Guterres, S. Khalid, M. Pias, S. Silva, and C. Botelho, “A data integration pipeline towards reliable monitoring of phytoplankton and early detection of harmful algal blooms”.
- [20] L. Roselli, S. Bevilacqua, and A. Terlizzi, “Using null models and species traits to optimize phytoplankton monitoring: An application across oceans and ecosystems,” *Ecol Indic*, vol. 138, May 2022, doi: 10.1016/J.ECOLIND.2022.108827.
- [21] M. Tamm *et al.*, “Boosting the monitoring of phytoplankton in optically complex coastal waters by combining pigment-based chemotaxonomy and in situ radiometry,” *Ecol Indic*, vol. 97, pp. 329–340, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.ECOLIND.2018.10.024.
- [22] J. Gower, S. King, and P. Goncalves, “Global monitoring of plankton blooms using MERIS MCI,” <https://doi.org/10.1080/01431160802178110>, vol. 29, no. 21, pp. 6209–6216, Nov. 2008, doi: 10.1080/01431160802178110.
- [23] “Maximum Chlorophyll Index (MCI) - Euro Data Cube Public Collections.” <https://collections.eurodatacube.com/xcube-gen-s2/mci/> (accessed Jul. 19, 2022).

- [24] S. D. Batten *et al.*, "A global Plankton diversity monitoring program," *Front Mar Sci*, vol. 6, no. APR, p. 321, 2019, doi: 10.3389/FMARS.2019.00321/BIBTEX.
- [25] "Global Alliance of Continuous Plankton Recorder Surveys | CPR Survey." <https://www.cprsurvey.org/about-us/global-alliance-of-cpr-surveys/> (accessed Jul. 19, 2022).
- [26] "National Phytoplankton Monitoring Network - NCCOS Coastal Science Website." <https://coastalscience.noaa.gov/project/national-phytoplankton-monitoring-network/> (accessed Jul. 07, 2022).
- [27] "Phytoplankton Monitoring Network | National Centers for Environmental Information (NCEI)." <https://www.ncei.noaa.gov/products/phytoplankton-monitoring-network> (accessed Jul. 07, 2022).
- [28] "Chlorophyll & Sea Surface Temperature." [https://earthobservatory.nasa.gov/global-maps/MY1DMM\\_CHLORA/MYD28M](https://earthobservatory.nasa.gov/global-maps/MY1DMM_CHLORA/MYD28M) (accessed Jul. 20, 2022).
- [29] "What are phytoplankton?," Accessed: Jul. 07, 2022. [Online]. Available: [www.catchments.ie](http://www.catchments.ie)
- [30] "IPMA - Análises de Fitoplâncton." <https://www.ipma.pt/pt/bivalves/fito/> (accessed Jul. 20, 2022).
- [31] "Fitoplâncton e ecotoxicidade - INSA." <https://www.insa.min-saude.pt/fitoplancton-e-ecotoxicidade/> (accessed Jul. 06, 2022).
- [32] "Técnicas de amostragem de água para análise de fitoplâncton - INSA." <https://www.insa.min-saude.pt/tecnicas-de-amostragem-de-agua-para-analise-de-fitoplancton/> (accessed Jul. 06, 2022).
- [33] "What are Phytoplankton?" <https://earthobservatory.nasa.gov/features/Phytoplankton> (accessed Nov. 25, 2021).
- [34] *Intergovernmental Oceanographic Commission of @UNESCO. 2010. Karlson, B., Cusack, C. and Bresnan, E. (editors). Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, no. 55.) (IOC/2010/MG/55) 110 pages.* doi: 10.25607/OBP-1371.
- [35] "Microscópios invertidos | Olympus LS." <https://www.olympus-lifescience.com/pt/microscopes/inverted/> (accessed Dec. 30, 2021).
- [36] M. R. Vadrucci *et al.*, "PhytoNumb3rs: An easy-to-use computer toolkit for counting microalgae by the Utermöhl method," *Ecol Inform*, vol. 46, pp. 147–155, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.ECOINF.2018.06.007.
- [37] R. Paxinos and J. G. Mitchell, "A rapid Utermöhl method for estimating algal numbers," *J Plankton Res*, vol. 22, no. 12, pp. 2255–2262, Dec. 2000, doi: 10.1093/PLANKT/22.12.2255.
- [38] "Câmara de placa combinada (Câmara de Utermöhl) Hydro-Bios - BIOWEB Global." <https://america.bioweb.co/products/combined-plate-chamber-utermohl-chamber-hydro-bios?variant=441505197> (accessed Dec. 30, 2021).
- [39] J. F. Humbert, C. Quiblier, and M. Gugger, "Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species," *Anal Bioanal Chem*, vol. 397, no. 5, pp. 1723–1732, Jul. 2010, doi: 10.1007/S00216-010-3642-7/FIGURES/3.
- [40] L. Zeng and D. Li, "Development of in situ sensors for chlorophyll concentration measurement," *J Sens*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/903509.
- [41] R. Su, X. Chen, Z. Wu, P. Yao, and X. Shi, "Assessment of phytoplankton class abundance using fluorescence excitation-emission matrix by parallel factor analysis and nonnegative least squares," *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 2015 33:4, vol. 33, no. 4, pp. 878–889, Jun. 2015, doi: 10.1007/S00343-015-4179-6.
- [42] Y. Gao, Y. Hu, C. Liu, X. Wang, and Z. Shi, "In-site chlorophyll-a fluorometer based on lock-in amplifier," *SPIE-Intl Soc Optical Eng*, Jan. 2019, p. 28. doi: 10.1117/12.2505482.
- [43] C. D. C. da Silva, "Desenvolvimento de circuito de leitura para medição de clorofila in-situ," 2017, Accessed: Nov. 17, 2021. [Online]. Available: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/56158>
- [44] A. Chekalyuk, A. Barnard, A. Quigg, M. Hafez, and Y. Zhao, "Advanced Laser Fluorometry (ALF): New Technology for Oceanography and Environmental Monitoring", doi: 10.1016/j.dsr2.2013.12.004.
- [45] A. Chekalyuk, A. Barnard, A. Quigg, M. Hafez, and Y. Zhao, "Aquatic laser fluorescence analyzer: field evaluation in the northern Gulf of Mexico," *Optics Express*, Vol. 22, Issue 18, pp. 21641-21656, vol. 22, no. 18, pp. 21641–21656, Sep. 2014, doi: 10.1364/OE.22.021641.
- [46] J. Kuha, M. Järvinen, P. Salmi, and J. Karjalainen, "Calibration of in situ chlorophyll fluorometers for organic matter," *Hydrobiologia*, vol. 847, no. 21, pp. 4377–4387, Dec. 2020, doi: 10.1007/s10750-019-04086-z.
- [47] B. Cremella, Y. Huot, and S. Bonilla, "Interpretation of total phytoplankton and cyanobacteria fluorescence from cross-calibrated fluorometers, including sensitivity to turbidity and colored dissolved organic matter," *Limnol Oceanogr Methods*, vol. 16, no. 12, pp. 881–894, Dec. 2018, doi: 10.1002/LOM3.10290.
- [48] H. Hamdhani, D. E. Eppehimer, D. Walker, and M. T. Bogan, "Performance of a handheld chlorophyll-a fluorometer: Potential use for rapid algae monitoring," *Water (Switzerland)*, vol. 13, no. 10, p. 1409, May 2021, doi: 10.3390/W13101409/S1.
- [49] "Qualidade da Água | Lunus." <https://www.lunus.com.br/qualidadedaagua> (accessed Dec. 30, 2021).
- [50] E. Garel and Ó. Ferreira, "Monitoring estuaries using non-permanent stations: Practical aspects and data examples," *Ocean Dyn*, vol. 61, no. 7, pp. 891–902, Apr. 2011, doi: 10.1007/S10236-011-0417-4/FIGURES/11.

- [51] E. Garel *et al.*, “The autonomous Simpatico system for real-time continuous water-quality and current velocity monitoring: Examples of application in three Portuguese estuaries,” *Geo-Marine Letters*, vol. 29, no. 5, pp. 331–341, 2009, doi: 10.1007/S00367-009-0147-5.
- [52] T. Leeuw, E. S. Boss, and D. L. Wright, “In situ Measurements of Phytoplankton Fluorescence Using Low Cost Electronics,” *Sensors 2013, Vol. 13, Pages 7872-7883*, vol. 13, no. 6, pp. 7872–7883, Jun. 2013, doi: 10.3390/S130607872.
- [53] J. F. R. Gower, L. Brown, and G. A. Borstad, “Observation of chlorophyll fluorescence in west coast waters of Canada using the MODIS satellite sensor,” *Canadian Journal of Remote Sensing*, vol. 30, no. 1, pp. 17–25, Jan. 2004, doi: 10.5589/M03-048.
- [54] “Chlorophyll.” [https://earthobservatory.nasa.gov/global-maps/MY1DMM\\_CHLORA](https://earthobservatory.nasa.gov/global-maps/MY1DMM_CHLORA) (accessed Jul. 20, 2023).
- [55] R. J. Olson, E. R. Zettler, and O. K. Anderson, “Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry,” *Cytometry*, vol. 10, no. 5, pp. 636–643, 1989, doi: 10.1002/CYTO.990100520.
- [56] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, and A. Nalbant, “Flow cytometry: basic principles and applications,” *Crit Rev Biotechnol*, vol. 37, no. 2, pp. 163–176, 2017, doi: 10.3109/07388551.2015.1128876.
- [57] G. B. J. Dubelaar and R. R. Jonker, “Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton,” *Sci Mar*, vol. 64, no. 2, pp. 135–156, Jun. 2000, doi: 10.3989/SCIMAR.2000.64N2135.
- [58] E. J. Buskey and C. J. Hyatt, “Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples,” *Harmful Algae*, vol. 5, no. 6, pp. 685–692, Dec. 2006, doi: 10.1016/J.HAL.2006.02.003.
- [59] “FlowCam 8000 | Flow Imaging Microscope and Particle Analyzer.” <https://www.fluidimaging.com/products/flowcam-8000> (accessed Dec. 30, 2021).
- [60] “Orozco, Luis. ‘Synchronous detectors facilitate precision, low-level measurements.’ *Analog Dialogue* 48.11 (2014): 1-5.”.
- [61] “Enclosure with membrane lid.” <https://www.bopla.de/en/enclosure-technology/bocube-alu/enclosure-with-membrane-lid-light-grey-hinged> (accessed May 26, 2023).
- [62] B. Z. Rousso, E. Bertone, R. A. Stewart, K. Rinke, and D. P. Hamilton, “Light-induced fluorescence quenching leads to errors in sensor measurements of phytoplankton chlorophyll and phycocyanin,” *Water Res*, vol. 198, p. 117133, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.WATRES.2021.117133.

# Apêndice I – Esquemático do sensor



## Apêndice II – Lista de material

Componente	Quantidade
ADG5412BRUZ-REEL7 - Circuito de switch	1
STM32L082KZT6 - Microcontrolador	1
TPS62840DLCR - Regulador 3V	1
LM2731XMF_NOPB - Regulador 9V	2
LM2611BMF_NOPB - Regulador -9V	1
TMP235A2DBZR - Sensor temperatura	1
LTC1480CS8#PBF - RS485 drive	1
FMMT634QTA - Transistor	1
LTC2063HS5#TRMPBF - Ampop	1
AD633ARZ-R7 – Ampop Multiplicador	1
OP07CSZ - Ampop	6
ADA4522-2ARZ-R7 - Ampop	1
NX3215SA - Cristal 32,7kHz	1
Conector - BNC	2
Conector - 2 pins macho	1
Conector - 3 pins macho	1
Conector - 3 pins fêmea	1
Conector - 2 pins fêmea	1
Bobina - 2,2uH	1
Bobina - 10uH	3
Bobina - 22uH	1
MBR0520L - Diodo de zener	3
BZT52C2V0-7-F - Diodo de zener	2
Condensador - 2,7pF	2
Condensador - 10pF	2
Condensador - 270pF	2
Condensador - 500pF	1
Condensador - 6,8nF	2
Condensador - 10nF	1
Condensador - 100nF	21

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
Condensador - 150nF	2
Condensador - 1uF	4
Condensador - 2,2uF	2
Condensador - 3,3uF	2
Condensador - 4,7uF	3
Condensador - 10uF	5
Condensador - 22uF	1
Condensador - 100uF	1
Resistência - 100Ω	1
Resistência - 120Ω	2
Resistência - 1kΩ	3
Resistência - 5,1kΩ	2
Resistência - 10MΩ	1
Resistência - 10kΩ	10
Resistência - 200Ω	2
Resistência - 100kΩ	3
Resistência - 1MΩ	2
Resistência - 47kΩ	2
Resistência - 30kΩ	2
Resistência - 36kΩ	2
Resistência - 22kΩ	2
Resistência - 52,3kΩ	1
Resistência - 16,9kΩ	2
Resistência - 31,6kΩ	1
Resistência - 110kΩ	2
Resistência - 5kΩ	1
Resistência - 200kΩ	1
Resistência - 1,4kΩ	1
Resistência - 15Ω	1
Resistência - 60kΩ	1
Resistência - 4,7kΩ	1
RK09K1110AH8 - Potenciômetro 20kΩ	1



## Função de medição da bateria

```

//*****Le Bateria*****//
int get_bat(){
    ADC_ChannelConfTypeDef sConfig;
    int val=0;

    HAL_ADC_Start(&hadc);
    if(HAL_ADC_PollForConversion(&hadc,5)==HAL_OK){
        val=(int)HAL_ADC_GetValue(&hadc);
    }
    HAL_ADC_Stop(&hadc);

    return val;
}

```

## Ciclo de medição na main

```

//get_clph();
HAL_Delay(13000);

for(int i=0;i<1;i++){

    HAL_GPIO_WritePin(IN1_GPIO_Port, IN1_Pin, GPIO_PIN_RESET);
    HAL_GPIO_WritePin(IN2_GPIO_Port, IN2_Pin, GPIO_PIN_RESET);
    HAL_GPIO_WritePin(IN3_GPIO_Port, IN3_Pin, GPIO_PIN_RESET);

    HAL_Delay(2000);

    //ganho 100
    val_clph[3]=get_clph();
    HAL_Delay(4000);
    //ganho 10
    HAL_GPIO_WritePin(IN3_GPIO_Port, IN3_Pin, GPIO_PIN_SET);
    val_clph[2]=get_clph();
    HAL_Delay(4000);
    HAL_GPIO_WritePin(IN3_GPIO_Port, IN3_Pin, GPIO_PIN_RESET);

    //ganho 1
    HAL_GPIO_WritePin(IN2_GPIO_Port, IN2_Pin, GPIO_PIN_SET);
    val_clph[1]=get_clph();
    HAL_Delay(4000);
    HAL_GPIO_WritePin(IN2_GPIO_Port, IN2_Pin, GPIO_PIN_RESET);

    //ganho 0.1
    HAL_GPIO_WritePin(IN1_GPIO_Port, IN1_Pin, GPIO_PIN_SET);
    val_clph[0]=get_clph();
    HAL_Delay(4000);
    HAL_GPIO_WritePin(IN1_GPIO_Port, IN1_Pin, GPIO_PIN_RESET);

    HAL_Delay(2000);
}

//temperatura
temp=get_temp();

//luz ambiente
val_amb=get_amb();

//turbidez
val_turb=get_turb();
HAL_Delay(5000);

//bateria
bat=get_bat();

```

```
//le temperatura exterior
Presence = DS18B20_Start ();
HAL_Delay (1);
DS18B20_Write (0xCC); // skip ROM
DS18B20_Write (0x44); // convert t
HAL_Delay (800);

Presence = DS18B20_Start ();
HAL_Delay(1);
DS18B20_Write (0xCC); // skip ROM
DS18B20_Write (0xBE); // Read Scratch-pad

Temp_byte1 = DS18B20_Read();
Temp_byte2 = DS18B20_Read();
TEMP = (Temp_byte2<<8)|Temp_byte1;
Temperature = (float)TEMP/16;
```

Trama de dados enviada epla porta serie para o datalogger

```
sprintf(txData, "C%.3f%.3f%.3f_c%.3f%.3f%.3f_o%.3f_bat%.3f_temp_ext%.3f", (float)((temp*300.0/4095.0)-59),
(float)(val_amb*3/4095.0), (float)(val_turb*3/4095.0), (float)(val_clph[0]*3/4095.0), (float)(val_clph[1]*3/4095.0),
(float)(val_clph[2]*3/4095.0), (float)(val_clph[3]*3/4095.0), (float)(offset*3/4095.0), (float)((bat*3/4095.0)*2), Temperature);
```