



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Júlio André Vilas Boas Gonçalves

Sistema de Leitura Ótica para Diagnóstico de Malária

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia de Eletrónica Industrial e Computadores

Trabalho efetuado sob a orientação de

Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas

Doutora Susana Oliveira Catarino

Junho de 2022

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Nome: Júlio André Vilas Boas Gonçalves

Título da dissertação: Sistema de leitura ótica para diagnóstico de malária

Orientadores:

Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas

Doutora Susana Oliveira Catarino

Ano de conclusão: 2022

Mestrado em Engenharia Electrónica Industrial e Computadores

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

CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer às minhas orientadoras, à Professora Doutora Graça Minas e à Doutora Susana Catarino, que se mostraram sempre disponíveis para me orientar e auxiliar no desenvolvimento deste projeto de dissertação. Gostaria, no entanto, de deixar uma palavra de apreço extra à Doutora Susana Catarino por todas as horas extras, por toda a motivação, apoio e amizade. Considero-me uma pessoa muito afortunada pela oportunidade de trabalhar com tão excelente investigadora.

Agradeço também a todos os alunos, professores e investigadores do CMEMS, com quem tive a oportunidade partilhar desafios, conhecimento e o ocasional momento de procrastinação saudável. Deixo, igualmente, um agradecimento especial ao Professor Doutor Paulo Mendes, ao Hugo Dinis, ao Vítor Silva, ao Ivo Colmiais e ao Rui Silva.

Um obrigado muito especial aos meus queridos pais e irmão, que levaram muitas vezes com os momentos maus, sem nunca deixarem de me apoiar. Obrigado, Isaura, pela paciência especial demonstrada nos últimos anos. Deixo um último agradecimento aos amigos, pelo apoio e anos de companhia.

O trabalho desenvolvido teve o apoio do projeto MalariaChip, NORTE-01-0145-FEDER-028178, financiado pelo Programa Operacional Regional do Norte (NORTE 2020), sob o Acordo de Parceria PORTUGAL 2020, através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), IP.

NORTE-01-0145-FEDER-028178



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

Metade da população mundial, em particular em regiões de subdesenvolvimento económico, encontra-se em risco de contrair o parasita da malária, pelo que é urgente o desenvolvimento de métodos diagnóstico eficientes, capazes de detetar a doença na sua fase inicial, rápidos, específicos, de baixo custo e de fácil utilização.

A presente dissertação integra um projeto de investigação com o principal objetivo de desenvolver sistemas de deteção de malária através da identificação e quantificação ótica de hemozoína. O objetivo desta dissertação passa pelo desenvolvimento de um sistema eletrónico capaz de identificar e quantificar a presença de hemozoína numa amostra por espectrofotometria de absorção ótica, com dimensões reduzidas, baixo consumo energético, autónomo, de utilização simples, reutilizável e com um custo de utilização reduzido. À medida que o parasita da malária se desenvolve nos glóbulos vermelhos humanos, consome hemoglobina e produz hemozoína, que é um cristal com características óticas específicas e distintas do sangue humano. Assim, o dispositivo proposto baseia-se nas diferenças entre os espectros de absorção ótica do sangue total e da hemozoína à medida que a doença da malária progride. Deste modo, desenvolveu-se um dispositivo eletrónico portátil, baseado num sistema de deteção por espectrofotometria de absorbância, recorrendo apenas a quatro comprimentos de onda do espectro de luz (520, 635, 661 e 783 nm). O sistema foi integrado numa plataforma fluídica, e incluiu díodos laser como emissores, fotodíodos como detetores, eletrónica de aquisição e controlo, assim como um algoritmo de atuação e leitura programado num microcontrolador. Desenvolveram-se duas abordagens de encapsulamento para o sistema de leitura, compatíveis com diferentes poços e reservatórios para as amostras. O sistema foi testado com amostras de diferentes concentrações, até um limite de deteção de 1 µg/mL de hemozoína em sangue total. O dispositivo desenvolvido foi capaz de identificar variações na absorbância, permitindo, através dos quatro comprimentos de onda reproduzir as principais oscilações dos espectros de absorção da hemozoína e do sangue total. Os resultados obtidos demonstram, assim, que a utilização de sistemas óticos portáteis poderá ser a resposta para colmatar as limitações atuais dos métodos e tecnologias de diagnóstico da malária.

Palavras-Chave: Díodos Laser; Espectrofotometria; Malária; Microsistema; Ótica.

ABSTRACT

Half of the world's population, particularly in economically underdeveloped regions, is at risk of contracting malaria. So, the development of efficient, fast, specific, low cost and user-friendly diagnostic methods, able to detect the disease in its initial phase, is urgent.

This dissertation is part of a research project with the main objective of developing malaria detection systems through the identification and optical quantification of hemozoin. The objective of this dissertation is the development of an electronic system capable of identifying and quantifying the presence of hemozoin in a sample by optical absorption spectrophotometry. Such system must be small, with low energy consumption, autonomous, simple to use, reusable and low cost. As the malaria parasite develops in human red blood cells, it consumes hemoglobin and produces hemozoin, which is a crystal with specific and optical characteristics distinct from human blood. Therefore, the proposed device is based on the differences between the optical absorption spectra of whole blood and hemozoin as the malarial disease progresses. Thus, a portable electronic device was developed, based on a detection system by absorbance spectrophotometry, using only four wavelengths of the light spectrum (520, 635, 661 and 783 nm). The system was integrated in a fluidic platform, and included laser diodes as emitters, photodiodes as detectors, acquisition and control electronics, as well as an actuation and reading algorithm programmed in a microcontroller. Two encapsulation approaches were developed for the reading system, compatible with different wells and reservoirs for the samples. The system was tested with different concentration samples, up to a detection limit of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of hemozoin in whole blood. The developed device was able to identify variations in absorbance, allowing, through the four wavelengths, to reproduce the main oscillations of the absorption spectra of hemozoin and whole blood. The results obtained enhance that the use of portable optical systems can be the answer to overcome the current limitations of malaria diagnostic methods and technologies.

Keywords: Laser Diodes; Malaria; Microsystem; Optics; Spectrophotometry.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xiii
1. Introdução.....	15
1.1 Enquadramento.....	15
1.2 Motivação e Objetivos.....	18
1.3 Organização da Dissertação.....	20
2. Estado da Arte.....	21
2.1 Fundamentos Teóricos da Espectrofotometria.....	21
2.2 Estado da Arte de Dispositivos Óticos em Diagnóstico de Malária.....	22
3. Desenvolvimento do dispositivo ótico para Quantificação de Hemozoína.....	27
3.1 Testes Preliminares – Caracterização Ótica das Amostras.....	27
3.2 Dimensionamento, Atuação e Caracterização dos Díodos Laser.....	31
3.3 Dimensionamento e Caracterização do Circuito de Aquisição e Leitura.....	37
3.4 Integração e Protótipo.....	41
3.5 Encapsulamento.....	44
3.5.1 Primeira Abordagem.....	45
3.5.2 Segunda Abordagem.....	46
3.6 Algoritmo de Aquisição e Processamento.....	47
4. Resultados e Discussão.....	50
4.1 Testes da Abordagem 1.....	50
4.2 Testes da Abordagem 2.....	54
4.2.1 Amostras de Hz.....	54
4.2.2 Amostras de Sangue Total.....	55
4.2.3 Amostras de Sangue Total com Hz.....	57
5. Conclusões e Trabalho Futuro.....	62

5.1	Conclusões	62
5.2	Trabalho Futuro	63
	Bibliografia	64
	Anexo I - Esquema do circuito de atuação completo	68
	Anexo II – Esquema do circuito de leitura completo.....	69
	Anexo III – Esquema do circuito da matriz de díodos laser.....	70
	Anexo IV – Esquema do circuito da matriz de fotodíodos	71
	Apêndice I – Código Implementado no microcontrolador	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1-Representação esquemática do ciclo de vida do parasita da malária. Reproduzido de [4], Copyright 2021 <i>American Chemical Society</i>	16
Figura 2.1 -Desenho CAD do protótipo desenvolvido para detecção e quantificação de hemozoína em sangue total por absorvância ótica, com base em 6 comprimentos de onda. Adaptado de Catarino et al. [16] , Copyright © 2020, IEEE.....	24
Figura 3.1- Diagrama da montagem experimental utilizada.....	28
Figura 3.2 -Curva característica dada pela corrente (A) lida aos terminais do fotodíodo em função do comprimento de onda (nm) utilizado na montagem experimental.	28
Figura 3.3- Espectro de absorvância (u.a.) de sangue total em diferentes concentrações, de 0,05 g/L a 1 g/L, entre os 400 nm e os 750 nm.	29
Figura 3.4- Espectro de absorvância (u.a) de amostras de Hz suspensas em água, em diferentes concentrações, entre os 400 nm e os 750 nm: a) concentrações de 1 µg/mL a 40 µg /mL; b) detalhe dos espectros para as concentrações de Hz de 1 µg/mL, 3 µg /mL e 5 µg /mL.....	30
Figura 3.5- Circuito limitador de corrente baseado num circuito integrado LM317 [45].	32
Figura 3.6- Circuito de atuação completo: Limitador de corrente e interruptor. DC- fonte de alimentação; LM317- limitador de corrente; R1- resistência de dimensionamento; C- condensador de estabilização; R2- resistência da base; Q1- transistor; P1- porto de conexão com o microcontrolador; P2- porto de conexão com o díodo laser.....	33
Figura 3.7- Representação gráfica das curvas espectrais de corrente (A) obtidas, para os díodos laser: a) PL 520_B2 (520 nm); b) ADL-63054TL (635 nm); c) LNCQ28PS01WW (661 nm); d) LNC728PS01WW (783 nm).....	34
Figura 3.8- Distribuição da emissão ótica dos quatro díodos laser, apresentada na forma de corrente normalizada em função do comprimento de onda.	36
Figura 3.9-Responsividade relativa em função do comprimento de onda para os fotodíodos (reproduzido dos respetivos datasheets): a) TSL250R [30], utilizado para comprimentos de onda de 520 nm e 635 nm; b) BPW34 [31], utilizado para comprimentos de onda de 661 nm e 783 nm.....	37
Figura 3.10- Corrente (mA) ao longo do tempo, medida com o fotodíodo BPW34, quando atuado pelos díodos laser: a) PL 520_B2 (520 nm); b) ADL-63054TL (635 nm); c) LNCQ28PS01WW (661 nm); d) LNC728PS01WW (783 nm).....	38

Figura 3.11- Circuito de transimpedância com filtro passa-baixo (PB): R1- resistência de transimpedância; C1- condensador de estabilização; R2- resistência do filtro PB; C2- condensador do filtro PB; P1- porto de conexão com fotodiodo; P2- porto de conexão com microcontrolador.....	40
Figura 3.12- PCBs desenhadas para a primeira configuração do sistema: a) PCB de emissão; b) PCB de recepção. Cada placa tem uma dimensão de 6 cm × 23 cm.....	42
Figura 3.13 – a) Diagrama da primeira configuração adotada. Duas PCBs, contendo toda a eletrônica de instrumentação e controlo, posicionadas paralelamente na horizontal com o reservatório para amostra no seu meio. b) Reservatório para amostras: Quatro poços em PDMS com 3 mm de diâmetro, 3 mm de altura e com uma distância de 3 mm entre poços (caminho ótico de 3 mm).	42
Figura 3.14- Esquemas e fotos das PCBs desenvolvidas para a segunda configuração: a) Modelo CAD (<i>computer-aided design</i>) da PCB de instrumentação e controlo; b) Fotografia da implementação final da PCB de instrumentação e controlo; c) Modelo CAD da PCB da matriz de díodos laser; d) Fotografia da implementação final da PCB da matriz de díodos laser; e) Modelo CAD da PCB da matriz de fotodiodos; f) Fotografia da implementação final da PCB da matriz de fotodiodos.	44
Figura 3.15- Primeira abordagem de encapsulamento para as amostras: a) Modelo em CAD; b) Fotografia da implementação (cada quadrado da escala corresponde a 1 cm).....	45
Figura 3.16- Suporte principal da segunda iteração de encapsulamento. À esquerda apresenta-se a vista em perspectiva, da face de acoplamento da PCB com a matriz de fotodiodos visível. A dimensão apresentada corresponde à dimensão do quadrado interior. Ao centro apresenta-se a face de acoplamento da PCB com a matriz de díodos laser, com as suas dimensões exteriores. À direita apresenta-se o reservatório para amostras: Cuvete em polimetilacrilato com 1 cm de lado, 4,5 cm de altura e 3 ml de capacidade, e caminho ótico de 1 cm.....	47
Figura 3.17- Implementação final da segunda abordagem de encapsulamento: a) Modelo em CAD, em que para auxiliar a visualização, a alguns componentes foi aplicada transparência; b) Fotografia da implementação (cada quadrado da escala corresponde a 1 cm).....	47
Figura 3.18- Ordem de atuação dos díodos laser: 1° PL 520_B2 (520 nm); 2° ADL-63054TL (635 nm); 3° LNC728PS01WW (783 nm); 4° LNCQ28PS01WW (661 nm).	48
Figura 3.19 - Exemplo de saída do algoritmo implementado.	49
Figura 4.1- Fluxograma do processo de normalização dos dados medidos na entrada do microcontrolador: p _x - entradas analógicas do microcontrolador; V _{pk} - tensão medida; f. - fator multiplicador de calibração.....	52

Figura 4.2- Espectro de absorção (u.a.) de Hz nas concentrações: 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL; 14 µg/mL; 16 µg/mL; 18 µg/mL; 20 µg/mL: a) Teste com os díodos laser PL 520_B2 (520 nm) e ADL-63054TL (635 nm) atuados a 100% do <i>duty cycle</i> e os díodos laser LNCQ28PS01WW (661 nm) e LNC728PS01WW (783 nm) a 25%. b) Teste com os díodos laser atuados a 100% do <i>duty cycle</i>	53
Figura 4.3- Espectro de absorção (u.a.) de Hz nas concentrações: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.....	55
Figura 4.4- Exemplo de cuvetes de amostra contendo sangue total nas concentrações (da esquerda para a direita): 0% (vazio); 1%; 10%; 100%.....	56
Figura 4.5- Espectro de absorção (u.a.) do sangue total nas concentrações/diluições: 1%, 10%, 25%, 100%.....	57
Figura 4.6 – Tubos de ensaio contendo amostras com 10% de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.....	58
Figura 4.7- Espectro de absorção (u.a.) para as amostras de 1% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.....	59
Figura 4.8- Espectro de absorção (u.a.) para as amostras de 10% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diodos laser utilizados na implementação do sistema.	31
Tabela 2 - Parâmetros do transistor.	33
Tabela 3 - Dimensionamento do circuito de atuação dos diodos laser.	33
Tabela 4- Valores de comprimento de onda real e FWHM.	35
Tabela 5- Resultados da densidade de potência ótica dos diodos laser medidos no Powermeter.	36
Tabela 6 – Lista de diodos laser utilizados e fotodiodos correspondentes.	39
Tabela 7- Valores das resistências teóricas e reais, em função da corrente, para a implementação dos circuitos de transimpedância.	41
Tabela 8 -Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de Hz nas concentrações: 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL; 14 µg/mL; 16 µg/mL; 18 µg/mL; 20 µg/mL. Teste com os diodos laser PL 520_B2 (520 nm) e ADL-63054TL (635 nm) atuados a 100% do <i>duty cycle</i> e os diodos laser LNCQ28PS01WW (661 nm) e LNC728PS01WW (783 nm) a 25%.	51
Tabela 9- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de Hz nas concentrações: 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL; 14 µg/mL; 16 µg/mL; 18 µg/mL; 20 µg/mL. Teste com os diodos laser atuados a 100% do duty cycle.	51
Tabela 10- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de Hz nas concentrações: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.	54
Tabela 11- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de sangue total com concentrações de: 1%, 10%, 25%, 100% (obtidas por diluição).	56
Tabela 12- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de 1% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.	58
Tabela 13- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de 10% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.	59
Tabela 14- Especificações finais do dispositivo.	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

CAD – Desenho assistido por computador (do inglês *computer-aided design*)

CMEMS - Centro de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da universidade do Minho

CMOS - Metal-óxido-semicondutor complementar (do inglês *complementary metal-oxide-semiconductor*)

FWHM – Largura a meia altura (do inglês: *full width at half maximum*)

Hb – Hemoglobina

Hz – Hemozoína

IPST - Instituto Português do Sangue e da Transplantação

ITO – Óxido de índio e estanho (do inglês *bonded Indium tin oxide*)

LED – Diodos emissores de luz (do inglês *light emission diode*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCB – Placa de circuito impresso

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PDMS – Polidimetilsiloxano (do inglês *polydimethylsiloxane*)

PLA – Poliacido láctico (do inglês *polylactic acid*)

PMA – Polimetilacrilato

PWM – Modulação por largura de pulso (do inglês *pulse width modulation*)

TDR – Testes de diagnóstico rápido

TVS– Supressor de Tensões Transientes (do inglês: *transient-voltage-suppression*)

1. INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta o âmbito da presente dissertação, o qual está dividido em diferentes subcapítulos onde serão expostos, respetivamente: o seu enquadramento, a motivação e objetivos do trabalho desenvolvido e, por fim, a será descrita a organização do respetivo documento.

1.1 Enquadramento

A malária é transmitida ao humano através das picadas de mosquitos *Anopheles* femininos infetados. Existem cerca de 100 espécies do género, capazes de transmitir malária, das quais 40 são consideradas veículo transmissor para parasitas da espécie *Plasmodium*. Em 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou uma estimativa de 241 milhões de casos mundiais de malária, valor que aumentou relativamente ao ano anterior com 224 milhões de casos reportados [1]. Desses, 95% dos casos reportados de infeção ocorreram na zona subsaariana de África. A concentração da doença nesta região complica o seu controlo, uma vez que estes países muitas vezes carecem de meios técnicos adequados, nomeadamente em infraestruturas médicas, sanitárias e laboratoriais, dificultando um diagnóstico atempado e preciso [2][3].

De modo a enquadrar o presente trabalho, é importante compreender o ciclo de vida dos parasitas. As espécies *Plasmodium* apresentam um ciclo de vida complexo, de acordo com o esquema apresentado na Figura 1.1.

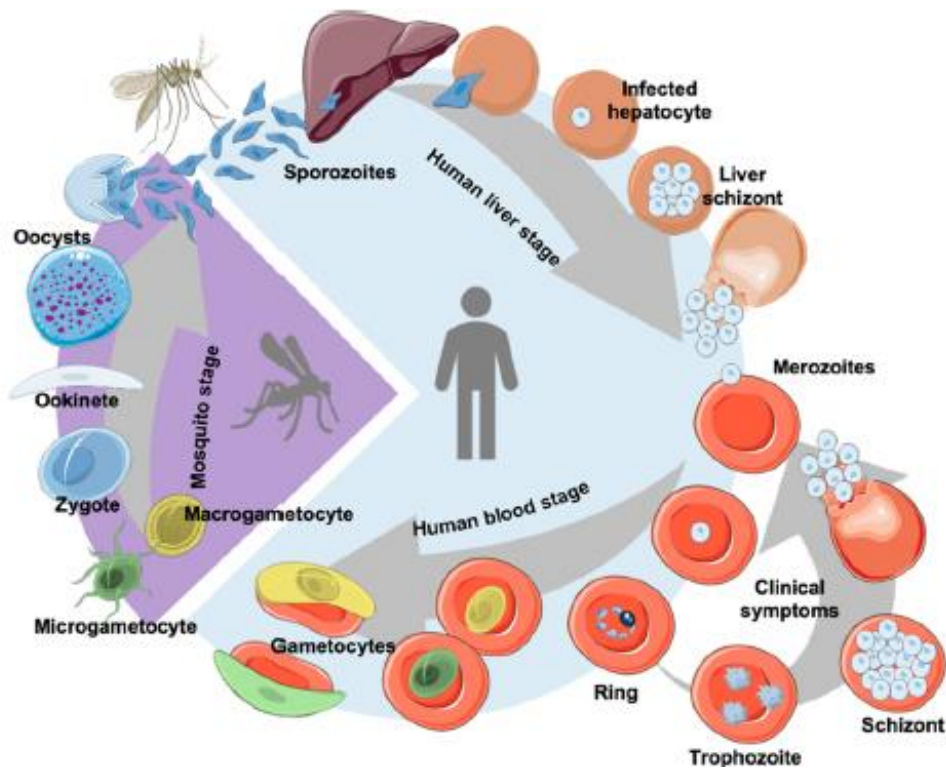


Figura 1.1-Representação esquemática do ciclo de vida do parasita da malária. Reproduzido de [4], Copyright 2021 American Chemical Society.

Este ciclo de vida inclui o estágio sexual do mosquito *Anopheles* e um estágio de replicação assexuada no hospedeiro humano. Aquando da picada, os mosquitos *Anopheles* fêmea, enquanto ingerem sangue, injetam esporozoítos das suas glândulas salivares na corrente sanguínea do hospedeiro humano. Esses esporozoítos migram e invadem os hepatócitos do fígado, onde produzem milhares de merozoítos que, por sua vez, são libertados na corrente sanguínea, invadindo os glóbulos vermelhos e iniciando um ciclo de replicação intraeritrocitária (ou seja, dentro dos glóbulos vermelhos). Durante este ciclo, os merozoítos desenvolvem-se em diferentes estádios morfológicos, passando do estágio de anel para trofozoítos mais complexos e, em seguida, atingem o estágio de esquizontos, que contêm múltiplos merozoítos. Por fim, dá-se a ruptura dos glóbulos vermelhos infetados, libertando merozoítos na corrente sanguínea, que sucessivamente vão invadir novos glóbulos vermelhos. Este estágio assexuado da infecção é caracterizado por múltiplos ciclos de invasão e replicação, que causam os sintomas da malária e podem levar a uma patologia grave. Por sua vez, alguns dos merozoítos não sofrem replicação intraeritrocitária e, em vez disso diferenciam-se em gametócitos sexuais. Os gametócitos não causam manifestações clínicas e circulam na rede sanguínea do hospedeiro humano, onde podem ser ingeridos por um mosquito que se encontra a ingerir sangue do hospedeiro [4], provocando a transmissão da doença para outros hospedeiros.

Em particular, durante a fase de multiplicação assexuada, o parasita *Plasmodium* consome hemoglobina (Hb), necessária para o seu metabolismo, que é degradada em grupos heme livres. Estes grupos são tóxicos para o parasita e, por isso, para sobreviver, o parasita produz agregados de hemozoína (Hz) como produto final do processo de degradação. Trata-se de uma substância cristalina insolúvel formada no sistema digestivo do parasita *Plasmodium*, composta por ferro. Conforme a doença progride, a concentração de hemoglobina no sangue diminui, e a concentração de Hz aumenta [5][6]. Além disso, os cristais de Hz apresentam propriedades magnéticas, óticas e fotoacústicas altamente específicas que os tornam um marcador único para a deteção da doença [4].

Relativamente ao diagnóstico da malária, a microscopia e os testes de diagnóstico rápido (TDR) continuam a ser, atualmente, os métodos mais comumente utilizados em diagnóstico em campo nas regiões endémicas da malária [7]. A microscopia, como o nome indica, é a análise de esfregaços de amostras de sangue do paciente recorrendo a um microscópio. Contudo, a precisão deste método varia entre laboratórios, condições de instalação e a própria experiência do técnico que executa as análises. A capacidade de deteção em regime laboratorial controlado, por exemplo, está estimada entre 4 e 20 parasitas/ μL , para técnicos altamente especializados. No entanto, no que toca a laboratórios de campanha instalados em regiões endémicas, a capacidade de deteção nunca será melhor que 50 a 100 parasitas/ μL , mesmo que esta seja executada por técnicos com experiência. Apesar de se tratar de um procedimento de diagnóstico rápido e eficaz, necessita que sejam criadas as condições de ambiente laboratorial adequadas. Necessita, igualmente, de conhecimento técnico e científico para o efetuar. Estas circunstâncias acabam por limitar a sua aplicação em todos os pontos de maior concentração da doença [8]. Os TDR conseguem fornecer um diagnóstico de malária portátil, usando apenas pequenas quantidades de sangue, permitindo resultados em intervalos de tempo curtos, num máximo de vinte minutos. Por exemplo o teste OptiMAL que permite detetar antígenos de desidrogenase láctica (DHL) libertados pelos glóbulos vermelhos infetados [9]. Ao contrário da microscopia, estes testes não necessitam de técnicos especializados para o aplicar e conseguem ser utilizados em diferentes condições. No entanto, são suscetíveis a falhas e tratam-se de sistemas não reutilizáveis, para além da dificuldade em detetar casos assintomáticos, com baixa parasitemia [10]. Da procura de métodos de diagnóstico mais eficazes, têm surgido métodos inovadores como a reação em cadeia da polimerase (PCR), o diagnóstico recorrendo a nanobolhas de vapor, ou métodos fotoacústicos e magnéticos. Estes métodos conseguem detetar baixas parasitemias e com elevada sensibilidade. No entanto, devido à sua complexidade técnica,

elevado custo e exigência laboratorial, os testes de PCR só são usados para fins de investigação (não sendo recomendados pela OMS para testes em campo) e, os restantes, apesar de apresentarem bons resultados, ainda se encontram em fase de investigação em laboratório, sendo que ainda não chegaram à fase de aplicação em campo [11][12][13].

Assim, o grupo de trabalho em que este projeto de dissertação se insere, encontra-se a investigar as características óticas dos biomarcadores associados à doença, nomeadamente a Hz, anteriormente referida, usando técnicas espectrofotométricas. A espectrofotometria permite a identificação de substâncias analisando a absorção, transmissão ou reflexão da luz em diferentes comprimentos de onda do espectro ótico [14][15][16]. Em particular, o presente trabalho parte do princípio que os espectros de absorção ótica da Hz e da hemoglobina diferem significativamente, e que, à medida que a doença progride, existe uma variação do espectro ótico. O grupo de trabalho já reportou, ao longo dos últimos anos, diferentes estudos para a reconstrução dos espectros óticos da Hz e/ou de parasitas da malária com base em 6, 8 e 16 comprimentos de onda, usando fontes emissoras de luz baseadas em LEDs (diodos emissores de luz) ou lâmpadas comerciais [14][15][16]. Assim, este trabalho pretende, de modo similar, desenvolver um protótipo de um sistema para quantificação de Hz com base em espectrofotometria de absorbância ótica. Contudo, este documento apresenta um estudo do potencial da aplicação de díodos laser de alta intensidade e reduzida largura de banda. Com esta alteração, pretende-se a redução do número de comprimentos de onda necessários (para um mínimo de 4 comprimentos de onda) para a implementação do método espectrofotométrico, diminuindo a dimensão do dispositivo, aumentando ainda a seletividade espectral. Simultaneamente, pretende-se detetar Hz em baixas concentrações, assim como reduzir o tempo de diagnóstico, esperando superar as limitações dos diferentes métodos existentes no mercado.

1.2 Motivação e Objetivos

A malária é uma das doenças parasíticas mais severas, estando metade da população mundial em risco de contrair da doença. A sua deteção num estágio inicial é essencial, uma vez que aumenta consideravelmente a possibilidade de um tratamento efetivo e reduz a transmissão da doença. Contudo, devido aos baixos recursos presentes nas regiões onde esta doença é endémica, é difícil garantir as condições ideais para um diagnóstico preciso, uma vez que geralmente requerem equipamentos laboratoriais e técnicos especializados. Assim, tendo em conta as limitações dos meios de diagnóstico

comumente utilizados, surge a necessidade de desenvolver um método de diagnóstico da doença eficiente, rápido, de fácil utilização e de baixo custo.

Para isso, o trabalho apresentado nesta dissertação enquadra-se no projeto MalariaChip, com referência NORTE-01-0145-FEDER-028178, que decorreu entre julho de 2018 e maio de 2022, executado na Universidade do Minho, tendo também contribuído para o projeto iProof20, promovido pela TecMinho, e que decorreu em 2017. Em particular, o objetivo deste trabalho passa pelo desenvolvimento de um sistema de quantificação de H_z autónomo, portátil, preciso e quantitativo, que possa ser usado por qualquer pessoa, focando-se, assim, em ser um pequeno passo na exploração de microdispositivos inovadores e competitivos para diagnóstico de malária. O mecanismo do dispositivo baseia-se num sistema de deteção ótica por espectrofotometria de absorbância, implementado numa plataforma fluidica, implicando um caminho ótico muito curto entre fonte de luz e fotodíodos e que incorpora, também, um algoritmo de atuação e leitura programado num microcontrolador. Pretende-se utilizar díodos laser de alta intensidade como alternativa às fontes de luz usadas em trabalhos anteriores, nomeadamente as lâmpadas de tungsténio e os díodos emissores de luz (LEDs). Um sistema espectrofotométrico baseado em díodos laser, devido à especificidade nos seus comprimentos de onda e intensidade, poderá ser capaz de efetuar o diagnóstico recorrendo apenas a quatro comprimentos de onda. Estes comprimentos de onda serão validados por medições espectrofotométricas de absorção ótica, usando um espectrofotómetro à escala macro, antes de se prosseguir para o dimensionamento e teste do circuito eletrónico de leitura ótica. Espera-se, igualmente, reduzir o tempo de deteção, o tamanho do dispositivo, o seu consumo energético e aumentar a sensibilidade de deteção.

Os objetivos específicos do projeto passam pelo:

- Desenvolvimento e caracterização de um sistema de emissão ótica de luz visível, baseado em díodos laser em quatro comprimentos de onda, controlados por modulação por largura de pulso (PWM) e variações de *duty cycle*;
- Desenvolvimento da eletrónica de aquisição e leitura para quatro fotodíodos, em número igual ao de díodos laser;
- Desenvolvimento de um algoritmo de atuação e leitura;
- Desenho e impressão 3D de um encapsulamento para o sistema;
- Teste do dispositivo com amostras de H_z sintéticas em sangue total, que mimetizem óticamente o comportamento dos parasitas da malária.

1.3 Organização da Dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos.

O primeiro capítulo aborda o enquadramento do trabalho, nomeadamente a doença da malária, apresentando o seu impacto no panorama da saúde mundial, assim como uma curta explicação sobre o seu ciclo de vida e principais características. Neste capítulo são ainda apresentadas as motivações e objetivos para este trabalho de investigação.

O capítulo dois apresenta o estado da arte relativo às temáticas abordadas nesta dissertação. Em particular, são apresentados os princípios teóricos da espectrofotometria, assim como um breve estado da arte de dispositivos óticos utilizados diagnóstico da malária. O capítulo finaliza com uma discussão dos métodos existentes e anteriormente apresentados.

O terceiro capítulo apresenta a descrição do desenvolvimento do dispositivo de quantificação ótica de Hz. Neste capítulo começam por ser apresentados os resultados obtidos nos testes preliminares para caracterização ótica de amostras de Hz e sangue total. O capítulo apresenta ainda o dimensionamento de toda a eletrónica do sistema, assim como o dimensionamento e especificações de duas abordagens desenvolvidas para o encapsulamento do dispositivo. O capítulo termina com a descrição do algoritmo de atuação e leitura implementado no microcontrolador.

No quarto capítulo são apresentados os resultados obtidos nos testes efetuados com o dispositivo desenvolvido. O capítulo encontra-se dividido em duas secções, em que cada uma delas apresenta os resultados obtidos para cada uma das duas abordagens de encapsulamento utilizadas.

O quinto, e último capítulo, apresenta as considerações finais e principais conclusões do trabalho desenvolvido. Constam ainda deste último capítulo algumas observações relativas a trabalho futuro que poderá ser desenvolvido.

2. ESTADO DA ARTE

O presente capítulo resume os princípios teóricos da espectrofotometria de absorção ótica, assim como apresenta um breve estado da arte de diversos dispositivos e métodos óticos reportados para o diagnóstico de malária.

2.1 Fundamentos Teóricos da Espectrofotometria

A espectrofotometria é um método científico que se baseia na quantificação da absorção da luz por uma substância, e que toma partido das duas leis de absorção ótica [17]. A primeira lei consiste na Lei de Lambert, que refere que a proporção de luz absorvida por um meio é independente da intensidade da luz incidente. Por exemplo, uma amostra que absorva 75% da luz incidente, absorverá sempre 75% dessa luz, independentemente da sua intensidade. Assim, do mesmo modo, a transmitância (quantidade de luz transmitida) através de uma amostra (T) é dada pela relação entre a intensidade da luz transmitida através dessa amostra (I) e a intensidade de luz incidente (I_0), tal como apresentado em (1):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

A partir da transmitância de uma amostra, pode determinar-se ainda a absorbância da luz (A), estimada como $A = -\log_{10} T$. Ainda em relação à absorbância, a segunda lei consiste na lei de Beer, de acordo com a qual a absorbância é diretamente proporcional à concentração do meio, assim como à sua espessura. Em espectrofotometria, a espessura do meio tem o nome de caminho ótico. Sendo que, segundo a lei Beer-Lambert, para uma amostra com apenas uma espécie ativa no comprimento de onda medido, a absorbância vai ser igual ao produto entre o coeficiente de absorvidade molar da espécie (ϵ), a concentração molar (c) e o comprimento atravessado pelo feixe de radiação (l), tal como apresentado em (2):

$$A = \epsilon cl \quad (2)$$

Devido à simplicidade do princípio de deteção, são vários os dispositivos óticos desenvolvidos por equipas de investigação (e muitos disponíveis comercialmente), quer isolados quer integrados em sistemas

microfluídicos e *lab-on-a-chip*, que se baseiam em leitura ótica por espectrofotometria para quantificação de biomoléculas e diagnóstico de doenças [18], quer recorrendo à absorvância ótica [19][20], quer à reflectância [21][22], ou mesmo à fluorescência dos compostos orgânicos [23][24]. Além disso, muitos instrumentos analíticos modernos, como a espectrometria de massa, foram desenvolvidos para fornecer uma visão sobre o conteúdo bioquímico de muitos tipos de amostras biológicas diferentes [25][26]. De um modo geral, tem havido muitos desenvolvimentos na área de sensores químicos miniaturizados para quantificação ótica de compostos em fluidos biológicos, recorrendo às diferentes técnicas referidas. Estes conseguem apresentar os mesmos (ou melhores) níveis de desempenho observados em grandes instrumentos bio-analíticos tradicionais, simultaneamente assegurando baixo consumo de corrente (*low power*), portabilidade e autonomia [27]. Como exemplos, podem referir-se dispositivos óticos para diagnóstico de doenças de pele [28], dispositivos de medição de níveis de glicémia no sangue [29], dispositivos de deteção de medicamentos específicas como, por exemplo, a benzoilecgonina [30], dispositivos de tipagem sanguínea [31], dispositivos *lab-on-a-chip* com eletrónica CMOS (do inglês *complementary metal-oxide-semiconductor*) integrada para quantificação de diversos analitos na urina e soro [32], entre outros. Em particular, a secção seguinte apresenta uma breve revisão de dispositivos óticos com enfoque na deteção de parasitas da malária.

2.2 Estado da Arte de Dispositivos Óticos em Diagnóstico de Malária

A presente secção apresenta um breve estado da arte de dispositivos óticos em diagnóstico de malária, assim como uma discussão sobre os métodos existentes.

Ao longo dos últimos anos, têm sido desenvolvidos diversos métodos óticos para diagnóstico de malária, com base em diferentes biomarcadores da doença. Estes incluem, entre outros, as enzimas PfHRP-II (do inglês *Plasmodium falciparum histidine-rich protein II*), *Plasmodium aldolase* (PALD), *Plasmodium lactate dehydrogenase* (PLDH), *Plasmodium falciparum hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase* (PfHGPR) e a *Plasmodium glutamate dehydrogenase* (PGDH), que são expressas durante a infeção [33]. Para além destas, e tal como previamente descrito no capítulo 1, o cristal de hemozoína, devido às suas propriedades magnéticas [34][35], óticas [16][36] e fotoacústicas [11][37] altamente específicas, tem-se tornado um marcador cada vez mais interessante para a deteção da doença. Aqui, serão descritos vários dispositivos e métodos óticos explorados para a deteção de malária através da quantificação e deteção de hemozoína.

Alguns dispositivos óticos para deteção de Hz têm vindo a basear-se na especificidade das propriedades magnéticas deste composto. Ao contrário de todos os constituintes do sangue saudável, a Hz apresenta comportamento paramagnético, respondendo a baixas intensidades de campo magnético. McBirney et al. [38] desenvolveram um dispositivo portátil com base neste princípio, em que a deteção é baseada em espectroscopia ótica diferencial, onde a mudança na transmissão ótica é monitorizada antes e após a aplicação de um campo magnético por um íman, usando um atuador linear (que afeta os cristais de Hz, alterando a resposta do dispositivo). O dispositivo desenvolvido pelos autores recorreu a um diodo laser de 635 nm. Este incide luz sobre uma cuvette de polimetilacrilato (PMA) que contém a amostra de sangue, e que se encontra sobre um fotodiodo [38]. Na presença do campo magnético, as nanopartículas de Hz são atraídas para fora do caminho do feixe de luz, aumentando assim a transparência ótica da amostra. Ao aumentar a transparência, naturalmente a transmissão da luz aumenta também, o que é registado em tempo real por um computador. Mesmo para concentrações baixas de 0,0087 µg/mL de Hz, o dispositivo foi capaz de identificar uma significativa alteração na transmitância ótica após aplicação do campo magnético. O dispositivo desenvolvido pelos autores pesa cerca de 5 kg e é alimentado por uma bateria que lhe garante uma autonomia de aproximadamente oito horas em funcionamento permanente [38]. Nam et al. [39] reportaram o desenvolvimento de sistema com base no mesmo princípio. Os autores fabricaram um microcanal, por técnicas de litografia, acoplado a um fio de níquel fixado numa lâmina de vidro. Na presença de um campo magnético de 0,6 T, gerado por um íman permanente, o fio de níquel atraía os glóbulos vermelhos infetados pelo parasita *Plasmodium falciparum*, separando estes dos glóbulos vermelhos não infetados. Após a separação dos parasitas no microcanal, posteriormente, estes eram detetados a partir das particularidades óticas da Hz [39].

Por sua vez, Lukianova-Hleb et al. [11] exploraram métodos foto-acústicos para a deteção de malária. Os autores apresentaram o desenvolvimento de um sistema não invasivo e sem recurso a amostras de sangue e reagentes. O sistema recorre a uma sonda capaz de executar um diagnóstico transdermal, emitindo sinais através da pele. Os nanocristais endógenos da Hz, são opticamente excitados *in vivo* com um laser, atuado em pulsos curtos. A luz emitida é convertida em calor localizado não estacionário, que evapora o volume adjacente de líquido e, assim, gera uma nanobolha de vapor em expansão e colapso dentro do parasita. A sua expansão e colapso transitórios resultam num pulso de pressão não invasivo que é facilmente detetado através da pele com um sensor de ultrassom. No trabalho reportado, foi utilizado o sinal gerado por um humano saudável, não infetado com malária, para determinar o valor de

threshold, definindo o valor máximo de amplitude que um sinal pode ter para ser considerado como um teste negativo [11].

Ainda nos exemplos de métodos miniaturizados para detecção de malária, Catarino et al. [16] estudaram as propriedades óticas do parasita e apresentaram um sistema de quantificação de hemozoína através de absorção ótica. O método apresentado consiste na reconstrução do espectro ótico da amostra recorrendo a 6 comprimentos de onda discretos (567 nm, 591 nm, 617 nm, 623 nm, 670 nm e 721 nm), especificamente escolhidos em 6 pontos relevantes do espectro ótico visível [6]. O dispositivo desenvolvido, apresentado na Figura 2.1, para o seu funcionamento, recorre a uma amostra de sangue que é colocada em seis poços de amostra, contidos numa placa produzida em PDMS e com um caminho ótico de 3 mm. A placa, contendo a amostra, é posteriormente colocada num suporte, garantindo o alinhamento entre os seis pares de LEDs (tecnologia de emissão de luz do sistema) e fotodíodos. As variações de corrente medidas nos fotodíodos são analisadas pelo microcontrolador, responsável pela reconstrução do espectro de absorção. De seguida o microcontrolador aplica um algoritmo de detecção capaz de quantificar a quantidade de H_z presente na amostra. O dispositivo apresenta um limite de detecção de 1 µg/mL de hemozoína em sangue total [16].

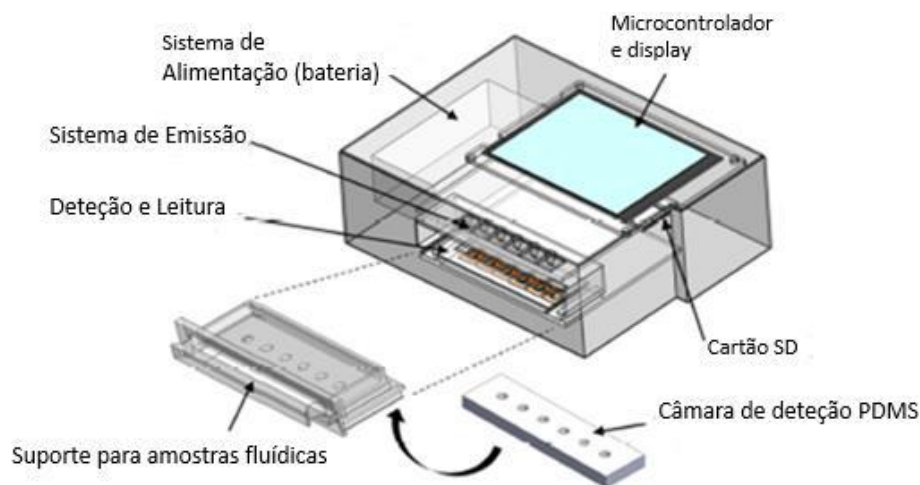


Figura 2.1 -Desenho CAD do protótipo desenvolvido para detecção e quantificação de hemozoína em sangue total por absorbância ótica, com base em 6 comprimentos de onda. Adaptado de Catarino et al. [16] , Copyright © 2020, IEEE.

O mesmo grupo de investigação tem vindo também a explorar a reflectância ótica para diagnóstico de malária, em alternativa/complemento à absorbância. Costa et al[15]. apresentaram um sistema de leitura por reflectância, baseado em 8 comprimentos de onda na gama 400-800 nm, capaz de detetar parasitas da malária com elevada sensibilidade, até 12 parasitas/µL de glóbulos vermelhos. O sistema

recorreu a um conjunto LEDs brancos para a emissão da luz, e de um conjunto de oito filtros óticos multicamada, de MgO/TiO₂ e SiO₂/TiO₂, com elevada transmitância e banda de passagem estreita (baixa largura a meia altura - FWHM), para selecionar a luz nos comprimentos de onda de interesse e reconstruir o espectro ótico de reflectância das amostras [15].

A título de exemplo, foram também desenvolvidos alguns biossensores óticos específicos para a deteção de H₂. Graham et al. [40] desenvolveram um ensaio baseado em polimerização ultrasensível, que permite que a deteção e a quantificação de hemozoina sejam integradas num dispositivo microfluidico *lab-on-a-chip*. A H₂ solubilizada estimula a polimerização da N-isopropilacrilamida em poli N-isopropilacrilamida, tendo como resultado a turbidez do líquido, que pode ser quantificada opticamente em 380 nm ou 600 nm (até 4 horas) [40]. O processo de polimerização requer reagentes termoestáveis, mas de baixo custo, e permite a deteção de 10 glóbulos vermelhos infetados por microlitro de sangue.

Uma vez descritos os principais métodos óticos para diagnóstico de malária, agora é importante discutir as suas limitações e apresentar as melhorias propostas pelo projeto de dissertação apresentado neste documento. Como foi apresentado, nos últimos anos surgiram múltiplos dispositivos de diagnóstico da malária, e que têm vindo a ser objeto de melhoria contínua. O desenvolvimento de métodos de diagnóstico recorrendo a metodologias óticas tem apresentado resultados muito promissores. Apesar de ainda haver margem para melhorar, já representam um avanço significativo no diagnóstico de malária. No entanto, estes dispositivos apresentam ainda algumas limitações. Nomeadamente, vários métodos implicam elevada complexidade nos sistemas de atuação e deteção, implicam a necessidade de reagentes, apenas identificam a presença dos parasitas (sem os quantificar) e falham em detetar baixas parasitémias. Além disso, a maioria dos métodos ainda implica amostras de sangue para as análises, o que, além de ser incómodo para os pacientes, leva a problemas ambientais (devido à problemática do descarte indevido dos materiais). Ultrapassar estas limitações é essencial para que estes métodos sob investigação possam ser competitivos com os métodos existentes atualmente para diagnóstico em campo. Alguns dos trabalhos tentam já explorar métodos de análise não invasivos, com medição diretamente na pele dos pacientes (nomeadamente através de reflectância ótica [15] ou, por exemplo, métodos fotoacústicos com nanobolhas de vapor [11]), com enorme potencial para uso em campo. Assim, este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de melhorias que possam ser implementadas em sistemas de espectrofotometria portáteis. Em particular, pretende-se a redução do tempo de teste, com o aumento de sensibilidade de deteção e com a simplificação do sistema implementado, este último tornando a sua produção mais barata. Pretende-se, com uma configuração

simples, sem necessidade de reagentes ou marcadores adicionais e recorrendo a uma amostra de volume reduzido, produzir um sistema portátil, autónomo e sem necessidade de técnicos especializados. É importante referir que este trabalho explora o potencial de utilização de díodos laser para melhorar a sensibilidade da deteção dos parasitas. Apesar de ser utilizado para ensaios de espectrofotometria de absorção (implicando, nesta fase, amostras de sangue total), espera-se que o dispositivo proposto, em particular o sistema de atuação, possa ser utilizado em diferentes configurações, mesmo com potencial para integração em dispositivos de reflectância ótica, possibilitando medições não invasivas (tal como em [15]), diretamente na pele dos pacientes. Assim, o próximo capítulo apresenta o desenho e caracterização do sistema proposto para deteção de malária.

3. DESENVOLVIMENTO DO DISPOSITIVO ÓTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA

O presente capítulo apresenta uma caracterização ótica preliminar da Hz e do sangue, assim como os testes que viabilizam a implementação do sistema apresentado neste documento. A partir desses resultados, o capítulo apresenta os métodos de desenho, dimensionamento e desenvolvimento do sistema de detecção de Hz.

3.1 Testes Preliminares – Caracterização Ótica das Amostras

De forma a definir as especificações do dispositivo de diagnóstico a desenvolver, foi necessário numa primeira fase proceder à caracterização da absorbância ótica de sangue total e de Hz, em diferentes concentrações. Para isso foram utilizadas amostras de Hz suspensas em água nas concentrações: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL. Nesta fase de testes, foram também utilizadas amostras de sangue total, diluídas em água, nas concentrações de 0,05 g/L, 0,15 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L e 1 g/L.

A Hz sintética utilizada foi fornecida pela *Invivogen (Synthetic heme crystal*, Cat. Code: t1rl-hz; 5 mg). Esta garante segurança laboratorial e reprodutibilidade nos testes, sendo que retém as propriedades da Hz *in vivo* [41]. Foi preparada uma solução base de suspensão de Hz com a concentração de 5 mg/mL, que foi armazenada a 4°C. Em relação ao sangue, utilizou-se nos ensaios sangue total humano cedido pelo Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST) - Porto.

Seguidamente, para realizar as medições referidas nesta secção, foi utilizado, no Centro de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da universidade do Minho (CMEMS), um sistema espectrofotométrico customizado, composto por uma fonte de alimentação, uma fonte de luz, um monocromador, um picoamperímetro e um fotodíodo comercial. Em relação aos equipamentos, foram utilizados uma fonte de alimentação *Oriel/Newport 68931 radiometric power supply*, como fonte de luz uma lâmpada a 200 W encapsulada por um *research Quartz Tungsten Halogen lamp housing* da *Oriel Newport*, modelo 66881, um picoamperímetro modelo 487 da *Keithley*, e um monocromador modelo 74125 da *Oriel Newport*. O diagrama da montagem experimental é apresentado na Figura 3.1.

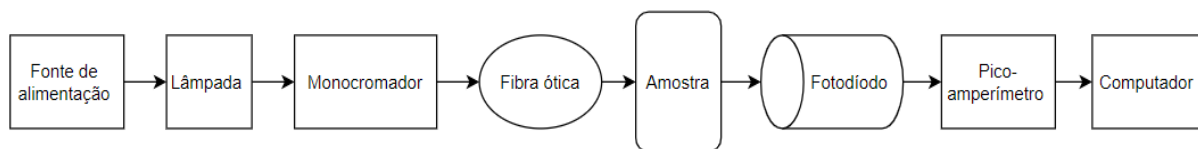


Figura 3.1- Diagrama da montagem experimental utilizada.

A luz emitida pela lâmpada é direcionada para o monocromador, e este é responsável por selecionar o comprimento de onda desejado, permitindo, assim, correr sequencialmente todo o espectro de luz visível em intervalos de 1 nm. Do monocromador, através de uma fibra ótica, a luz atravessa a cubete de medição, que contém a amostra (no caso, foi utilizada uma cubete em polimetilacrilato – PMMA, com 1 cm de caminho ótico), sendo posteriormente direcionada para o fotodiodo, posicionado e alinhado com a amostra. O fotodiodo converte a luz em corrente, que por sua vez é lida pelo picoamperímetro, sendo por fim os dados da corrente exportados para um computador (o sistema de aquisição foi desenvolvido em LabView, no CMEMS). O primeiro teste foi executado sem a presença de uma amostra entre o fotodiodo e a fonte de luz. Desta forma foi obtida a curva característica da fonte de luz incidente, ou seja, a corrente lida no fotodiodo na ausência de amostra e quando este está exposto à intensidade total da luz incidente, entre os 400 nm e os 750 nm, apresentada na Figura 3.2, e que será usada como curva de referência para os ensaios subsequentes.

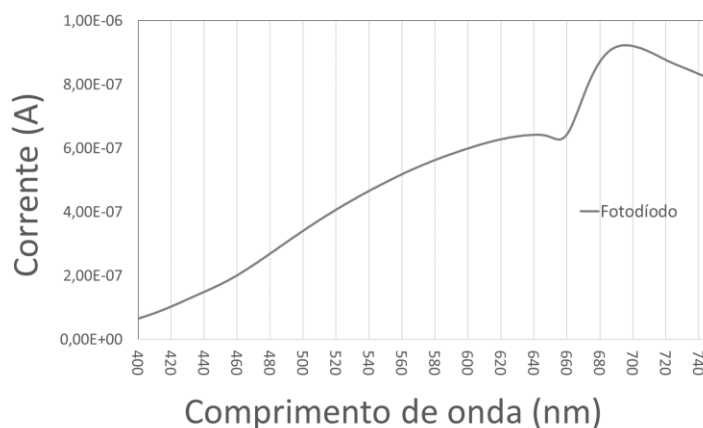


Figura 3.2 -Curva característica dada pela corrente (A) lida aos terminais do fotodiodo em função do comprimento de onda (nm) utilizado na montagem experimental.

Após a caracterização da fonte de luz, foram efetuadas medições da absorbância das amostras de sangue total e H₂ nas diferentes concentrações previamente descritas. Para cada ensaio, após a medição da curva da corrente para cada amostra, determinou-se a transmitância da mesma (dividindo a curva da corrente medida na amostra pela corrente de referência) e, posteriormente, a absorbância, de acordo

com o descrito na secção 2.1. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras Figura 3.3 Figura 3.4.

Em particular, a Figura 3.3 mostra as curvas de absorbância de sangue total para diferentes concentrações (ou seja, diferentes percentagens de diluição).

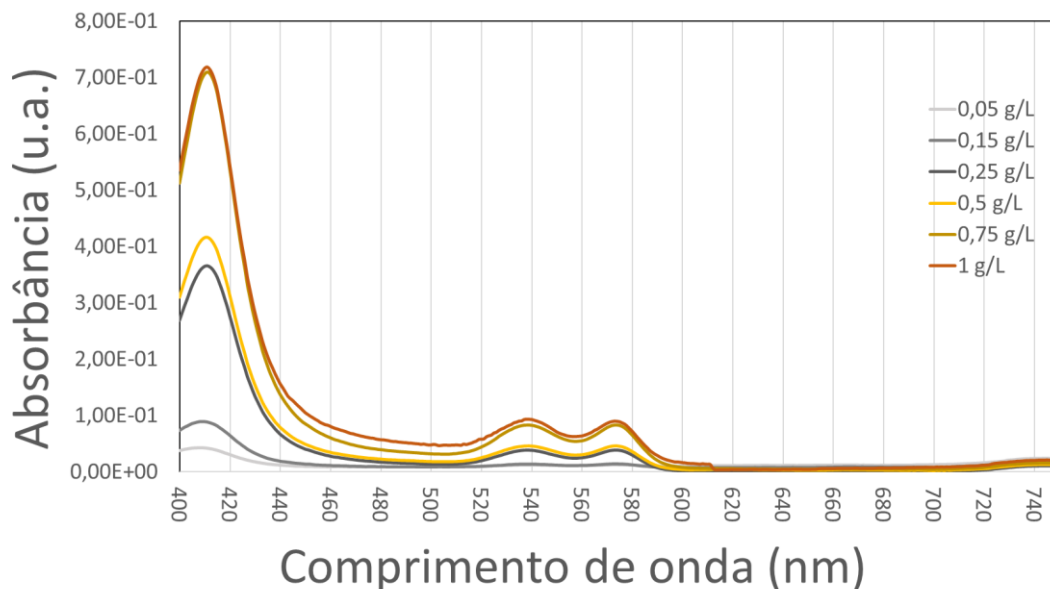
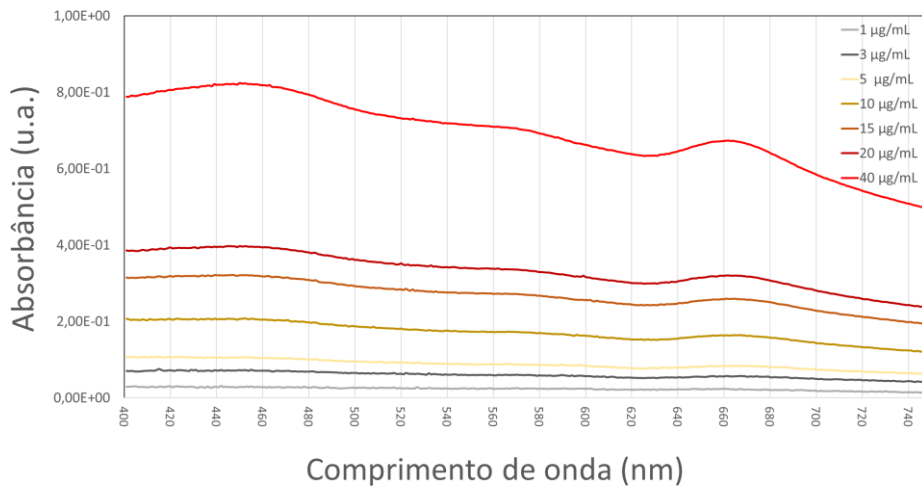


Figura 3.3- Espectro de absorbância (u.a.) de sangue total em diferentes concentrações, de 0,05 g/L a 1 g/L, entre os 400 nm e os 750 nm.

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que a absorbância das amostras é tanto maior, quanto maior for a concentração das mesmas. Observam-se ainda três picos no espectro de absorção do sangue total, devidos à presença da hemoglobina nas amostras em diferentes quantidades, que é o composto que dá a cor vermelha ao sangue total. O primeiro pico de absorção, de elevada intensidade, acontece entre os 400 nm e 440 nm, e apresenta valores muito elevados de absorção (apresentado na Figura 3.3). Na região entre os 500 nm e os 600 nm, encontram-se dois picos de absorção. A partir dos 600 nm praticamente não existe qualquer oscilação no espectro de absorbância do sangue total, sendo praticamente nulo (ou seja, quase toda a luz é transmitida a partir dos 600 nm). Isto significa que qualquer oscilação visível no espectro acima deste comportamento de onda será devida à presença de H₂O₂ no espectro, ou seja, devida à presença de parasitas da malária. A Figura 3.4 apresenta os espectros da H₂O₂ para diferentes concentrações.

a)



b)

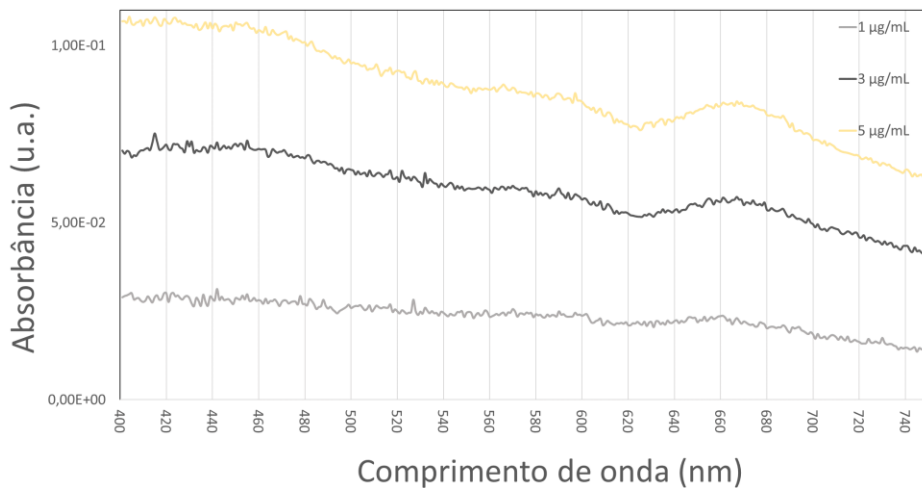


Figura 3.4- Espectro de absorvância (u.a) de amostras de Hz suspensas em água, em diferentes concentrações, entre os 400 nm e os 750 nm: a) concentrações de 1 µg/mL a 40 µg /mL; b) detalhe dos espectros para as concentrações de Hz de 1 µg/mL, 3 µg /mL e 5 µg /mL.

O espectro de absorção de Hz apresenta elevada intensidade até cerca de 600 nm, misturando-se no espectro do sangue total. No entanto, observa-se claramente um pico de absorção nos 670 nm, numa região onde o sangue total não tem absorvância ótica, mostrando potencial para uma possível distinção entre amostras nesta região do espectro. Assim, os resultados sugerem que os picos de absorção observados nos 540 nm, 574 nm e 672 nm poderão ser suficientes para reproduzir o espectro de absorção de sangue total e Hz. Tendo em conta que o pico de absorção de Hz acontece nos 672 nm e o último pico de absorção do sangue total nos 574 nm, será possível reproduzir a informação do espectro

pretendido, seja, fazer a distinção entre sangue total e sangue total contaminado com H₂. Mais detalhes da caracterização ótica, nomeadamente de hemoglobina sintética e H₂ em diferentes concentrações podem ser consultados em [6] [42].

3.2 Dimensionamento, Atuação e Caracterização dos Díodos Laser

O dispositivo a desenvolver deve ser capaz de identificar a presença de H₂ num líquido, sem necessitar de correr todo o espectro visível de luz (um espectro contínuo implicaria instrumentação altamente complexa, o que seria incompatível com um dispositivo miniaturizado portátil de baixo custo, como se pretende aqui desenvolver). Para esse efeito, tal como descrito na secção anterior (secção 3.1), foram identificados três comprimentos de onda principais capazes de reproduzir a informação do espectro pretendido: 540 nm, 574 nm e 672 nm [6]. Deste modo, estas três bandas espectrais poderão captar as principais oscilações nos espectros de absorbância dos glóbulos vermelhos/ hemoglobina (principais responsáveis pela cor do sangue) e da H₂. Além das três gamas espectrais anteriormente estudadas, considerou-se uma quarta gama espectral próxima dos 800 nm (já próximo da gama dos infravermelhos), de modo a reconstruir a fase final do espectro ótico visível.

No dispositivo, a emissão ótica será efetuada através de díodos laser, como emissores de luz, e a seleção das gamas espectrais será garantida pela banda de emissão dos díodos laser selecionados. De um modo geral, um diodo laser tem elevada precisão no comprimento de onda emitido (monocromático), isto quando bem alimentado [43][44], assim como uma resposta previsível (precisa) dentro de um intervalo de tempo definido. Após uma pesquisa de mercado, foram identificados 4 díodos laser para esta aplicação (Tabela 1):

Tabela 1- Díodos laser utilizados na implementação do sistema.

Referência	Comprimento de onda (λ) (nm)	Potência (mW)	Corrente de operação (Iop) (A)	Corrente máxima de operação (IMAX) (A)	Tensão (Typ-Max) (v)	Fornecedor
PL 520_B2	520	50	0,15	0,16	6,0 - 8,0	<i>Osram</i>
ADL-63054TL	635	5	0,033	0,04	2,2 - 2,5	<i>Arima</i>
LNCQ28PS01WW	661	100	0,128	0,18	2,4 - 3	<i>Panasonic</i>
LNC728PS01WW	783	200	0,21	0,275	2,5 - 3	<i>Panasonic</i>

Os seus comprimentos de onda são os que se encontram mais próximos dos valores pretendidos, de acordo com os ensaios experimentais de caracterização apresentados anteriormente. Idealmente, os díodos laser a utilizar seriam dimensionados de forma a emitir luz exatamente nos comprimentos de onda pretendidos. Na prática, a seleção dos componentes também dependeu da disponibilidade e custo dos mesmos no mercado. No entanto, como é visível na Tabela 1, foram encontrados componentes para todas as regiões do espectro pretendidas.

De modo a desenvolver um sistema capaz de detetar as oscilações de espectro (como previamente apresentado nas Figuras Figura 3.3 e Figura 3.4), foram considerados circuitos de atuação/iluminação dos díodos laser referidos e de aquisição e controlo de dados. O circuito de atuação dos díodos laser foi baseado no regulador ajustável LM317 [45]. A configuração utilizada, apresentada na Figura 3.5, garante precisão no limite de corrente, o que assegura que, mesmo no pior dos casos, nenhum dos díodos laser terá em algum momento, uma corrente superior à sua corrente máxima de operação.

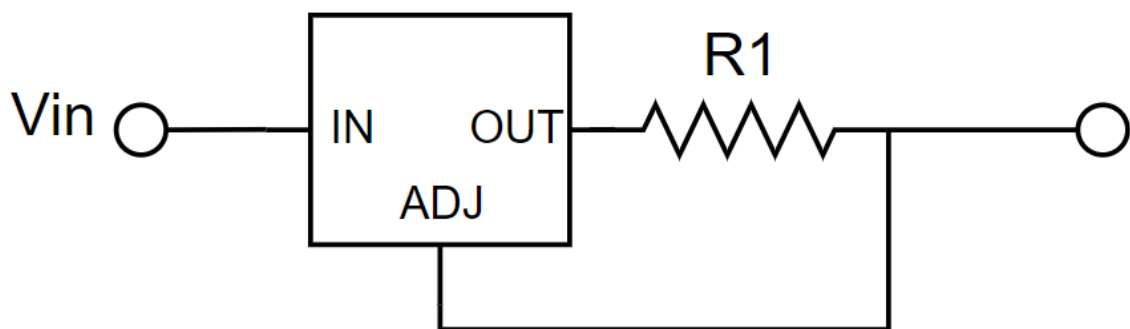


Figura 3.5- Circuito limitador de corrente baseado num circuito integrado LM317 [45].

A resposta deste circuito é dada por (3), onde $R1$ representa a resistência de dimensionamento da corrente I_{out} . Na expressão, a variável V_{ref} , com o valor de 1,2 V representa a tensão de referência para o funcionamento, indicada pelo fabricante.

$$I_{out} = \frac{V_{ref}}{R_1}, \text{ com } V_{ref} = 1,2 \text{ V} \quad (3)$$

Para cada um dos díodos laser foi, então, dimensionado o circuito tendo em conta a sua corrente de operação, apresentada na

Tabela 1. De forma a controlar a atuação de cada díodo laser, foi ainda implementado um interruptor recorrendo a um transístor NPN. Este é controlado pelo microcontrolador através do porto P1 (Figura 3.6 abaixo), onde será aplicado um sinal controlado por PWM. O porto P2, representado na mesma figura,

é o ponto de conexão com o diodo laser. A Tabela 2 apresenta os principais parâmetros do transistor utilizado.

Tabela 2 - Parâmetros do transistor.

ODF (<i>overdrive factor</i>)	10
Ganho de corrente - Beta (min)	100
VBE (sat)	0,7 V
VIN	3,3 V

A Figura 3.6 apresenta o dimensionamento final do circuito de atuação dos quatro diodos laser, em que os valores das resistências R1 e R2 se encontram listados, para cada um dos diodos laser, na Tabela 3.

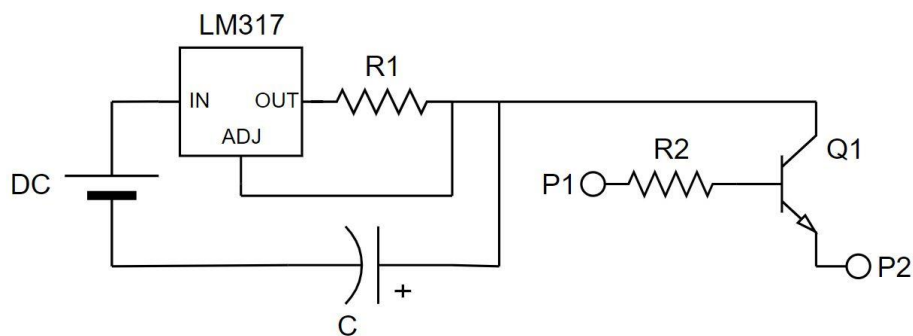


Figura 3.6- Circuito de atuação completo: Limitador de corrente e interruptor. DC- fonte de alimentação; LM317- limitador de corrente; R1- resistência de dimensionamento; C- condensador de estabilização; R2- resistência da base; Q1- transistor; P1- porto de conexão com o microcontrolador; P2- porto de conexão com o diodo laser.

Tabela 3 - Dimensionamento do circuito de atuação dos diodos laser.

Díodo Laser	I(op) (A)	R₁(Ω)	R₂(Ω)
PL 520_B2 (520 nm)	0,15	8	162,5
ADL-63054TL (635 nm)	0,033	36	650
LNCQ28PS01WW (661 nm)	0,128	9	144,4
LNC728PS01WW (783 nm)	0,21	6	94,5

Para comprovar o correto funcionamento dos diodos laser, no que toca à sua precisão espectral, esta implementação foi testada e medida através de um espectrofotômetro comercial disponível no CMEMS, usando uma montagem aproximada da referida na secção 3.1. Para tal, os diodos laser foram atuados, à vez, em diferentes *duty cycles* (25%, 50%, 75%, 100%), com o monocromador a fazer o varrimento entre os 400 nm e os 900 nm. Para cada *duty cycle*, os espectros dos diodos laser foram medidos três

vezes, com intervalo de arrefecimento entre testes (mínimo de um minuto). Os resultados podem ser consultados na Figura 3.7.

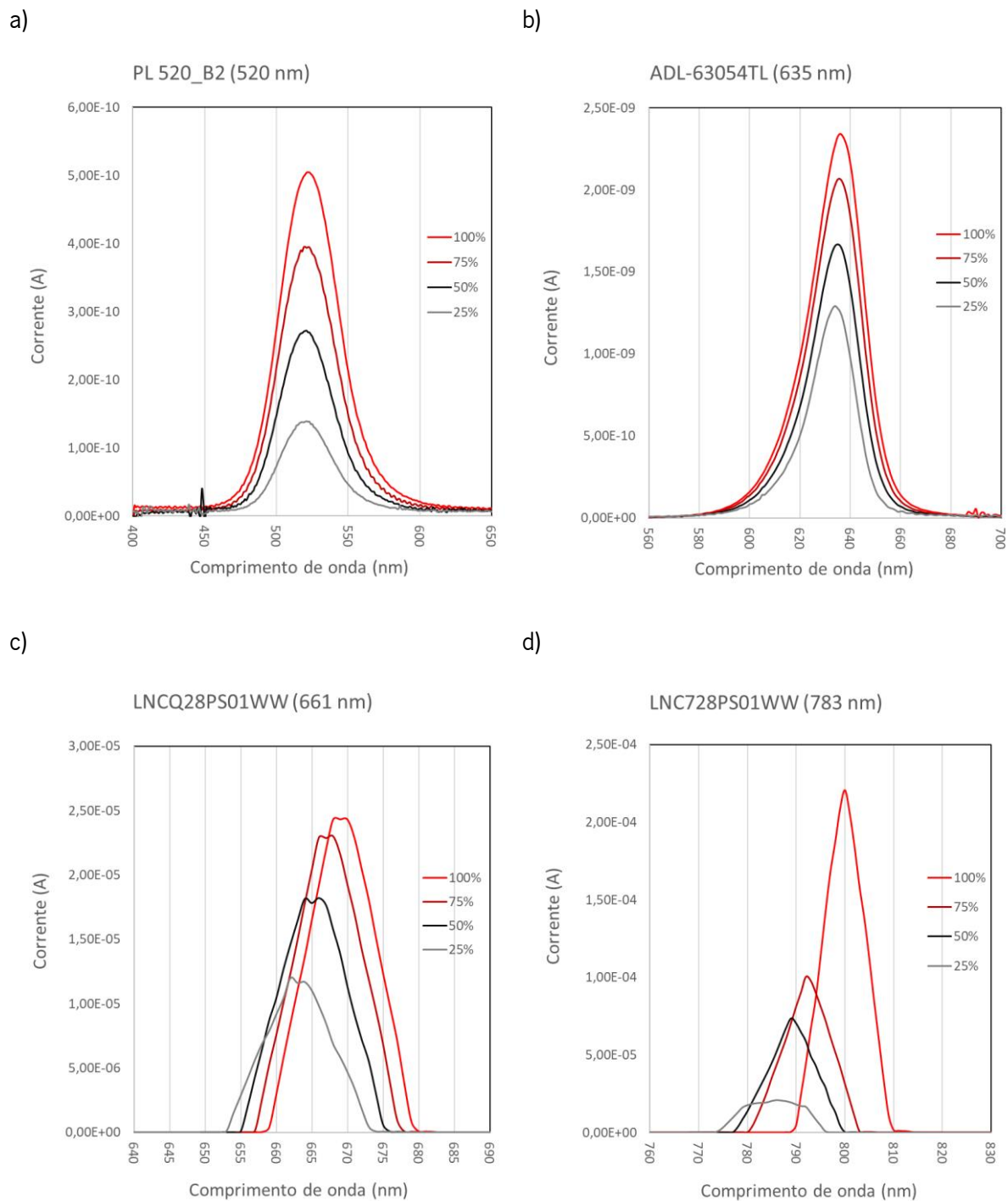


Figura 3.7- Representação gráfica das curvas espectrais de corrente (A) obtidas, para os díodos laser: a) PL 520_B2 (520 nm); b) ADL-63054TL (635 nm); c) LNCQ28PS01WW (661 nm); d) LNC728PS01WW (783 nm).

Da análise dos gráficos verifica-se que a corrente máxima medida para cada um dos díodos laser (com o *duty cycle* a 100%) difere em várias ordens de grandeza, entre 0,5 nA e 0,2 mA, e estas diferenças

serão tidas em conta aquando do processamento de resultados através de um processo de calibração e ajuste. Conclui-se que o espectro de emissão de um díodo laser é mais preciso, tem termos de especificidade espectral, que de um LED, no entanto não é perfeito [46]. Esta análise também permitiu averiguar o valor real do comprimento de onda emitido por cada díodo laser e a sua largura de emissão. Para caracterizar os díodos laser em termos de especificidade espectral, foi calculada a largura a meia altura (FWHM do inglês: *full width at half maximum*) de cada um. A Tabela 4 apresenta os valores de comprimento de onda de emissão efetivamente medidos e o FWHM de cada díodo laser. Ressalva-se que os comprimentos de onda medidos serão considerados como os comprimentos de onda de referência no capítulo 4.

Tabela 4- Valores de comprimento de onda real e FWHM.

Díodo Laser	Comprimento de onda medido (nm)	FWHM (nm)
PL 520_B2 (520 nm)	525	79
ADL-63054TL (635 nm)	632	25
LNCQ28PS01WW (661 nm)	668	11
LNC728PS01WW (783 nm)	799	10

Adicionalmente, foi possível observar que, nos casos dos díodos laser LNCQ28PS01WW e LNC728PS01WW, quando atuados em *duty cycles* inferiores a 100%, há um desvio em relação ao comprimento de onda emitido, pelo que idealmente, estes teriam de ser sempre atuados a 100% de *duty cycle*. O mesmo não acontece para os díodos laser PL 520_B2 e ADL-63054TL, que mostram um valor de pico de emissão igual, independentemente do *duty cycle*.

A Figura 3.8 apresenta a distribuição da emissão dos quatro díodos laser no espectro, mostrando que os díodos laser são representativos das zonas de interesse no espectro ótico (descritas no início deste capítulo). De notar que, para facilitar a visualização e comparação entre os díodos laser, neste gráfico o valor da corrente foi normalizado em relação ao valor de corrente máxima emitida e, portanto, não é possível observar as diferenças de amplitude, mas sim apenas a sua distribuição espectral.

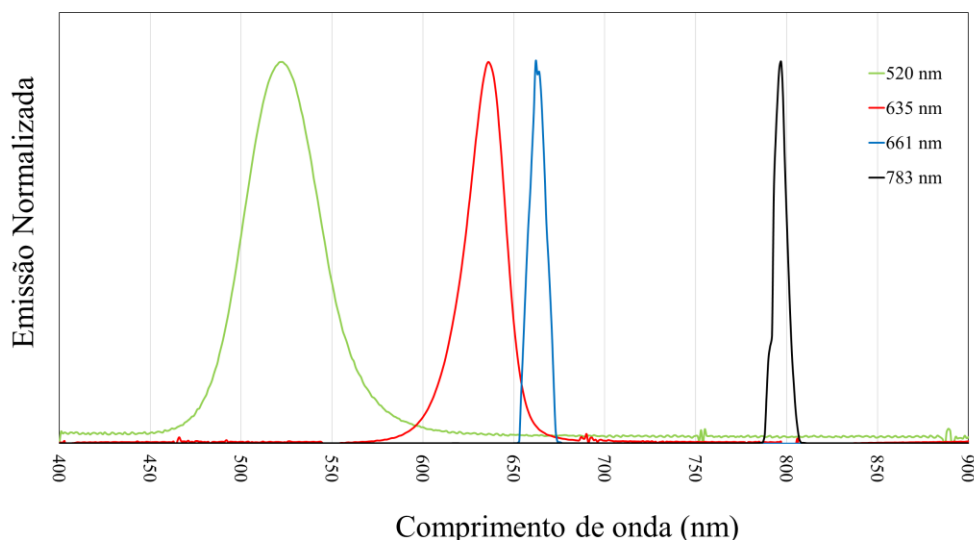


Figura 3.8- Distribuição da emissão óptica dos quatro diodos laser, apresentada na forma de corrente normalizada em função do comprimento de onda.

De forma a melhor caracterizar o sistema, foram ainda realizados testes recorrendo a um *powermeter*, com o objetivo de medir a densidade de potência ótica de cada um dos diodos laser. Para tal foi utilizado, no CMEMS, um sistema composto por um *powermeter* da *Newport* (Modelo 1918-R), um fotodiodo (com 1 cm x 1 cm de área ativa) e um *Arduino Mega 2560*, responsável pelo controlo dos drivers de alimentação da matriz de diodos laser. Foi ainda utilizado um pano preto para cobrir a montagem, de forma a reduzir as interferências luminosas externas ao sistema. Cada diodo laser foi atuado à vez e cada a medição foi repetida três vezes. A cada medição fez-se um ciclo de arrefecimento de um minuto. As médias da densidade de potência lida por diodo laser são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5- Resultados da densidade de potência ótica dos diodos laser medidos no *Powermeter*.

Densidade de potência ótica					
Díodo Laser	Duty Cycle				
	10%	25%	50%	75%	100%
PL 520_B2 (520 nm)	362 nW/cm ²	904 nW/cm ²	1,8 μW/cm ²	2,6 μW/cm ²	3,6 μW/cm ²
ADL-63054TL (635 nm)	248 nW/cm ²	530 nW/cm ²	1 μW/cm ²	1,4 μW/cm ²	1,8 μW/cm ²
LNCQ28PS01WW (661 nm)	4,3 mW/cm ²	8 mW/cm ²	13,3 mW/cm ²	17 mW	18,5 mW/cm ²
LNC728PS01WW (783 nm)	4,5 mW/cm ²	8,6 mW/cm ²	14,6 mW/cm ²	19,1mW/cm ²	22,8 mW/cm ²

Observa-se que, quanto maior o *duty cycle*, maior a potência medida pelo *powermeter*. Os diodos laser LNCQ28PS01WW (661 nm) e LNC728PS01WW (783 nm) apresentam valores de potência emitida várias

ordens de grandeza superiores aos dois restantes díodos laser, o que vem ao encontro dos resultados previamente obtidos nas medições do espectrofotômetro.

3.3 Dimensionamento e Caracterização do Circuito de Aquisição e Leitura

Como sensores óticos, foram utilizados quatro fotodíodos, um para cada díodo laser. De forma a apurar quais os fotodíodos mais adequados, fez-se, tal como para os díodos laser, um estudo de mercado. Numa primeira fase, optou-se pela utilização do fotodíodo TSL250R visto que este, na sua relação entre comprimentos de onda pretendidos e respetiva sensibilidade espectral relativa, apresentava valores entre os $0,8 \text{ nm}^{-1}$ e $1,1 \text{ nm}^{-1}$ (Figura 3.9). Como motivação extra para a sua aquisição, o fotodíodo referido trata-se de um sensor ótico *Light-to-Voltage*, sendo que tem o seu próprio circuito de transimpedância integrado. Isto apresentava-se como uma mais-valia, visto que simplificaria a implementação, reduziria ruído e o tamanho final do protótipo. No entanto, aquando da parametrização dos díodos laser, recorrendo a um osciloscópio, averiguou-se que os díodos laser LNCQ28PS01WW e LNC728PS01WW, quando atuados com um *duty cycle* acima dos 25%, levavam o fotodíodo a um estado de *overflow*. Sendo que a sua utilização abaixo dos 25% não apresenta uma estabilidade desejável nos valores medidos, por essa razão foram adquiridos os fotodíodos BPW24. A Figura 3.9 apresenta a responsividade relativa de ambos os fotodíodos considerados.

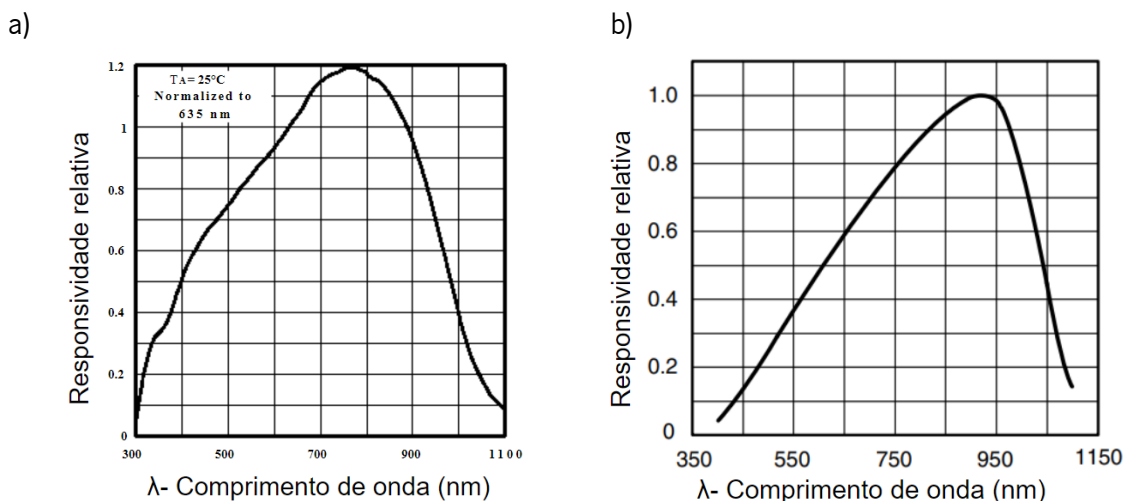


Figura 3.9-Responsividade relativa em função do comprimento de onda para os fotodíodos (reproduzido dos respetivos datasheets): a) TSL250R [30], utilizado para comprimentos de onda de 520 nm e 635 nm; b) BPW34 [31], utilizado para comprimentos de onda de 661 nm e 783 nm.

Assim, foi estudada a possibilidade de utilização deste último (BPW24) para as medições de corrente geradas pela emissão dos quatro díodos laser. Para isso foi medida a corrente, recorrendo a um picoamperímetro, nos terminais de um BPW34 quando sobre este incidia cada um dos díodos laser, distanciados cerca de um centímetro, e atuados a 100% de *duty cycle*. Este teste foi executado num ambiente controlado, de forma a reduzir as interferências luminosas externas ao sistema. Cada um dos díodos laser foi ligado durante 60 segundos, e de cinco em cinco segundos o valor de corrente foi registado. O processo foi executado três vezes e calculada a média de resultados para cada díodo laser, com intervalos de arrefecimento entre cada ciclo de medição. Os resultados são apresentados na Figura 3.10.

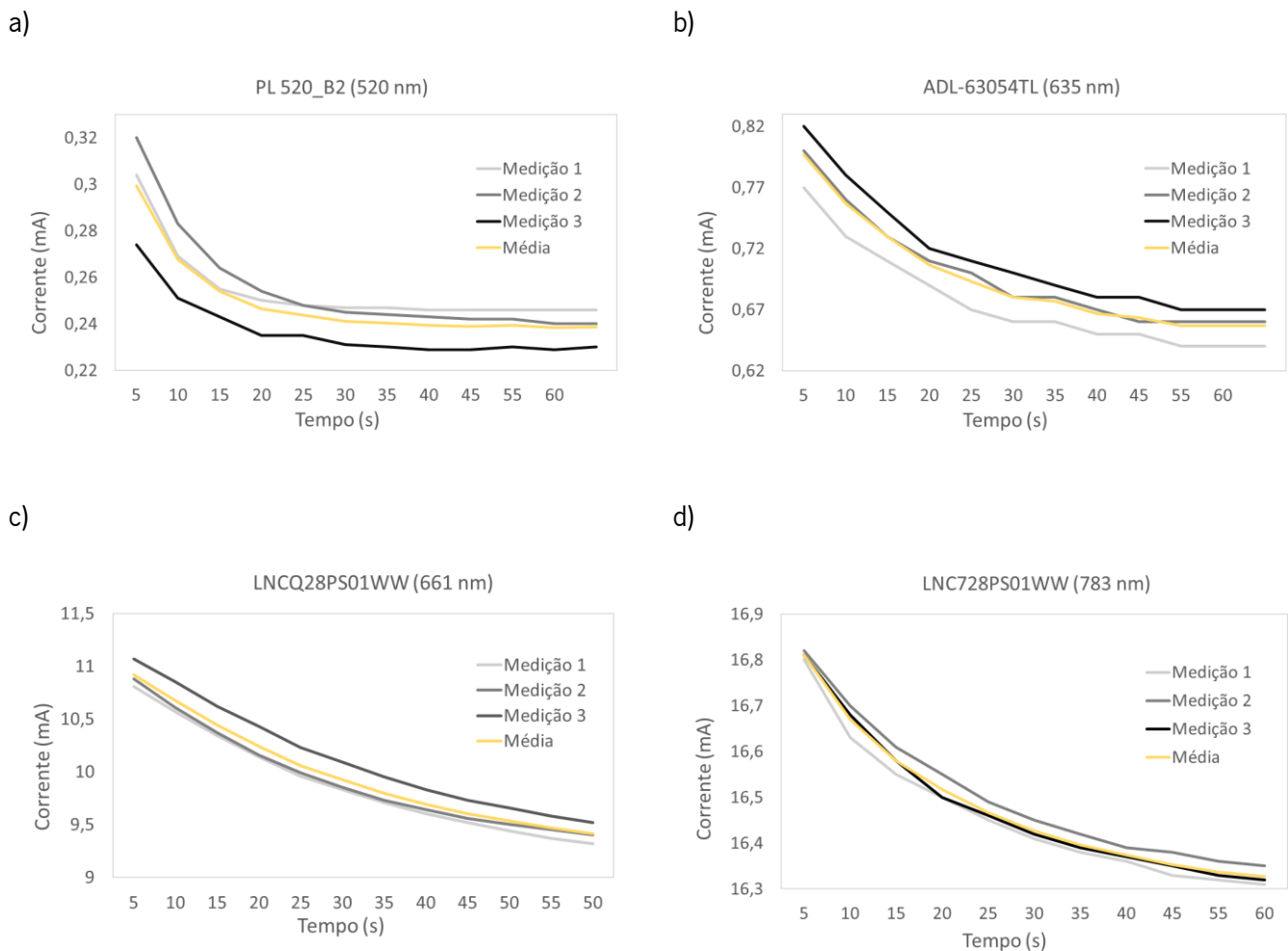


Figura 3.10- Corrente (mA) ao longo do tempo, medida com o fotodíodo BPW34, quando atuado pelos díodos laser: a) PL 520_B2 (520 nm); b) ADL-63054TL (635 nm); c) LNCQ28PS01WW (661 nm); d) LNC728PS01WW (783 nm).

Após a análise dos resultados deste teste, averiguou-se que a corrente lida nos terminais do fotodíodo BPW34, para os díodos laser PL 520_B2 e ADL-63054TL, é de uma ordem de grandeza muito reduzida (como já era esperado). A utilização deste fotodíodo para estes dois díodos laser requereria, portanto, a implementação de um circuito de transimpedância de duas etapas. Numa fase inicial, um circuito de transimpedância com duas etapas foi implementado e testado numa *breadbord*, no entanto optou-se por não recorrer a esta abordagem. Esta, para além de tornar o circuito de aquisição mais complexo, apresenta, igualmente, muita instabilidade no seu sinal de saída. De notar que a sensibilidade espectral relativa para os comprimentos destes dois díodos laser (520nm e 635 nm) é inferior aos dois restantes díodos laser (LNCQ28PS01WW e LNC728PS01WW), o que torna mais evidente a diferença na precisão de leitura entre os dois pares de díodos laser. Portanto, na implementação final optou-se pela utilização de dois pares distintos de fotodíodos, como é apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 – Lista de díodos laser utilizados e fotodíodos correspondentes.

Díodos Laser	Fotodíodo
PL 520_B2 (520 nm)	TSL250R
ADL-63054TL (635 nm)	TSL250R
LNCQ28PS01WW (661 nm)	BPW24
LNC728PS01WW (783 nm)	BPW24

Contrariamente ao fotodíodo TSL250R, o fotodíodo BPW34 não tem um circuito de transimpedância interna, não se tratando, portanto, de um sensor *Light-to-Voltage*, mas sim de um sensor *Light-to-current*. Por essa razão, foi necessário dimensionar e implementar um circuito de transimpedância para que na saída do sistema haja um valor em tensão que possa ser adquirido por um microcontrolador. O esquemático do circuito de transimpedância apresenta-se na Figura 3.11.

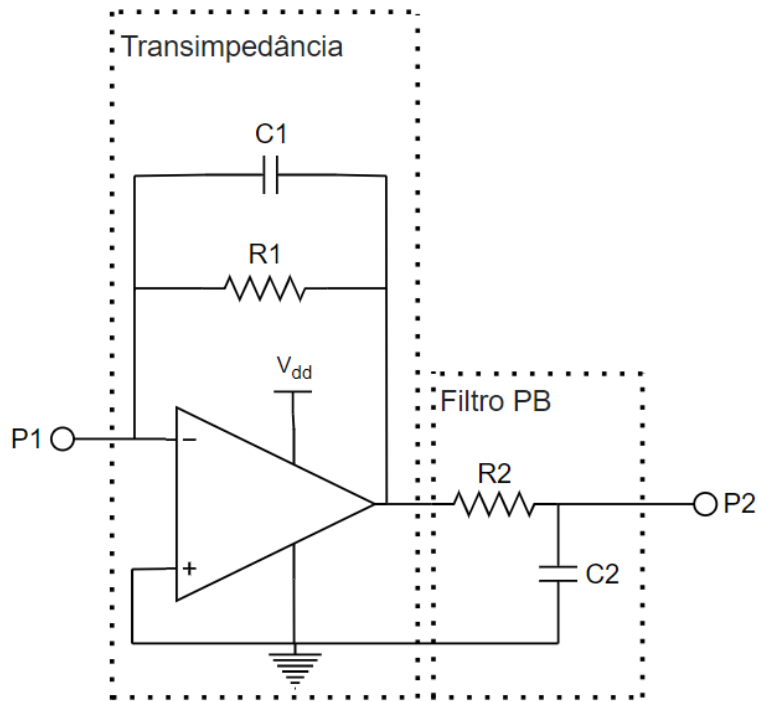


Figura 3.11- Circuito de transimpedância com filtro passa-baixo (PB): R1- resistência de transimpedância; C1- condensador de estabilização; R2- resistência do filtro PB; C2- condensador do filtro PB; P1- porto de conexão com fotodiodo; P2- porto de conexão com microcontrolador.

De forma a proceder ao seu dimensionamento, e com base nos gráficos apresentados na Figura 3.10 , foi possível estimar que a corrente máxima medida seria de 11 mA para o díodo laser LNCQ28PS01WW e de 17 mA para o díodo laser LNC728PS01WW. A partir da equação (4):

$$-I_{in} = \frac{V_{out}}{R_f} \quad (4)$$

e sabendo que o V_{out} máximo pretendido é de 5 V, os valores dimensionados podem ser consultados na Tabela 7. Por segurança, para não ultrapassar os valores de máximo de tensão no terminal do microcontrolador, levando à sua saturação, foram assumidos 4,5 V como valor de V_{out} . Os valores de resistência utilizados são de valor aproximado disponível no mercado, sendo a aproximação feita para um valor superior ao teórico. A Tabela 7 apresenta os resultados dos cálculos e ainda os valores reais das resistências implementados nos circuitos de transimpedância.

Tabela 7- Valores das resistências teóricas e reais, em função da corrente, para a implementação dos circuitos de transimpedância.

Díodo Laser	Corrente	Resistência teórica	Resistência real
LNCQ28PS01WW (661 nm)	11 mA	409 Ω	430 Ω
LNC728PS01WW (783 nm)	17 mA	264 Ω	270 Ω

De forma a confirmar os valores obtidos, assim como calcular os valores para o condensador C1, recorreu-se à calculadora *Photodiode Circuit Design Wizard*, da *Analog Devices*. Esta permite, com precisão, ajustar os diferentes valores em função dos fotodíodos e amplificadores utilizados. Nesta fase optou-se por um valor fator de qualidade padrão ($Q=1$) para garantir uma medição rápida sem com isso perder precisão na medição.

Como os díodos laser são atuados por PWM, seja, são atuados por pulsos *ON-OFF* modulados em função de um *duty cycle*, isto significa que, aos fotodíodos irá, igualmente, chegar um conjunto de sinais pulsados. Como se pretendem utilizar as entradas analógicas de um microcontrolador para aquisição de sinal, este tem, previamente, de ser reduzido a um sinal contínuo. Para tal, foi utilizado um filtro passa-baixo tal como presente na Figura 3.11. Este filtro apresenta uma frequência de corte de acordo com a expressão $f_c = 1/(2\pi.R.C)$, onde $f_c = 0,5$ Hz , $R = 3,1$ M Ω e $C = 100$ nF.

3.4 Integração e Protótipo

Após dimensionamento e teste dos componentes e circuitos eletrónicos, procedeu-se ao desenho e fabrico de diferentes placas de circuito impresso (PCBs), assegurando a miniaturização e portabilidade de todo sistema. Todas as PCBs foram desenhadas recorrendo ao *software* de desenho de placas de circuito integrado *Altium*.

Inicialmente foram desenhadas e maquinadas duas PCBs, uma contendo toda a eletrónica de alimentação dos díodos laser assim como estes componentes, e uma segunda PCB contendo toda a eletrónica de leitura, ou seja, os circuitos de transimpedância e os fotodíodos. A Figura 3.12 apresenta o esquema final das duas PCBs. Os esquemáticos dos circuitos utilizados encontram-se nos anexos I e II.

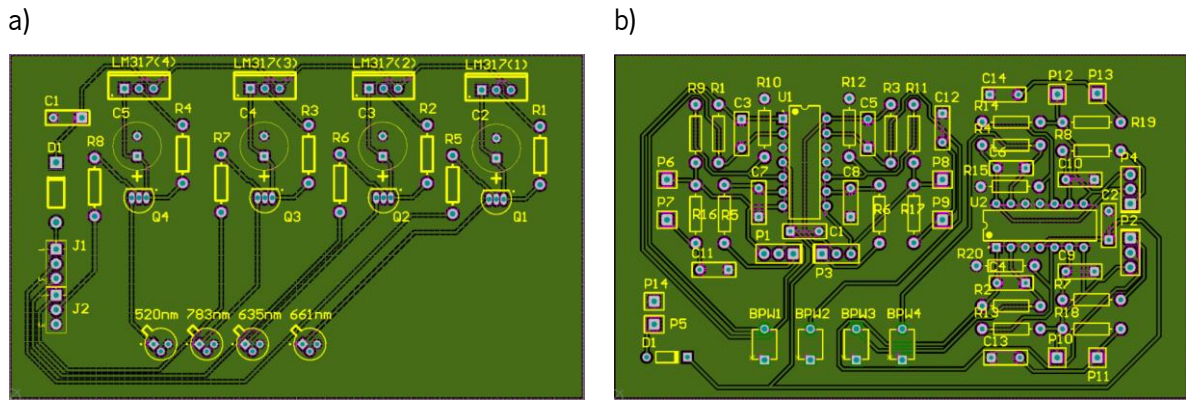


Figura 3.12- PCBs desenhadas para a primeira configuração do sistema: a) PCB de emissão; b) PCB de recepção. Cada placa tem uma dimensão de 6 cm × 23 cm.

Nesta fase optou-se pela configuração de testes apresentada na Figura 3.13. As PCBs foram posicionadas paralelamente e na horizontal, com um reservatório para amostras composto por quatro poços de PDMS (polidimetilsiloxano) de 3 mm de diâmetro, 3 mm de altura, com uma distância 3 mm entre poços, alinhados com as placas de emissão e detecção ótica. De notar que a distância entre os poços de amostra definiu, igualmente, a distância entre díodos laser e fotodíodos nas suas respetivas PCBs, garantindo o seu correto alinhamento.

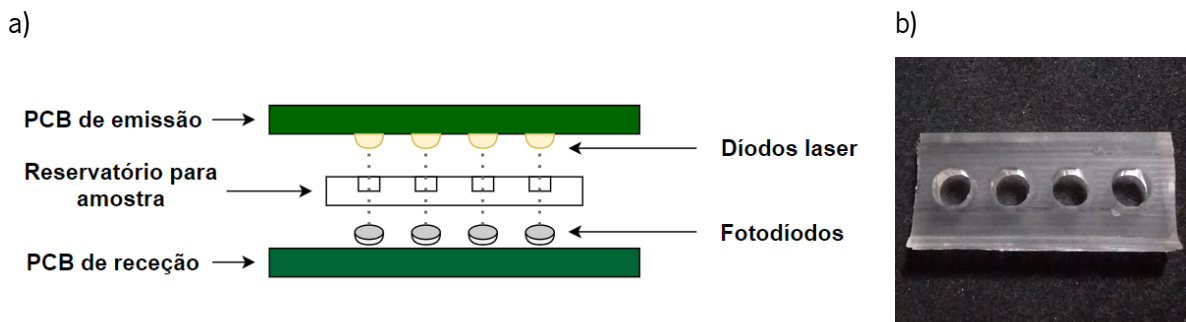


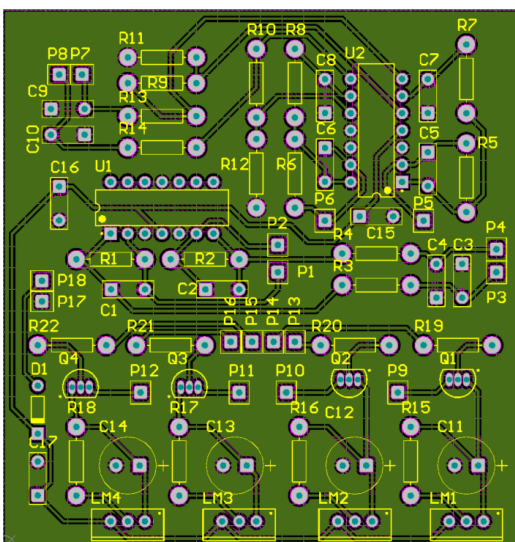
Figura 3.13 – a) Diagrama da primeira configuração adotada. Duas PCBs, contendo toda a eletrónica de instrumentação e controlo, posicionadas paralelamente na horizontal com o reservatório para amostra no seu meio. b) Reservatório para amostras: Quatro poços em PDMS com 3 mm de diâmetro, 3 mm de altura e com uma distância de 3 mm entre poços (caminho ótico de 3 mm).

Esta configuração acabou por ser abandonada por dificultar a operabilidade do sistema para a realização de testes. Como se tratam de amostras líquidas, sempre que ocorria um pequeno derrame, havia necessidade de desmontar toda a estrutura e, apesar ter sido desenhado de forma a ser muito fácil de

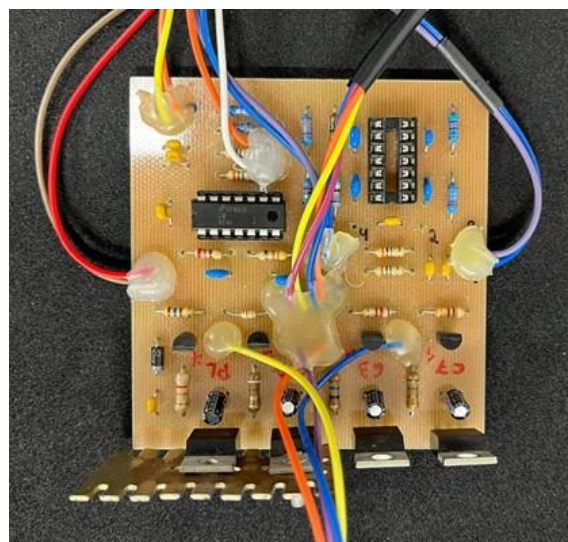
desmontar e montar, tornava o processo de concretizar múltiplos testes moroso. Por essa razão, assim como viabilidade de implementação futura em campo, optou-se por uma abordagem diferente que acabou por acompanhar o projeto até ao fim. Em vez de ter todo o dispositivo contido no mesmo encapsulamento foi desenhado um encapsulamento que alberga apenas os díodos laser, fotodíodos e os canais óticos. Desta forma, o circuito eletrónico de instrumentação e controlo é independente. Esta abordagem evita problemas com os circuitos e facilita igualmente a substituição de componentes (se necessário). Esta abordagem permitiu igualmente modificar/ajustar matrizes de díodos laser e fotodíodos com mais facilidade, assim como trocar entre reservatórios para as amostras, sem com isso ter de modificar nenhuma das PCBs. Foi então desenhada uma nova PCB, também já melhorias ao nível do desenho dos circuitos. Esta, ao contrário da anterior, contém toda a componente eletrónica, excetuando os díodos laser e fotodíodos, que passam a ter as suas próprias PCBs independentes. Portanto, o sistema final é constituído por três PCBs (apresentadas na Figura 3.14):

- PCB de instrumentação e controlo, contendo os *drivers* de alimentação dos díodos laser e os circuitos de transimpedância;
- PCB da matriz de díodos laser;
- PCB da matriz de fotodíodos.

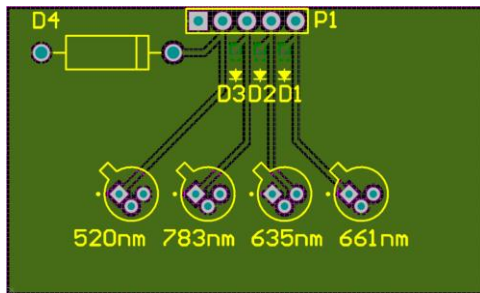
a)



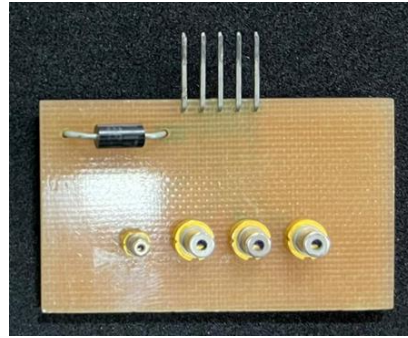
b)



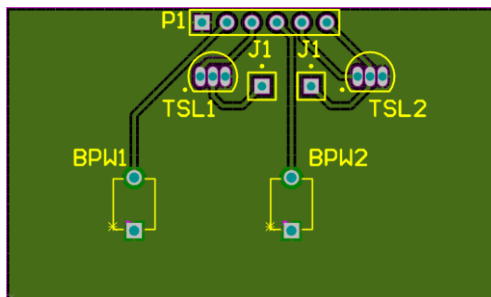
c)



d)



e)



f)

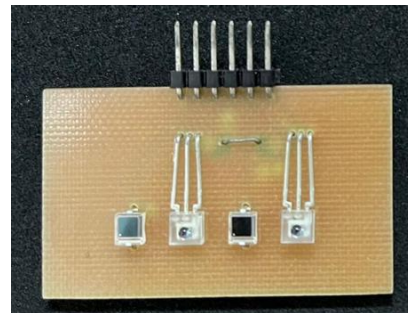


Figura 3.14- Esquemas e fotos das PCBs desenvolvidas para a segunda configuração: a) Modelo CAD (*computer-aided design*) da PCB de instrumentação e controlo; b) Fotografia da implementação final da PCB de instrumentação e controlo; c) Modelo CAD da PCB da matriz de díodos laser; d) Fotografia da implementação final da PCB da matriz de díodos laser; e) Modelo CAD da PCB da matriz de fotodíodos; f) Fotografia da implementação final da PCB da matriz de fotodíodos.

De notar que as PCBs de díodos laser e fotodíodos foram dimensionadas, assim como na abordagem inicial, de forma que estes se encontrem perfeitamente alinhados, assegurando a passagem luz entre emissor, amostra e detetor. Foram, igualmente, adicionados quatro díodos supressores de tensões transientes (TVS), para proteção electrostática, um para cada díodo laser [47]. Desta forma, a PCB com a matriz de díodos laser pode ser manuseada sem risco de provocar danos nos díodos laser por descargas electrostáticas.

3.5 Encapsulamento

Após a integração da segunda configuração das placas PCB num protótipo (secção 3.4), foi necessário desenvolver um encapsulamento físico e suportes para conter todo o sistema. Este encapsulamento tinha como requisitos a portabilidade, um bom isolamento ótico e garantir um perfeito alinhamento entre a

matriz de fotodíodos, os reservatórios para amostra e a matriz de díodos laser. Como referido na secção 3.4, a posição dos díodos laser e fotodíodos, nas suas respetivas PCBs, foi definida pelo posicionamento dos quatro poços no reservatório para amostra, ou seja, com 3 mm entre cada um (Figura 3.13(b)). Portanto, no dimensionamento do encapsulamento, ao garantir o correto posicionamento entre PCBs (matriz de díodos e matriz de fotodíodos) garante-se, igualmente, o correto posicionamento entre díodos laser e fotodíodos. Foram idealizadas duas abordagens distintas de encapsulamento, cada uma para um tipo específico de reservatório para amostra.

Os diferentes modelos foram desenhados recorrendo a desenho CAD (*computer-aided design*) e posteriormente impressos recorrendo a uma impressora 3D, modelo *witbox 2* da *Bq*. Neste processo foi utilizado um filamento de PLA (poliácido láctico) de cor preta e as impressões foram efetuadas com 100% de preenchimento interno, de forma a reduzir ao máximo o ruído luminoso externo ao sistema.

3.5.1 Primeira Abordagem

Numa primeira fase de desenvolvimento, optou-se pela utilização de um reservatório para amostras constituído por três poços de forma circular com 4 mm de diâmetro e 3 mm de profundidade contido numa placa produzida em PDMS e, por sua vez, com 1,5 cm de largura e 3,5 cm de comprimento, uma vez que implicam um baixo volume de amostra e, nos estudos anteriores, provaram ser eficazes em medições óticas. O encapsulamento desenhado e impresso é apresentado na Figura 3.15.

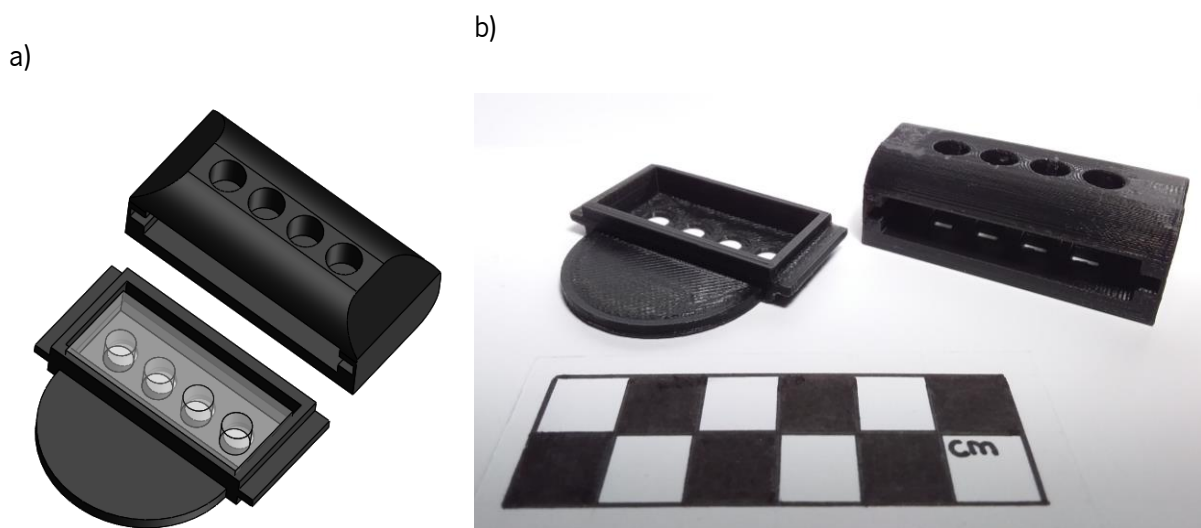


Figura 3.15- Primeira abordagem de encapsulamento para as amostras: a) Modelo em CAD; b) Fotografia da implementação (cada quadrado da escala corresponde a 1 cm).

O encapsulamento descrito é constituído por um sistema de gaveta. A PCB com os díodos laser é colocada na parte superior da gaveta, e a PCB com os fotodíodos na parte inferior da estrutura exterior. As aberturas para acoplamento dos díodos laser têm 6 mm, sendo que, por sua vez, as aberturas para fotodíodos foram dimensionadas em função das dimensões dos dois tipos de fotodíodos utilizados. As PCBs são mantidas no lugar recorrendo a uma moldura retangular (55 mm × 23 mm e espessura de 1 mm), também ela impressa em filamento de PLA. A gaveta foi dimensionada de forma a albergar os canais e assegurar a seu correto posicionamento entre testes. De forma a proteger a face das PCBs onde se encontram as pistas e soldas, foram ainda dimensionadas e impressas em filamento PLA duas camadas de proteção, uma para cada PCB (matriz de díodos laser e matriz de fotodíodos).

3.5.2 Segunda Abordagem

A segunda abordagem aplica-se ao mesmo sistema electrónico, sendo que por sua vez foi dimensionado de forma a ser compatível com um reservatório para amostra diferente do anteriormente referido. Esta abordagem, ao ser modular, permitirá a utilização do mesmo circuito de instrumentação e controlo aplicado a diferentes tipos de canais e reservatórios. Neste caso, nestes ensaios utilizou-se como reservatório uma cuvette em polimetilacrilato com 1 cm de lado, 4,5 cm de altura e 3 mL de capacidade (Figura 3.16). Ao contrário do anterior, onde a cada poço correspondia um conjunto diodo laser e fotodiodo (análise de um comprimento de onda por poço), este reservatório, por sua vez, será atuado pelos quatro díodos laser (sequencialmente) sendo o sinal lido nos correspondentes fotodíodos. A cuvette posiciona-se na sua posição vertical, pelo que requer um conjunto de suportes que garantam o correcto posicionamento das duas PCB matriz (matriz de díodos laser e matriz de fotodíodos). O encapsulamento é constituído por um suporte principal capaz de albergar a cuvette e de a manter correctamente posicionada. Neste serão acopladas as duas PCB de emissão e aquisição de sinal, com as suas correspondentes camadas de proteção (apresentadas na secção anterior). As suas dimensões são apresentadas na Figura 3.16. Foram dimensionados ainda dois paralelepípedos retangulares sem uma das faces (caixa), de dimensão igual (largura 3,4 cm x comprimento 3,8 cm x altura 1,5 cm e espessura de 1,5 cm). Estes foram utilizados como base e tampa de todo o encapsulamento. Na Figura 3.17 é apresentada a implementação final do encapsulamento do sistema.

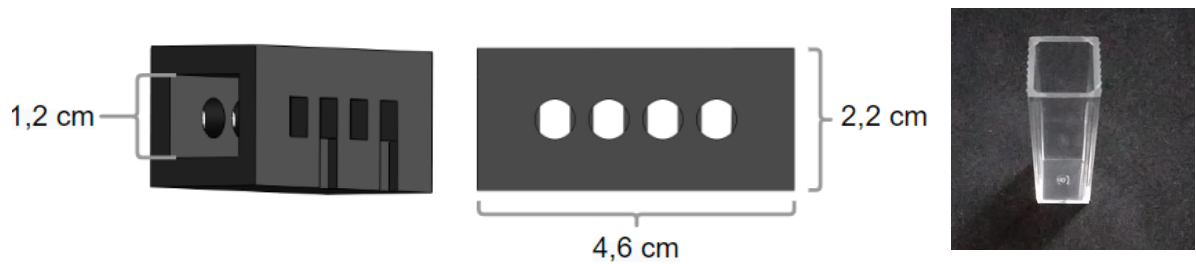


Figura 3.16- Suporte principal da segunda iteração de encapsulamento. À esquerda apresenta-se a vista em perspectiva, da face de acoplamento da PCB com a matriz de fotodíodos visível. A dimensão apresentada corresponde à dimensão do quadrado interior. Ao centro apresenta-se a face de acoplamento da PCB com a matriz de díodos laser, com as suas dimensões exteriores. À direita apresenta-se o reservatório para amostras: Cuvete em polimetilacrilato com 1 cm de lado, 4,5 cm de altura e 3 ml de capacidade, e caminho ótico de 1 cm.

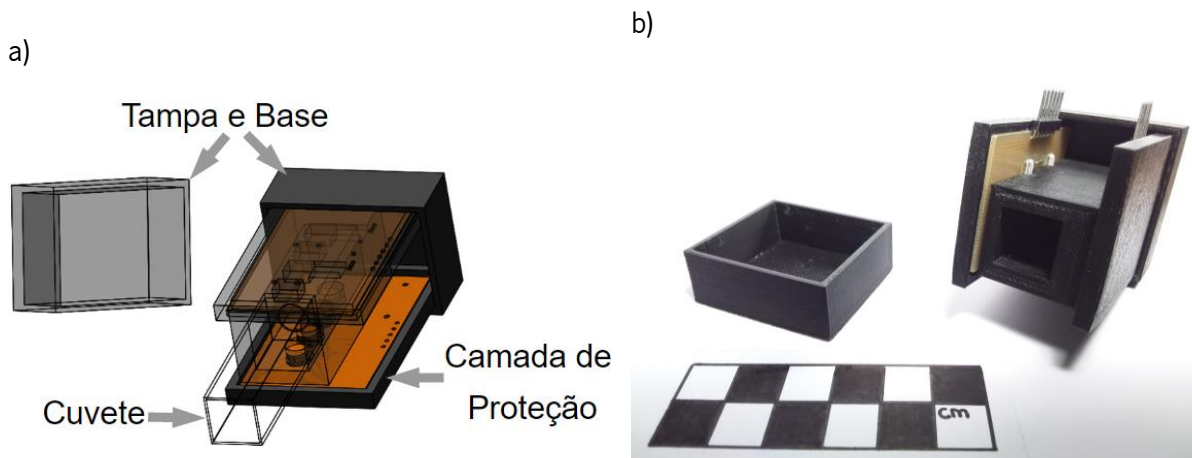


Figura 3.17- Implementação final da segunda abordagem de encapsulamento: a) Modelo em CAD, em que para auxiliar a visualização, a alguns componentes foi aplicada transparência; b) Fotografia da implementação (cada quadrado da escala corresponde a 1 cm).

3.6 Algoritmo de Aquisição e Processamento

Por fim, implementou-se ainda um algoritmo de atuação, leitura e processamento de dados capaz de controlar o circuito de atuação, ler e processar os valores de tensão à saída dos circuitos de transimpedância. Para tal, optou-se pela utilização de um microcontrolador *Arduino MEGA 2560*, do qual foram utilizados quatro portos PWM e quatro entradas analógicas. O microcontrolador encontra-se conectado, via USB, a um computador, onde se encontra em execução o *software Arduino Integrated*

Development Environment (IDE), permitindo utilizar o seu *Serial Port Monitor*, que servirá como interface de comunicação com o utilizador.

De uma forma geral, o primeiro teste começa 30 segundos após o dispositivo ser conectado, sendo que o utilizador é notificado deste intervalo de tempo, assim como do início do teste através do monitor. Optou-se por introduzir estes 30 segundos para dar tempo ao utilizador para posicionar corretamente o reservatório para amostra e garantir que tudo se encontra pronto para o início do teste. Caso o utilizador opte por fazer múltiplos testes seguidos, estes 30 segundos permitem ainda trocar a amostra que se encontra no interior do encapsulamento, antes do início do teste seguinte.

O controlo dos díodos laser é feito através dos portos PWM disponíveis no microcontrolador. Cada díodo laser é atuado durante 1 segundo, individualmente e na sua vez, sendo que entre a atuação de cada díodo laser existe um intervalo de espera de 1 segundo. A ordem pela qual os díodos laser são atuados é apresentada na Figura 3.18.

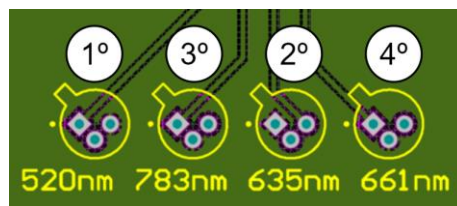


Figura 3.18- Ordem de atuação dos díodos laser: 1º PL 520_B2 (520 nm); 2º ADL-63054TL (635 nm); 3º LNC728PS01WW (783 nm); 4º LNCQ28PS01WW (661 nm).

Esta ordem evita que o díodo laser atuado se encontre diretamente posicionado ao lado do díodo laser atuado imediatamente antes (a única exceção é entre o 2º e o 3º momento de atuação). Pretende-se, com a implementação de 1 segundo de intervalo entre díodos laser, assim como a ordem de atuação, reduzir o ruído térmico e ótico durante a rotina de teste.

A cada díodo laser atuado, o microcontrolador regista o valor medido, através das suas entradas analógicas, nos terminais do circuito de transimpedância ao qual corresponde o díodo laser atuado nesse momento. Cada díodo laser é atuado, pela ordem referida, cinco vezes, sendo que o algoritmo guarda os valores medidos numa estrutura de dados. O teste, excluindo os trinta segundos de intervalo inicial, tem a duração de quarenta segundos. No final do teste, o utilizador é notificado do seu fim e no monitor são impressos os valores obtidos, convertidos em tensão e agrupados por cada díodo laser, como se pode observar no exemplo apresentado na Figura 3.19.


```
LNCQ28PS01WW (661 nm) PWM:  
100%  
VALORES:  
3,4066  
3,3969  
3,3871  
3,3773  
3,3822
```

Figura 3.19 - Exemplo de saída do algoritmo implementado.

De seguida, o utilizador é notificado, novamente, de que faltam trinta segundos para o início do teste seguinte. Neste momento o utilizador pode optar por terminar a ronda de testes, desligando o dispositivo, ou por trocar o reservatório que se encontra no encapsulamento e continuar a testar diferentes amostras. A rotina de leitura tem ainda duas opções de atuação: uma delas aplica um valor fixo de *duty cycle* durante todo o teste; a segunda, por sua vez, aplica um valor variável de *duty cycle* a cada diodo laser, começando nos 25% e até aos 100%, com incrementos de 25%. No fim desta rotina, são impressos os cinco valores agrupados por diodo laser e respetivo *duty cycle*, sendo que o teste com PWM variável demora quatro vezes mais do que o teste com PWM fixo.

Foram ainda implementadas funções de cálculo de média e desvio padrão, que são aplicadas aos valores lidos por diodo laser e *duty cycle* (caso este se encontre no modo variável). Os valores calculados são igualmente impressos no monitor após o teste. O código implementado no microcontrolador apresenta-se no Apêndice I.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos nos testes efetuados com o dispositivo, para as duas abordagens apresentadas na secção 3.5.

Antes de cada conjunto de testes, apresentados neste capítulo, foi efetuada uma medição de referência, de forma a garantir que o desgaste do material e efeitos externos ao sistema não afetam os resultados medidos. Para cada amostra, foram feitas 3 medições. Em cada uma das medições, cada diodo laser foi atuado 5 vezes (tal como descrito na secção 3.6, Algoritmo de aquisição e processamento), sendo registados 5 valores. Assim, os valores médios apresentados resultam sempre de uma amostragem de 15 valores (3 medições x 5 valores adquiridos).

4.1 Testes da Abordagem 1

A abordagem 1 descrita na secção 3.5.1, ou seja, a configuração baseada nos poços cilíndricos em PDMS, foi testada com amostras de H₂ suspensas em água com as concentrações: 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL; 14 µg/mL; 16 µg/mL; 18 µg/mL; 20 µg/mL. A Tabela 8 e Tabela 9 apresentam as médias dos valores medidos pelo microcontrolador nos terminais dos circuitos de transimpedância, com duas diferentes combinações de valores de *duty cycle* aplicados na atuação dos díodos laser. Em particular, na Tabela 8, os díodos laser PL 520_B2 (520 nm) e ADL-63054TL (635 nm) são atuados a 100% do *duty cycle* e os díodos laser LNCQ28PS01WW (661 nm) e LNC728PS01WW (783 nm) a 25%. Na Tabela 9, todos os díodos laser são atuados a 100% do *duty cycle*.

Tabela 8 -Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de Hz nas concentrações: 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL; 14 µg/mL; 16 µg/mL; 18 µg/mL; 20 µg/mL. Teste com os díodos laser PL 520_B2 (520 nm) e ADL-63054TL (635 nm) atuados a 100% do *duty cycle* e os díodos laser LNCQ28PS01WW (661 nm) e LNC728PS01WW (783 nm) a 25%.

Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância (V)												
		Concentração de Hz										
		1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Comprimento de onda (nm)	525	0,6891	0,6794	0,6647	0,6354	0,5963	0,5914	0,5376	0,5083	0,5181	0,4985	0,523
	632	1,5885	1,5347	1,5103	1,4321	1,3343	1,5347	1,3636	1,2561	1,261	1,1926	1,2463
	668	1,2512	1,1975	1,1779	1,1486	1,1193	1,2414	1,2023	1,1584	1,1779	1,1486	1,173
	799	1,1926	1,1095	1,1486	1,1388	1,1046	1,393	1,3832	1,3587	1,3636	1,349	1,3539

Tabela 9- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de Hz nas concentrações: 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL; 14 µg/mL; 16 µg/mL; 18 µg/mL; 20 µg/mL. Teste com os díodos laser atuados a 100% do *duty cycle*.

Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância (V)												
		Concentração de Hz										
		1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
		µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Comprimento de onda (nm)	525	0,6891	0,6794	0,6647	0,6354	0,5963	0,5914	0,5376	0,5083	0,5181	0,4985	0,523
	632	1,5885	1,5347	1,5103	1,4321	1,3343	1,5347	1,3636	1,2561	1,261	1,1926	1,2463
	668	4,3939	4,2326	4,2082	3,998	3,8172	4,262	3,7292	3,3871	3,5533	3,2356	3,3089
	799	3,3382	3,172	3,3431	3,348	3,2747	4,042	3,9736	3,8172	3,8905	3,8514	3,8465

Como foi referido no início do capítulo, antes de todos os testes, foram efetuadas medições de referência utilizando água de forma a estabelecer os valores de tensão de referência utilizados no cálculo da transmitância e absorvância óticas das amostras. Como foi apresentado na secção 3.2, os valores de corrente medidos para os quatro diferentes comprimentos de onda (associados a cada um dos díodos laser), diferem em múltiplas ordens de grandeza, pelo que, para proceder à reconstrução do espectro reproduzido pelos quatro comprimentos de onda, foi necessário proceder a uma pós-calibração e

normalização destes valores. Além disso, este processo de normalização dos dados servirá também para eliminar possíveis variações da intensidade dos díodos laser com o seu tempo de vida. Para isso, desenvolveu-se um algoritmo, aplicado a todos os ensaios: uma vez calculadas as médias dos valores medidos para cada comprimento de onda, é identificada a tensão mais elevada aos terminais do circuito de transimpedância. Esta tensão, por sua vez, é utilizada como um valor de calibração/normalização para todas as restantes tensões dos outros comprimentos de onda do sistema. Nesta fase, procede-se ao cálculo do quociente entre a tensão de referência identificada (tensão mais elevada) e as restantes tensões medidas para cada um dos outros comprimentos de onda. O resultado do quociente calculado para cada comprimento de onda, com a amostra de referência, serve então como fator multiplicador de calibração que será aplicado nas medições das amostras em análise, nos testes subsequentes. A Figura 4.1, apresenta o fluxograma do processo de normalização descrito.

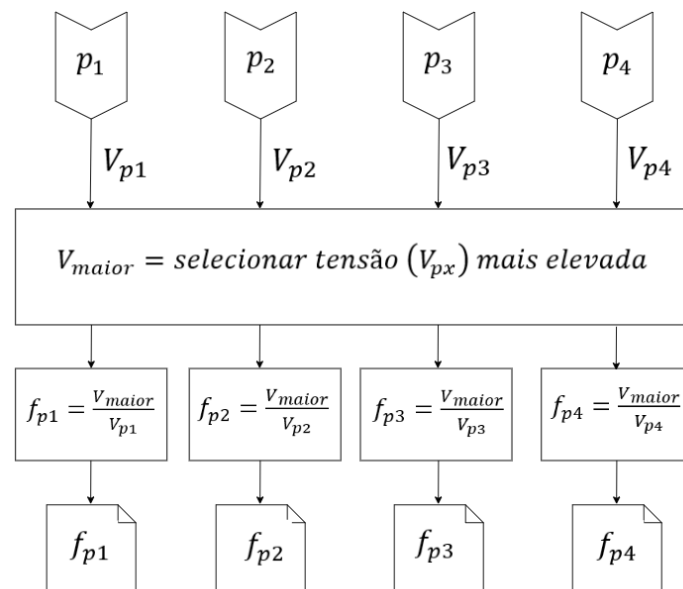


Figura 4.1- Fluxograma do processo de normalização dos dados medidos na entrada do microcontrolador: p_x - entradas analógicas do microcontrolador; V_{px} - tensão medida; f_x - fator multiplicador de calibração

A partir dos valores normalizados, para cada uma das amostras, procede-se então ao cálculo da transmitância da amostra (usando também os valores normalizados da amostra de referência), de acordo com a equação (1). A partir dos valores de transmitância, calcula-se a absorbância. Este procedimento é repetido em todas as análises experimentais apresentadas neste capítulo. A Figura 4.2 apresenta as absorbâncias normalizadas calculadas para as amostras de Hz em água, calculadas a partir dos valores de tensão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

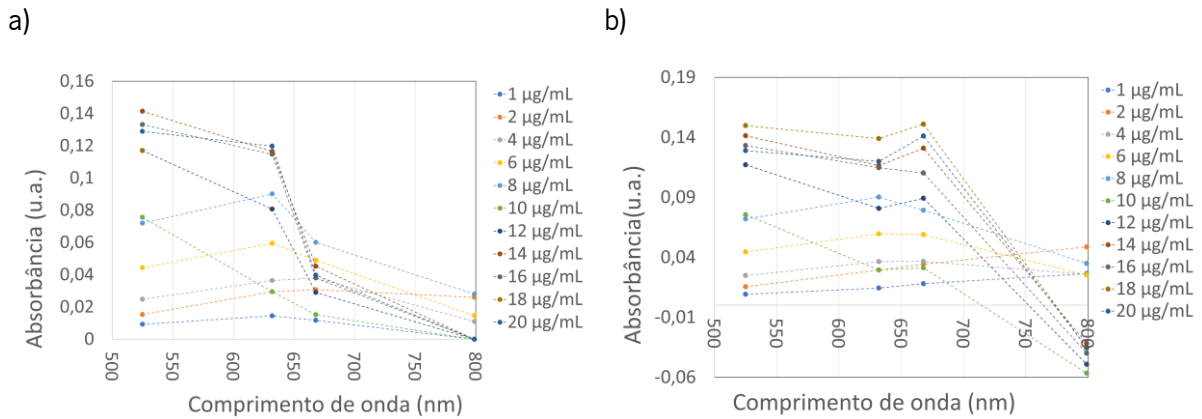


Figura 4.2- Espectro de absorção (u.a.) de Hz nas concentrações: 1 $\mu\text{g/mL}$; 2 $\mu\text{g/mL}$; 4 $\mu\text{g/mL}$; 6 $\mu\text{g/mL}$; 8 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12 $\mu\text{g/mL}$; 14 $\mu\text{g/mL}$; 16 $\mu\text{g/mL}$; 18 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$: a) Teste com os díodos laser PL 520_B2 (520 nm) e ADL-63054TL (635 nm) atuados a 100% do *duty cycle* e os díodos laser LNCQ28PS01WW (661 nm) e LNC728PS01WW (783 nm) a 25%. b) Teste com os díodos laser atuados a 100% do *duty cycle*.

Observa-se, em ambos os espectros de absorção, que, de uma forma geral, existe um aumento da absorção com o aumento da concentração de Hz na amostra, como expectável pela teoria de *Lambert-Beer*. Este aumento é observado por todo espectro, excetuando no caso do 799 nm onde, no teste executado com todos os díodos laser a atuados a 100% de *duty cycle*, se observam pontos de absorbância nula (Figura 4.2(b)). Apesar de se observarem variações da absorbância, estas não apresentam linearidade em todos os comprimentos de onda. Supõe-se que estas variações inesperadas se devam a perturbações e pequenas alterações entre testes, sejam estas relativas a variações no posicionamento dos poços de amostra, ou a perturbações externas ao sistema.

É importante referir que, numa fase inicial de desenvolvimento, avaliou-se a possibilidade de efetuar uma normalização dos valores de corrente lidos em vazio nos fotodíodos, recorrendo a uma calibração por controlo do PWM de atuação de cada díodo laser (usando um algoritmo similar ao reportado em [16]). No entanto, devido à grande disparidade entre a potência ótica emitida entre os 4 díodos laser (mesmo uns sendo atuados a 10 % de *duty cycle*, e os outros a 100%), e à maior complexidade que este algoritmo de calibração traria ao sistema, este tipo de calibração não era viável. Além disso, no caso da atuação de todos díodos laser a 100%, os resultados de absorção são de valor superior, optando-se assim pela atuação a 100% de *duty cycle* para todos os díodos laser, com calibração/normalização sempre feita após as medições, como foi descrito anteriormente nesta secção.

4.2 Testes da Abordagem 2

Nesta secção são abordados os resultados dos testes relativos à abordagem 2 descrita na secção 3.5.2. Esta será testada com amostras de Hz, amostras de sangue e amostras combinadas de sangue total e Hz.

4.2.1 Amostras de Hz

Foram testadas amostras de Hz diluídas em água com as concentrações: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL. A Tabela 12 apresenta as médias dos valores medidos pelo microcontrolador nos terminais dos circuitos de transimpedância.

Tabela 10- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de Hz nas concentrações: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância (V)								
		Concentração de Hz						
		1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL
Comprimento de onda (nm)	525	0,7038	0,694	0,6647	0,6012	0,5816	0,5279	0,347
	632	1,9062	1,784	1,7253	1,4761	1,3734	1,1388	0,6843
	668	4,9169	4,8729	4,8338	4,3109	3,9785	3,0743	1,5298
	799	4,2326	4,1984	4,1935	4,042	3,9247	3,0987	2,654

A Figura 4.3 apresenta as absorbâncias normalizadas para as amostras de Hz em água, calculadas a partir dos valores de tensão apresentados nas Tabelas 11, e seguindo o algoritmo de normalização dos dados descrito na secção anterior.

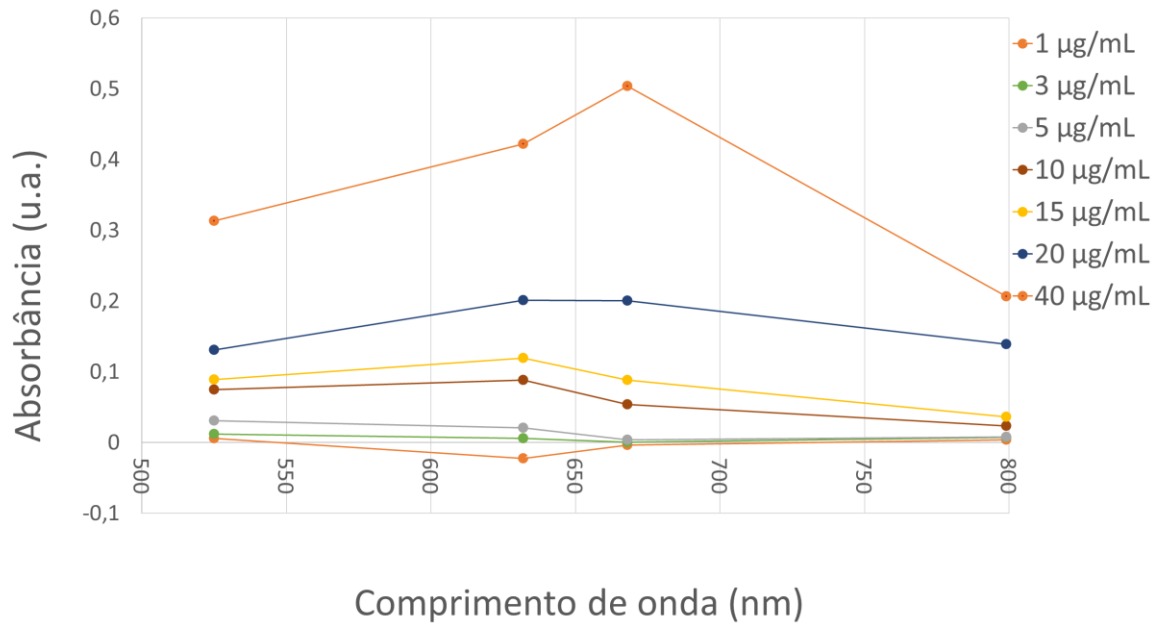


Figura 4.3- Espectro de absorção (u.a.) de Hz nas concentrações: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

Observa-se que existe um aumento da absorção com o respetivo aumento da concentração de Hz na amostra. Esse aumento é mais acentuado nos 668 nm que, como é referido e validado anteriormente, corresponde à zona do espectro onde se encontra um pico de absorção da Hz. Observa-se, igualmente, que no caso dos 1 µg/mL de concentração de Hz, o dispositivo apresenta valores de absorção nula para dois comprimentos de onda, sendo que, nos restantes dois comprimentos, o valor de absorção também se encontra muito perto de zero. O teste para esta concentração foi repetido, mas não apresentou melhorias, sendo que, para todos os testes feitos com esta concentração, os valores de absorbância ficaram muito próximos dos valores medidos inicialmente.

4.2.2 Amostras de Sangue Total

De forma a avaliar a capacidade de leitura do sistema para diferentes concentrações de sangue total, foram testadas amostras com sangue total diluído em água nas concentrações de 1%, 10%, 25% e 100% de sangue total (Figura 4.4).

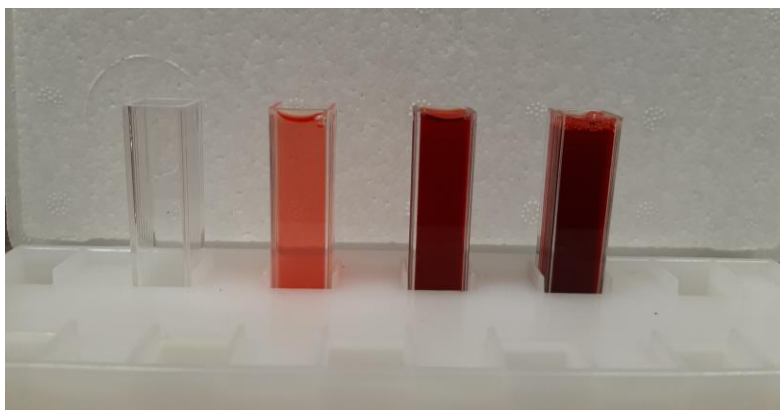


Figura 4.4- Exemplo de cuvetes de amostra contendo sangue total nas concentrações (da esquerda para a direita): 0% (vazio); 1%; 10%; 100%.

A Tabela 11 apresenta as médias dos valores medidos pelo microcontrolador nos terminais dos circuitos de transimpedância para as diferentes amostras de sangue total diluído.

Tabela 11- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de sangue total com concentrações de: 1%, 10%, 25%, 100% (obtidas por diluição).

Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância					
(V)					
		Concentração			
		1%	10%	25%	100%
Comprimento de onda (nm)	525	0,1564	0,044	0,044	0,044
	632	1,5934	0,5425	0,3617	0,0147
	668	4,3548	1,4076	1,4027	0,9189
	799	3,9687	2,6735	1,9062	1,1339

A Figura 4.5 apresenta as absorvâncias normalizadas para as amostras de sangue total diluído em água, calculadas a partir dos valores de tensão apresentados nas Tabelas 10.

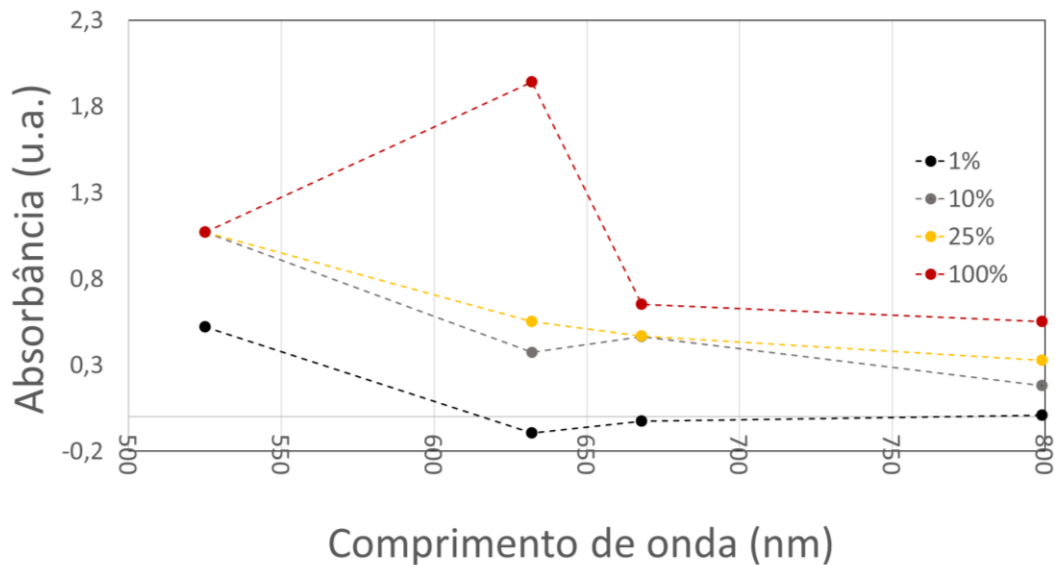


Figura 4.5- Espectro de absorção (u.a.) do sangue total nas concentrações/diluições: 1%, 10%, 25%, 100%.

Observa-se, pelo gráfico, que para a concentração de 1% de sangue total, nos comprimentos de onda 632 nm e 668 nm, a absorbância é nula. Na prática, foram registados valores negativos, devido a perturbações nas medições de referência e amostra para a concentração referida. De resto observa-se que, quanto maior a concentração, maior a absorbância em todo o espectro ótico analisado. Verifica-se a exceção aos 668 nm, para o sangue total nas concentrações de 10% e 25%, onde os valores de absorbância se encontram sobrepostos. Observa-se ainda que, de uma forma geral, não há variação da absorbância das amostras de sangue total entre os 670 nm e os 800 nm, o que vem ao encontro do que tinha sido observado nos ensaios preliminares efetuados no espectrofotómetro de bancada (secção 3.1).

4.2.3 Amostras de Sangue Total com Hz

Uma vez apresentados os resultados dos testes do dispositivo, utilizando amostras de sangue total e Hz isoladas, apresentam-se agora os resultados obtidos nos testes realizados com amostras combinadas, ou seja, contendo 1% e 10% de sangue total, com diferentes concentrações de Hz em suspensão. Foram então preparadas as amostras com as seguintes concentrações:

- Sangue total a 1% de concentração com as concentrações de Hz: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

- Sangue total a 10% de concentração com as concentrações de Hz: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL. As soluções de sangue total a 10% com diferentes concentrações de Hz apresentam-se na Figura 4.6. É visível que para maiores concentrações de Hz as amostras de sangue são cada vez mais escuras.

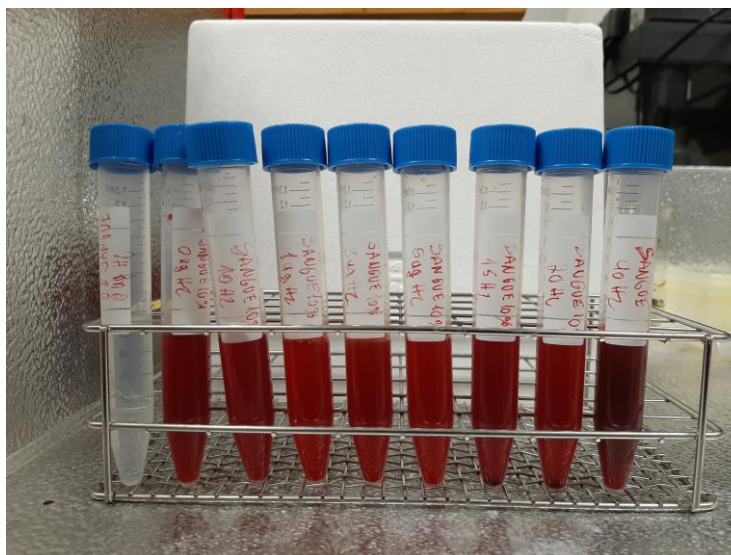


Figura 4.6 – Tubos de ensaio contendo amostras com 10% de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

A Tabela 12 apresenta as médias dos valores medidos pelo microcontrolador nos terminais dos circuitos de transimpedância.

Tabela 12- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de 1% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

		Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância (V)							
		Concentração de Hz							
		0 µg/mL	1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL
Comprimento de onda (nm)	525	0,2346	0,2248	0,1955	0,1906	0,1955	0,1564	0,1369	0,1026
	632	1,5738	1,3881	1,2952	1,2512	1,1388	0,9873	0,826	0,4057
	668	4,1349	3,7537	3,5093	3,2991	2,9912	2,4829	1,8524	1,1584
	799	3,3187	3,1916	3,1232	3,0108	2,8152	2,9814	2,6393	1,8671

A Figura 4.7 apresenta os espectros de absorbância normalizados para as amostras de sangue total a 1% e Hz em diferentes concentrações, calculados a partir dos valores de tensão apresentados na Tabela 10.

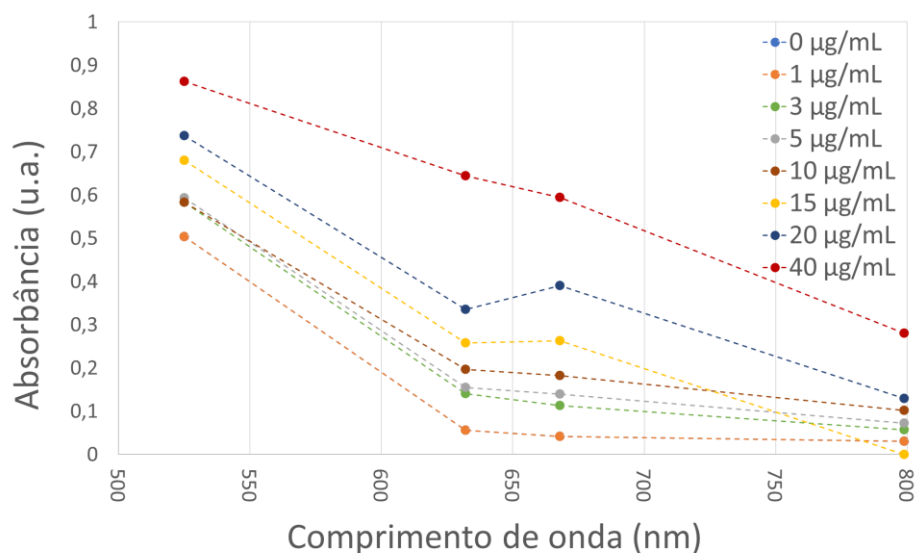


Figura 4.7- Espectro de absorção (u.a.) para as amostras de 1% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

Tabela 13- Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância para as amostras de 10% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

Valores de tensão medida nos terminais dos circuitos de transimpedância (V)									
		Concentração de Hz							
		0 µg/mL	1 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL
Comprimento de onda (nm)	525	0,0733	0,0733	0,088	0,088	0,0782	0,0831	0,0733	0,0782
	632	0,8309	0,8602	0,8016	0,7527	0,6305	0,6012	0,5425	0,3763
	668	2,2385	2,263	2,1359	1,9941	1,6227	1,5396	1,3685	1,1437
	799	2,7224	2,6295	2,4096	2,3412	2,1163	2,1261	1,999	1,6569

A Figura 4.8 apresenta os espectros de absorbância normalizados para as amostras de sangue total a 10% e Hz em diferentes concentrações, calculados a partir dos valores de tensão apresentados na Tabela 12.

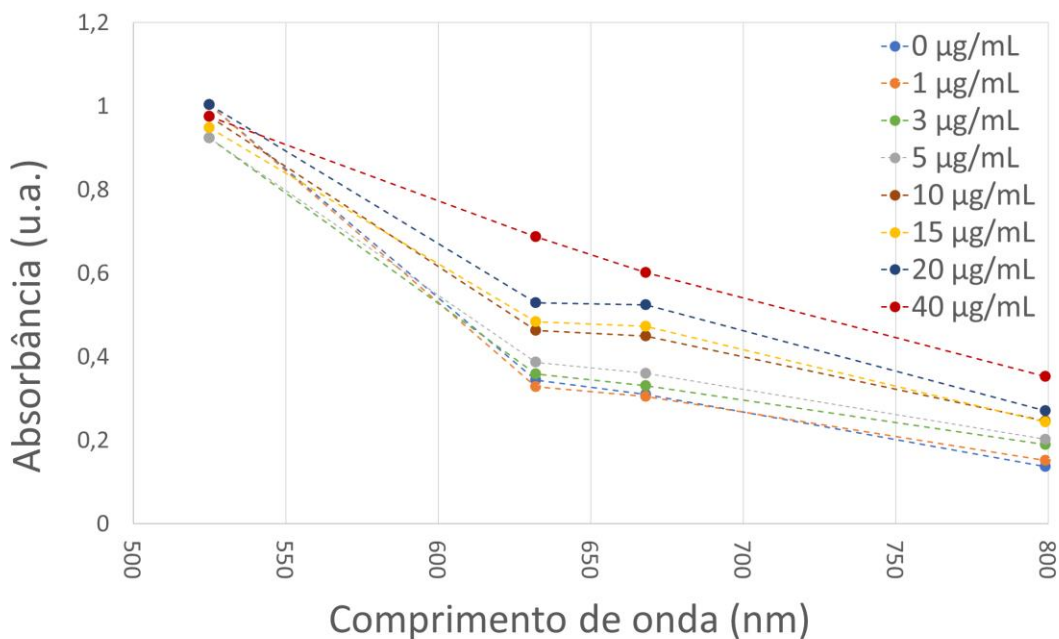


Figura 4.8- Espectro de absorção (u.a.) para as amostras de 10% de concentração de sangue total e Hz nas concentrações: 0 µg/mL, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL.

Tal como verificado nos resultados apresentados anteriormente, observa-se que existe um aumento da absorção, em todo o espectro ótico reproduzido, com o respetivo aumento da concentração de Hz e sangue total na amostra. Nestes ensaios, o aumento da absorção evidencia-se mais nos 632 nm e 668 nm (pico de absorção da Hz) uma vez que, para cada um dos dois conjuntos de amostras testadas (tendo cada conjunto uma concentração de sangue total fixa), apenas a concentração de Hz é que aumenta. Ou seja, em cada um dos gráficos, a componente da absorbância provocada pela concentração de sangue total é a mesma para todas as amostras. No entanto, se forem comparados os dois gráficos, entre os testes realizados com 1% e 10% de concentração de sangue total, observam-se diferenças nos espectros reproduzidos. No caso das amostras com 1% de sangue total, o impacto na absorbância nos 668 nm, com o aumento da concentração de Hz é mais evidente. Esta diferença seria de esperar, pois a absorbância provocada pelo sangue total a 1% de concentração terá um menor impacto quando comparada com a absorbância observada com os 10% de concentração, como aliás é constatável nos resultados obtidos com amostras contendo apenas diferentes concentrações de sangue total (secção 4.2.1). No entanto, verifica-se que o sistema é capaz de identificar variações na concentração de Hz até 1 µg/mL, mesmo para amostras de sangue até 10% de diluição.

A partir dos resultados obtidos, podem definir-se as especificações finais do dispositivo desenvolvido, tal como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14- Especificações finais do dispositivo.

Dimensões	Abordagem 1	largura 5,5 cm x comprimento 5,5 cm x altura 2,5 cm
	Abordagem 2	largura 3,5 cm x comprimento 4 cm x altura 6 cm
	Placa do circuito de controlo	largura 7,5 cm x comprimento 8 cm x altura 2 cm
Peso		100 g
Tempo de teste		40 s
Sensibilidade	525 nm	3,3 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (1% sangue) e 0,122 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (10% sangue)
	632 nm	29 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (1% sangue) e 11 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (10% sangue)
	668 nm	74 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (1% sangue) e 26 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (10% sangue)
	799 nm	36 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (1% sangue) e 27 mV/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (10% sangue)
Limite mínimo deteção Hz		1 $\mu\text{g/mL}$
Tensão de alimentação		15 V
Consumo de corrente		210 mA
Potência máxima de consumo		3,15 W

5. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

O presente capítulo, e final, apresenta as principais conclusões do trabalho realizado e apresentado nos capítulos anteriores. São ainda abordadas algumas propostas de melhoria futuras para o dispositivo desenvolvido.

5.1 Conclusões

A dissertação realizada enquadrou-se no projeto MalariaChip que decorreu entre julho de 2018 e maio de 2022, tendo também contribuído para o projeto iProof20, promovido pela TecMinho, e que decorreu em 2017, ambos executados na Universidade do Minho.

Para este trabalho de dissertação foi proposto o desenvolvimento de um sistema ótico de quantificação de Hz em sangue total. O mecanismo desenvolvido foi baseado na deteção ótica por espectrofotometria de absorbância, recorrendo a tecnologia de díodos laser como emissores de luz, tendo como objetivos a utilização do menor número possível de comprimentos de onda necessários, deteção de Hz com boa sensibilidade, baixo consumo de energia e a redução do tamanho do dispositivo, relativamente a dispositivos desenvolvidos anteriormente.

Numa fase inicial do trabalho, realizaram-se testes preliminares de caracterização ótica de amostras de Hz e sangue total, com o objetivo de escolher os comprimentos de onda ideais para o desenvolvimento do sistema proposto. Após esta análise, a implementação final recorreu a quatro comprimentos de onda: 525 nm; 632 nm; 668 nm; 799 nm, cuja atuação e leitura foi integrada num sistema com díodos laser, fotodíodos e circuitos de transimpedância para a leitura dos sinais nos sensores óticos.

Para a implementação final, desenvolveram-se três placas de circuito integrado, uma para os díodos laser utilizados, outra para os fotodíodos e uma contendo a restante eletrónica de instrumentação e atuação. Desenvolveram-se ainda dois tipos de encapsulamento, cada um para um tipo específico de reservatório para amostra, e ambos compatíveis com o sistema eletrónico desenvolvido. O dispositivo foi testado com diferentes amostras com Hz, amostras com sangue total e ainda com amostras contendo sangue total e Hz em simultâneo.

Foi possível proceder a uma reconstrução dos espectros de absorção ótica recorrendo apenas a quatro comprimentos de onda, sendo que os resultados mostram que é possível identificar a presença de Hz numa amostra. Concluiu-se que o dispositivo desenvolvido consegue medir pequenas variações no

espectro ótico de absorção, até ao limite de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hemozoína em sangue total (diluído a 10%), com sensibilidade mínima de 0,122 $\text{mV}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$. O dispositivo apresentou um tempo de teste muito reduzido, inferior a 1 minuto, ou seja, abaixo do tempo de teste dos métodos convencionais. Além disso, as vantagens apresentadas, nomeadamente as dimensões finais, portabilidade, tempo de teste por amostra e facilidade de implementação, provam o potencial deste dispositivo e tecnologia como uma aplicação viável para o diagnóstico da malária. Por fim, o sistema de atuação desenvolvido, com base em díodos laser, poderá ainda ter potencial para, no futuro, ser integrado em sistemas óticos de deteção não invasiva, por exemplo, baseados em reflectância ótica, para medições diretamente na pele dos pacientes.

5.2 Trabalho Futuro

No seguimento do trabalho realizado na presente dissertação, para que o sistema desenvolvido possa ser melhorado e bem-sucedido como um dispositivo de diagnóstico de malária portátil, algumas limitações terão de ser ultrapassadas, nomeadamente:

- Uma melhoria na capacidade de leitura e diferenciação para concentrações mais reduzidas de Hz, ou seja, ao nível dos valores de parasitemia que os métodos atuais detetam. Na versão atual, para concentrações de Hz abaixo de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as perturbações externas e o ruído diminuem a precisão e a capacidade de diferenciação do sistema. A implementação de um amplificador de *lock-in* tornaria todo o sistema de leitura mais preciso, assim como permitiria reduzir a quantidade de amostra necessária para os testes.
- Melhoria na escolha dos díodos laser, tentando assegurar densidades de potência ótica homogêneas em todo o espectro. No caso apresentado, a escolha foi feita em função dos díodos laser disponíveis no mercado. No entanto, a diferentes potências de funcionamento, os comprimentos de onda reais de emissão e especificidade influenciaram muito o comportamento do sistema.
- Otimização do algoritmo de aquisição e normalização. Apesar do algoritmo desenvolvido ser capaz de atuar todo sistema e processar os dados medidos, ainda não está dotado de uma rotina de decisão, capaz de identificar a presença ou ausência de Hz nas amostras.
- Integração de um sistema de bateria e ecrã para tornar o sistema independente de um computador e de uma fonte de alimentação externa.
- Teste do sistema com amostras de parasitas *P. falciparum* e hemozoína real.

BIBLIOGRAFIA

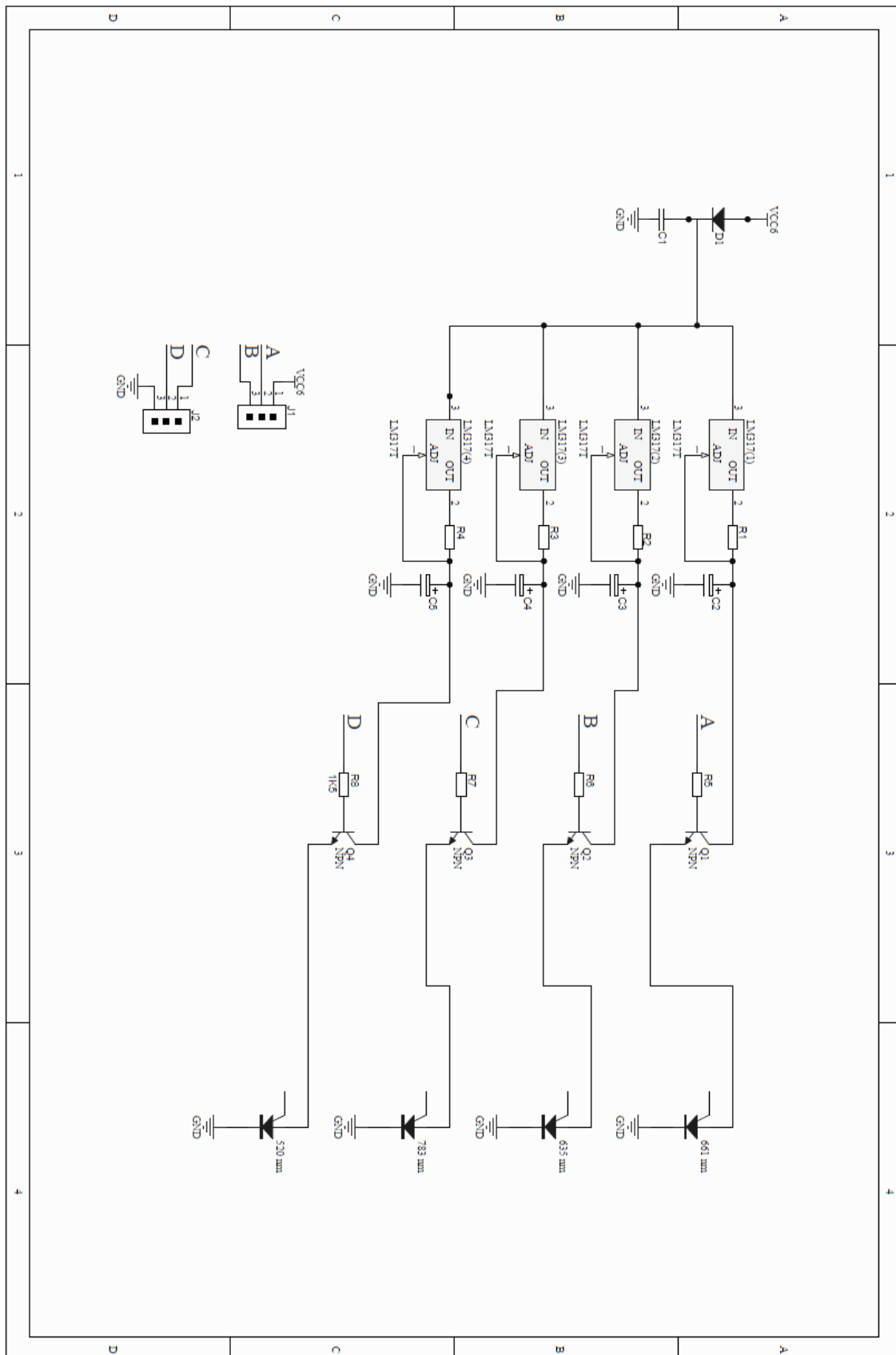
- [1] WHO, *World Malaria Report 2021*. 2021. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021>
- [2] S. I. Hay *et al.*, “Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria,” *PLoS Med.*, vol. 7, no. 2, p. e1000209, Feb. 2010.
- [3] World Health Organization, “World Malaria Report: 20 years of global progress and challenges,” *World Heal. Organ.*, vol. WHO/HTM/GM, no. December, p. 300, 2020.
- [4] V. Baptista *et al.*, “The Future in Sensing Technologies for Malaria Surveillance: A Review of Hemozoin-Based Diagnosis,” *ACS Sensors*, vol. 6, no. 11, pp. 3898–3911, Nov. 2021.
- [5] S. E. Francis, D. J. Sullivan, and D. E. Goldberg, “Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 51, pp. 97–123, Nov. 1997.
- [6] I. Silva, R. Lima, G. Minas, and S. O. Catarino, “Hemozoin and hemoglobin characterization by optical absorption towards a miniaturized spectrophotometric malaria diagnostic system,” in *ENBENG 2017 - 5th Portuguese Meeting on Bioengineering, Proceedings, 2017*.
- [7] P. L. Alonso *et al.*, “A research Agenda to underpin Malaria Eradication,” *PLoS Med.*, vol. 8, no. 1, p. e1000406, Jan. 2011.
- [8] P. Mukadi *et al.*, “External quality assessment of Giemsa-stained blood film microscopy for the diagnosis of malaria and sleeping sickness in the Democratic Republic of the Congo,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 91, no. 6, pp. 441–448, Jun. 2013.
- [9] C. K. Murray, R. A. Gasser, A. J. Magill, and R. S. Miller, “Update on rapid diagnostic testing for malaria,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 97–110, Jan. 2008.
- [10] L. J. Robinson *et al.*, “Strategies for Understanding and Reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* Hypnozoite Reservoir in Papua New Guinean Children: A Randomised Placebo-Controlled Trial and Mathematical Model,” *PLoS Med.*, vol. 12, no. 10, 2015.
- [11] E. Lukianova-Hleb *et al.*, “Transdermal diagnosis of malaria using vapor nanobubbles,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 7, pp. 1122–1127, Jul. 2015.
- [12] P. Mogeni *et al.*, “Detecting malaria hotspots: A comparison of rapid diagnostic test, microscopy, and polymerase chain reaction,” *J. Infect. Dis.*, vol. 216, no. 9, pp. 1091–1098, Nov. 2017.
- [13] R. K. Saha, S. Karmakar, and M. Roy, “Computational Investigation on the Photoacoustics of Malaria Infected Red Blood Cells,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. 51774, 2012.
- [14] M. S. Costa, V. Baptista, G. Minas, M. I. Veiga, and S. O. Catarino, “Effect of the materials’

- properties in the design of high transmittance and low FWHM SiO₂/TiO₂ thin film optical filters for integration in a malaria diagnostics device," *BIODEVICES 2021 - 14th Int. Conf. Biomed. Electron. Devices; Part 14th Int. Jt. Conf. Biomed. Eng. Syst. Technol. BIOSTEC 2021*, pp. 21–31, 2021.
- [15] M. S. Costa *et al.*, "Multilayer thin-film optical filters for reflectance-based malaria diagnostics," *Micromachines*, vol. 12, no. 8, Aug. 2021.
- [16] S. O. Catarino, P. Felix, P. J. Sousa, V. Pinto, M. I. Veiga, and G. Minas, "Portable Device for Optical Quantification of Hemozoin in Diluted Blood Samples," *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 67, no. 2, pp. 365–371, Feb. 2020.
- [17] "Spectrophotometry - GE Healthcare Life Sciences | Manualzz." [Online]. Available: <https://manualzz.com/doc/6859073/spectrophotometry-ge-healthcare-life-sciences>. [Accessed: 16-Dec-2021].
- [18] F. B. Myers and L. P. Lee, "Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics," *Lab Chip*, vol. 8, no. 12, pp. 2015–2031, Dec. 2008.
- [19] E. Mancini, A. Santoro, M. Spongano, F. Paolini, M. Rossi, and P. Zucchelli, "Continuous On-Line Optical Absorbance Recording of Blood Volume Changes during Hemodialysis," *Artif. Organs*, vol. 17, no. 8, pp. 691–694, Aug. 1993.
- [20] T. Moriuchi *et al.*, "Clinical Study of a High Accuracy Green Design Blood Glucose Monitor Using an Innovative Optical Transmission Absorbance System," *J. Diabetes Sci. Technol.*, p. 19322968211060864, Dec. 2021.
- [21] S. Pimenta, S. Cardoso, A. Miranda, P. De Beule, E. M. S. Castanheira, and G. Minas, "Design and fabrication of SiO₂/TiO₂ and MgO/TiO₂ based high selective optical filters for diffuse reflectance and fluorescence signals extraction," *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 8, p. 3084, Aug. 2015.
- [22] W. Blondel, A. Delconte, G. Khairallah, F. Marchal, A. Gavaille, and M. Amouroux, "Spatially-resolved multiply-excited autofluorescence and diffuse reflectance spectroscopy: Spectroscopic medical device for skin in vivo optical biopsy," *Electron.*, vol. 10, no. 3, pp. 1–20, Jan. 2021.
- [23] T. T. Tsai, C. A. Chen, N. Y. J. Ho, S. Yang, and C. F. Chen, "Fluorescent Double-Stranded DNA-Templated Copper Nanoprobes for Rapid Diagnosis of Tuberculosis," *ACS Sensors*, vol. 4, no. 11, pp. 2885–2892, Nov. 2019.
- [24] Y. Yuanlong, Y. Yanming, L. Fuming, L. Yufen, and M. Paozhong, "Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin," *Lasers Surg. Med.*, vol. 7, no. 6, pp. 528–532, Jan. 1987.

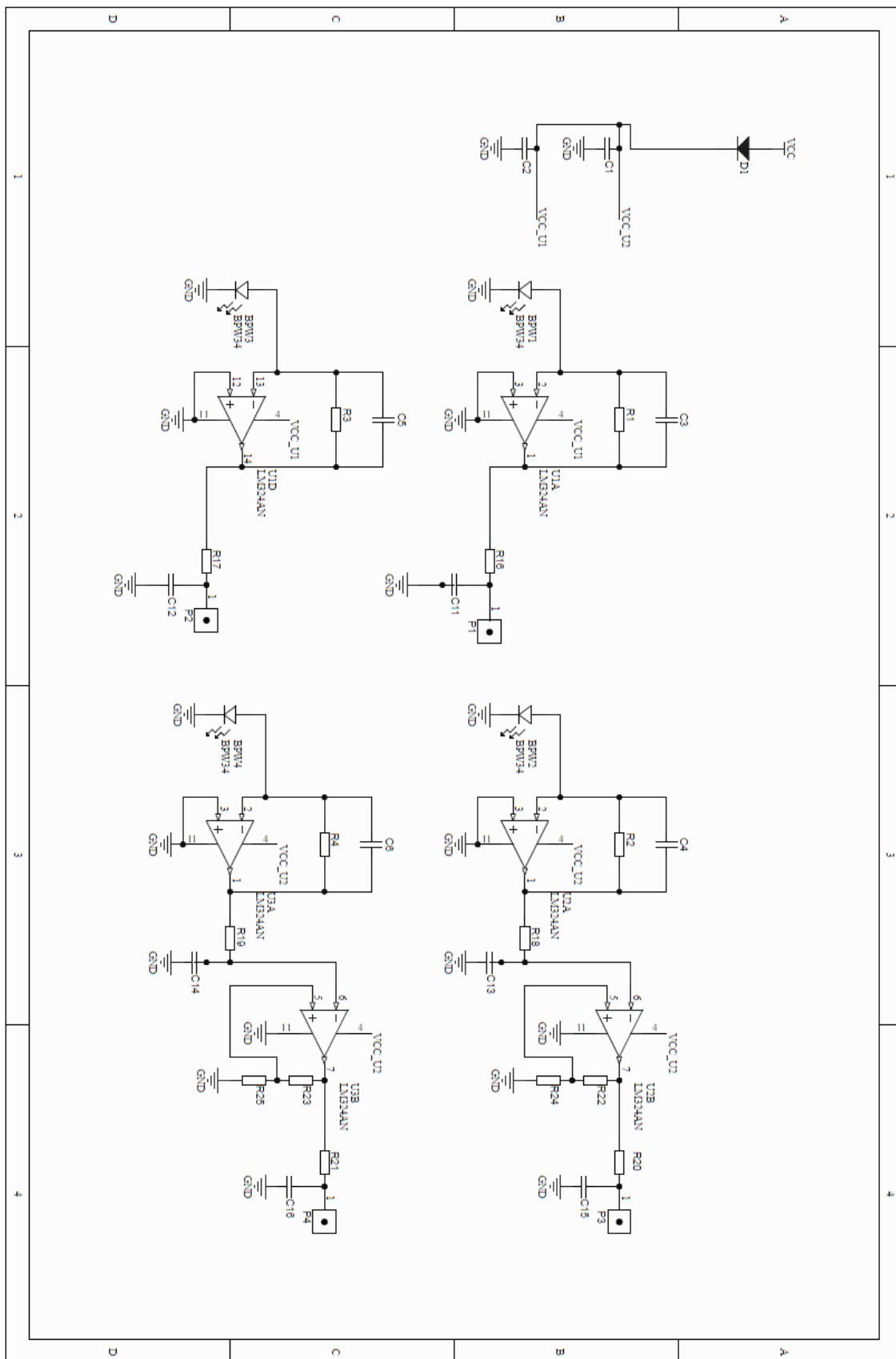
- [25] M. Bantscheff, S. Lemeer, M. M. Savitski, and B. Kuster, "Quantitative mass spectrometry in proteomics: Critical review update from 2007 to the present," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 404, no. 4, pp. 939–965, Jul. 2012.
- [26] P. L. Urban, "Quantitative mass spectrometry: An overview," *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 374, no. 2079, Oct. 2016.
- [27] W. Zhao, A. Bhushan, M. Schivo, N. J. Kenyon, and C. E. Davis, "Miniature differential mobility spectrometry (DMS) advances towards portable autonomous health diagnostic systems," in *Lecture Notes in Electrical Engineering*, vol. 75 LNEE, Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 55–73.
- [28] L. Rizza, A. D'Agostino, A. Girlando, and C. Puglia, "Evaluation of the effect of topical agents on radiation-induced skin disease by reflectance spectrophotometry," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 62, no. 6, pp. 779–785, Jun. 2010.
- [29] J. A. Oliveira, J. Mariz, C. Capela, M. Correia-Neves, and G. Minas, "Point-of-care testing device for diabetes mellitus and renal function analysis of biological fluids," *Procedia Eng.*, vol. 47, pp. 710–713, 2012.
- [30] M. Ismail *et al.*, "A diagnostic test for cocaine and benzoylecgonine in urine and oral fluid using portable mass spectrometry," *Anal. Methods*, vol. 9, no. 12, pp. 1839–1847, 2017.
- [31] J. Fernandes, S. Pimenta, F. O. Soares, and G. Minas, "A complete blood typing device for automatic agglutination detection based on absorption spectrophotometry," *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, vol. 64, no. 1, pp. 112–119, Jan. 2015.
- [32] G. Minas, J. C. Ribeiro, J. S. Martins, R. F. Wolffenbuttel, and J. H. Correia, "An array of Fabry-Perot optical-channels for biological fluids analysis," *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 115, no. 2-3 SPEC. ISS., pp. 362–367, Sep. 2004.
- [33] V. Baptista, W. K. Peng, G. Minas, M. I. Veiga, and S. O. Catarino, "Review of Microdevices for Hemozoin-Based Malaria Detection," *Biosensors*, vol. 12, no. 2, 2022.
- [34] W. K. Peng *et al.*, "Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 9, pp. 1069–1073, 2014.
- [35] I. Fescenko *et al.*, "Diamond Magnetic Microscopy of Malarial Hemozoin Nanocrystals," *Phys. Rev. Appl.*, vol. 11, no. 3, p. 1, 2019.
- [36] J. R. Abshire, C. J. Rowlands, S. M. Ganesan, P. T. C. So, and J. C. Niles, "Quantification of labile heme in live malaria parasites using a genetically encoded biosensor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 11, pp. E2068–E2076, Mar. 2017.

- [37] C. Cai *et al.*, "In vivo photoacoustic flow cytometry for early malaria diagnosis," *Cytom. Part A*, vol. 89, no. 6, pp. 531–542, Jun. 2016.
- [38] S. E. McBirney, D. Chen, A. Scholtz, B. Chen, and A. M. Armani, "Portable diagnostic for malaria detection in low-resource settings," in *Optics InfoBase Conference Papers*, 2018, vol. Part F92-C, p. ATu4J.4.
- [39] J. Nam, H. Huang, H. Lim, C. Lim, and S. Shin, "Magnetic separation of malaria-infected red blood cells in various developmental stages," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 15, pp. 7316–7323, Aug. 2013.
- [40] O. Rifaie-Graham *et al.*, "Hemozoin-catalyzed precipitation polymerization as an assay for malaria diagnosis," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019.
- [41] M. Jaramillo *et al.*, "Synthetic Plasmodium-like hemozoin activates the immune response: A morphology - Function study," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, p. e6957, Sep. 2009.
- [42] I. Silva, R. Lima, G. Minas, and S. O. Catarino, "Spectrophotometric characterization of hemozoin as a malaria biomarker," (SPIE) S of PIE, ed. *Proceedings of SPIE*. 2017;10453. doi:10.1117/12.2270995
- [43] V. Heiskanen and M. R. Hamblin, "Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes?," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 17, no. 8, pp. 1003–1017, Aug. 2018.
- [44] S. Parker, "Verifiable CPD paper: Introduction, history of lasers and laser light production," *Br. Dent. J.*, vol. 202, no. 1, pp. 21–31, Jan. 2007.
- [45] "LM117, LM317-N LM117/LM317A/LM317 3-Terminal Adjustable Regulator," 2004.
- [46] U. Thombansen and M. Ungers, "Illumination for process observation in laser material processing," *Phys. Procedia*, vol. 56, no. C, pp. 1286–1296, 2014.
- [47] R. Chundru *et al.*, "An evaluation of TVS devices for ESD protection," *IEEE Int. Symp. Electromagn. Compat.*, pp. 62–67, 2011.

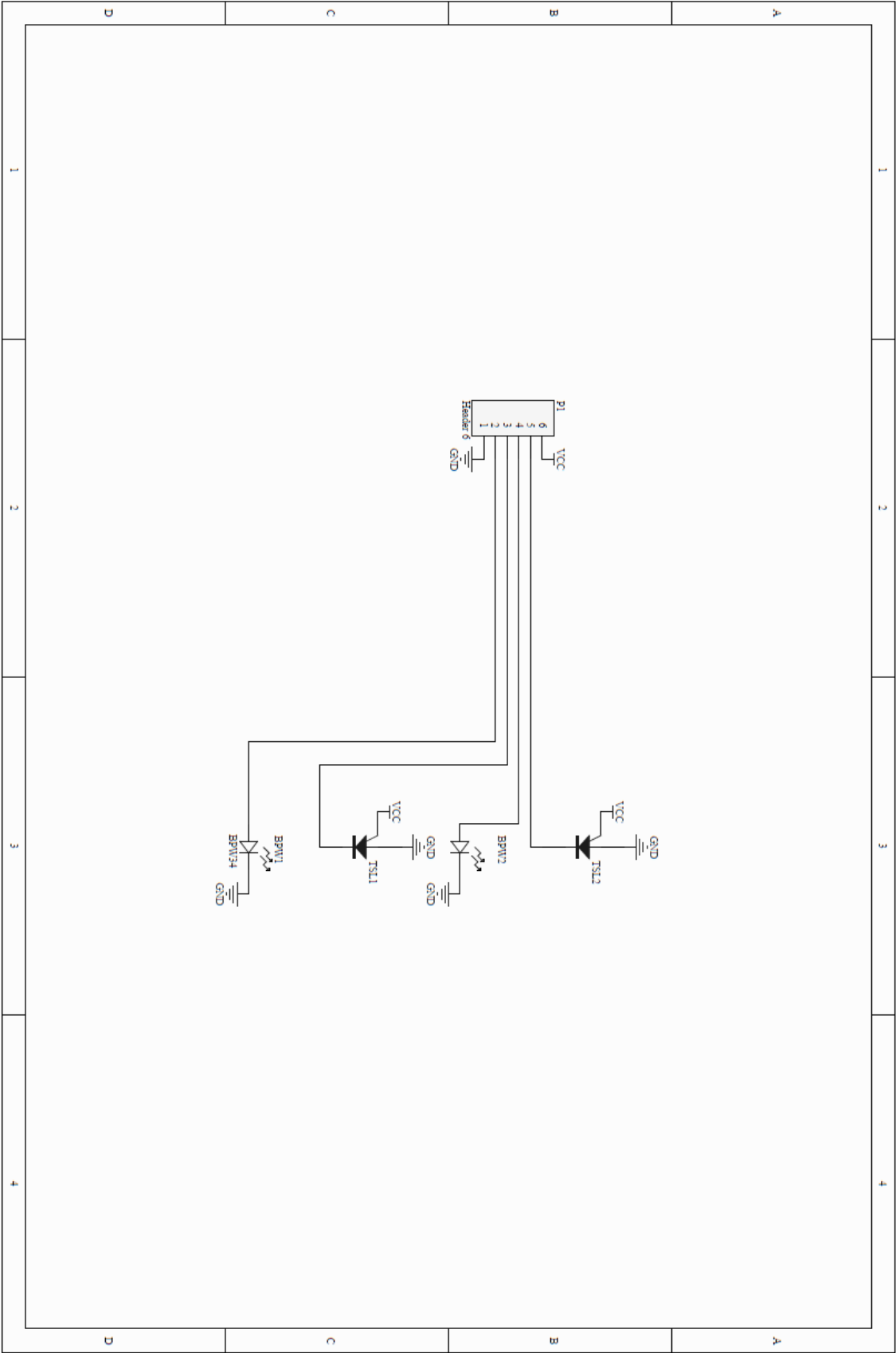
ANEXO I - ESQUEMA DO CIRCUITO DE ATUAÇÃO COMPLETO



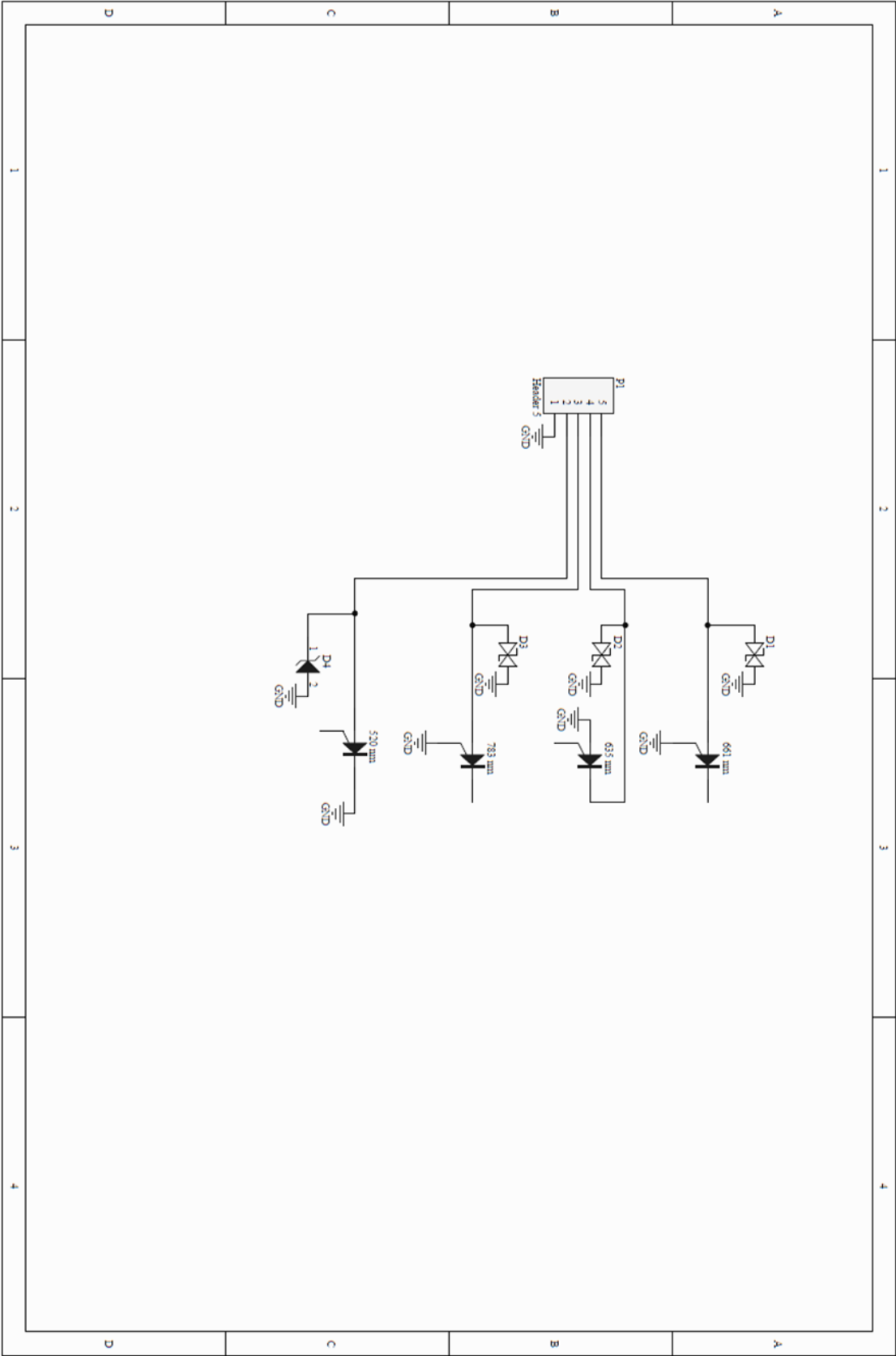
ANEXO II – ESQUEMA DO CIRCUITO DE LEITURA COMPLETO



ANEXO III – ESQUEMA DO CIRCUITO DA MATRIZ DE DÍODOS LASER



ANEXO IV – ESQUEMA DO CIRCUITO DA MATRIZ DE FOTODÍODOS



APÊNDICE I – CÓDIGO IMPLEMENTADO NO MICROCONTROLADOR

```
//FOTODIODOS
int analogPin1 = 15; //PL
int analogPin2 = 14; //63
int analogPin3 = 13; //C7
int analogPin4 = 12; //CQ

//DIODOS LASER
int ledPin1 = 9; // (PL)-> PL 520_B2 (520 nm)
int ledPin2 = 8; //(63) -> ADL-63054TL (635 nm)
int ledPin3 = 7; //(C7) -> LNC728PS01WW (783 nm)
int ledPin4 = 6; //(CQ) -> LNCQ28PS01WW (661 nm)

int sw= 40;
int sw1= 41;
int PWM=0;
int deftime =1200;

// INTERVALOS
int BT=1000; int BL=1000; int BR=2000;
float val = 0;
float volt = 0;
int aux=0;
int contador=0;
int rotina=0;
float fadeValue = 0;

//AUX VARS
int i=0;
int j=0;

//CORRENTES
float CURR_PL=0;
float CURR_L63=0;
float CURR_C7=0;
float CURR_CQ=0;

//SOMAS
float SUMPL[4];
float SUMCQ[4];
float SUML63[4];
float SUMC7[4];

//MEDIAS
float PLMED[4][4];
float CQMED[4][4];
float L63MED[4][4];
float C7MED[4][4];

//DESVIO PADRAO
float PLSD[4][4];
float CQSD[4][4];
float L63SD[4][4];
float C7SD[4][4];

//DESVIO abs
float PLD[5][4];
float CQD[5][4];
float L63D[5][4];
float C7D[5][4];

//VARIANCIAS
float PLD2[5][4];
float CQD2[5][4];
float L63D2[5][4];
float C7D2[5][4];
float PLSUMD2[5][4];
float CQSUMD2[5][4];
float L63SUMD2[5][4];
float C7SUMD2[5][4];
float PLDEV[4][4];
float CQDEV[4][4];
float L63DEV[4][4];
float C7DEV[4][4];

//DADOS
float PL[5][4];
float SAPL[5][4];
float CQ[5][4];
float SCQ[5][4];
float L63[5][4];
float SL63[5][4];
float C7[5][4];
float SC7[5][4];

void setup()
{
  Serial.begin(9600);
}

void loop()
{
  analogWrite(ledPin1, 255);
  analogWrite(ledPin2, 255);
  analogWrite(ledPin3, 255);
  analogWrite(ledPin4, 255);

  delay(1000);

  analogWrite(ledPin1, 0);
  analogWrite(ledPin2, 0);
  analogWrite(ledPin3, 0);
  analogWrite(ledPin4, 0);
  i=0;
  j=0;
  start();

  //LEITURA EM VAZIO (CALIBRAÇÃO)
  range();
  calib();

  //ROTINAS DE LEITURA

  rot1(); //PWM VARIAVEL
  rot2(); //PWM FIXO

  //CALCULO DE MÉDIAS E DESVIOS EM VAZIO
  med();
  dev();
  dev2();
  sd();
```



```

    prt();
    prtval();
    prtfixpwm();
    analogWrite(buz, 250);
    delay(1000);
    analogWrite(buz, 0);

    analogWrite(buz, 250);
    delay(1000);
    analogWrite(buz, 0);
    analogWrite(buz, 250);
    delay(1000);
    analogWrite(buz, 0);
    while (digitalRead(sw) == HIGH) {}
    Serial.println("RESET SOMAS");
    for(j=0;j<4;j++){

    SUMPL[j]=0;
    SUMCQ[j]=0;
    SUML63[j]=0;
    SUMC7[j]=0;
    }
}
void start(){

    fadeValue=255;

    analogWrite(ledPin1, 255);
    analogWrite(ledPin2, 255);
    analogWrite(ledPin3, 255);
    analogWrite(ledPin4, 255);

    delay(1000);

    analogWrite(ledPin1, 0);
    analogWrite(ledPin2, 0);
    analogWrite(ledPin3, 0);
    analogWrite(ledPin4, 0);

    delay(1000);

    analogWrite(ledPin1, fadeValue);
    delay(500);
    analogWrite(ledPin1,0);
    analogWrite(ledPin2, fadeValue);
    delay(500);
    analogWrite(ledPin2,0);
    analogWrite(ledPin3, fadeValue);
    delay(500);
    analogWrite(ledPin3,0);
    analogWrite(ledPin4, fadeValue);
    delay(500);
    analogWrite(ledPin4,0);
}

void range(){

int low=10;

    analogWrite(ledPin1, 255);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin1);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_PL=volt/16000000;

    Serial.println("MAX");
    Serial.println(val);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_PL,20);
    analogWrite(ledPin1,low);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin1);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_PL=volt/16000000;
    Serial.println("MIN");
    Serial.println(val);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_PL,20);
    analogWrite(ledPin1,0);

    analogWrite(ledPin2, 255);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin2);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_L63=volt/16000000;
    Serial.println("MAX");
    Serial.println(val);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_L63,20);
    analogWrite(ledPin2,low);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin2);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_L63=volt/16000000;
    Serial.println("MIN");
    Serial.println(val);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_L63,20);
    analogWrite(ledPin2,0);

    analogWrite(ledPin3, 255);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin3);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_C7=volt/165;
    Serial.println("MAX");
    Serial.println(val);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_C7,20);
    analogWrite(ledPin3,low);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin3);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_C7=volt/165;
    Serial.println("MIN");
    Serial.println(val,20);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_C7,20);
    analogWrite(ledPin3,0);

    analogWrite(ledPin4, 255);
    delay(BR);
    val = analogRead(analogPin4);
    volt= val*(5.0/1023.0);
    CURR_CQ=volt/191;
    Serial.println("MAX");
    Serial.println(val);
    Serial.println(volt,20);
    Serial.println(CURR_CQ,20);

```

```

analogWrite(ledPin4,low);
delay(BR);
val = analogRead(analogPin4);
volt= val*(5.0/1023.0);
CURR_CQ=volt/191;
Serial.println("MIN");
Serial.println(val);
Serial.println(volt,20);
Serial.println(CURR_CQ,20);
analogWrite(ledPin4,0);
}
void calib(){

  aux=1;
  analogWrite(ledPin1, 255);
  delay(BR);
  val = analogRead(analogPin1);
  volt= val*(5.0/1023.0);
  CURR_PL=volt/16000000;
  Serial.println(CURR_PL,20);
  analogWrite(ledPin1, 0);
  delay(10000);
  fadeValue =255;
do{
  analogWrite(ledPin2,fadeValue);
  val = analogRead(analogPin2);
  volt= val*(5.0/1023.0);
  CURR_L63=volt/16000000;
  Serial.println(CURR_L63,20);
  Serial.println(fadeValue);
  Serial.println("while");

  if(CURR_L63>CURR_PL){
    fadeValue--;
    Serial.println("if");
  }
  else{
    Serial.println("else");
    aux=0;
  }
} while(aux=1);
analogWrite(ledPin2, 0);
fadeValue =255;
aux=1;
while(aux){
  analogWrite(ledPin3,fadeValue);
  val = analogRead(analogPin3);
  volt= val*(5.0/1023.0);
  CURR_C7=volt/165;
  Serial.println(CURR_C7);

  if(CURR_C7>CURR_PL){
    fadeValue--;
  }
  else{
    aux=0;
  }
}
analogWrite(ledPin3, 0);
fadeValue =255;
aux=1;
while(aux){
  analogWrite(ledPin4,fadeValue);
  val = analogRead(analogPin4);

  volt= val*(5.0/1023.0);
  CURR_CQ=volt/191;
  Serial.println(CURR_CQ);
  if(CURR_CQ>CURR_PL){
    fadeValue--;
  }
  else{
    aux=0;
  }
}
analogWrite(ledPin1, 0);
Serial.println(CURR_PL);
Serial.println(CURR_L63);
Serial.println(CURR_C7);
Serial.println(CURR_CQ);
}
void rot1(){
  Serial.println("LEITURA COMEÇA EM 30 SEGUNDOS");
  delay (15000);
  Serial.println("15 SEGUNDOS");
  delay (15000);
  Serial.println("COMEÇOU");
  j=0;
  for(fadeValue=63.5;fadeValue<=254;fadeValue+=63.5){
    i=0;
    for(rotina=0;rotina<5;rotina++){
      delay (BT);

      Serial.println("LEITURA:");
      Serial.println(rotina);
      Serial.println("PWM:");
      Serial.println(fadeValue);

      Serial.println("PL...");

      analogWrite(ledPin1, fadeValue);
      delay(BR);

      val = analogRead(analogPin1);
      volt= val*(5.0/1023.0);

      PL[i][j]=volt;
      SUMPL[j]=SUMPL[j]+volt;

      analogWrite(ledPin1,0);

      delay (BL);

      Serial.println("63...");

      analogWrite(ledPin2, fadeValue);
      delay(BR);

      val = analogRead(analogPin2);
      volt= val*(5.0/1023.0);

      L63[i][j]=volt;
      SUML63[j]=SUML63[j]+volt;

      analogWrite(ledPin2,0);
      delay(BL);
      Serial.println("C7...");

      analogWrite(ledPin3, fadeValue);

```

```

delay(BR);

val = analogRead(analogPin3);
volt= val*(5.0/1023.0);

C7[i][j]=volt;
SUMC7[j]=SUMC7[j]+volt;

analogWrite(ledPin3,0);

delay (BL);

Serial.println("CQ...");

analogWrite(ledPin4, fadeValue);
delay(BR);

val = analogRead(analogPin4);
volt= val*(5.0/1023.0);

CQ[i][j]=volt;
SUMCQ[j]= SUMCQ[j]+volt;

analogWrite(ledPin4,0);

delay (BL);

Serial.println("Leitura Seguinte") ;
i++;
}
j++;
}
}
void rot2(){ //fix pwm

Serial.println("LEITURA COMEÇA EM 30 SEGUNDOS");
delay (15000);
Serial.println("15 SEGUNDOS");
delay (15000);
Serial.println("COMEÇOU");
j=0;
i=0;
fadeValue=191;

for(rotina=0;rotina<5;rotina++){

delay (BT);

Serial.println("PL...");

analogWrite(ledPin1, fadeValue);
delay(BR);
val = analogRead(analogPin1);
volt= val*(5.0/1023.0);

PL[i][j]=volt;

analogWrite(ledPin1,0);

delay (BL);

Serial.println("63...");

analogWrite(ledPin2, fadeValue);

```

```

delay(BR);

val = analogRead(analogPin2);
volt= val*(5.0/1023.0);

L63[i][j]=volt;

analogWrite(ledPin2,0);
delay(BL);

Serial.println("C7...");

analogWrite(ledPin3, fadeValue);
delay(BR);

val = analogRead(analogPin3);
volt= val*(5.0/1023.0);

C7[i][j]=volt;

analogWrite(ledPin3,0);

delay (BL);

Serial.println("CQ...");

analogWrite(ledPin4, fadeValue);
delay(BR);

val = analogRead(analogPin4);
volt= val*(5.0/1023.0);

CQ[i][j]=volt;

analogWrite(ledPin4,0);

delay (BL);

Serial.println("Leitura Seguinte");
i++;
}
}
void med(){

for(i=0;i<4;i++){
PLMED[i][j]=SUMPL[i]/5;
CQMED[i][j]=SUMCQ[i]/5;
L63MED[i][j]=SUML63[i]/5;
C7MED[i][j]=SUMC7[i]/5;
}
}
void dev(){

for(j=0;j<4;j++){
for(i=0;i<5;i++){

PLD[i][j]=PL[i][j]-PLMED[j][j];
CQD[i][j]=CQ[i][j]-CQMED[j][j];
C7D[i][j]=C7[i][j]-C7MED[j][j];
L63D[i][j]=L63[i][j]-L63[j][j];
}
}
}
void dev2(){

```

```

for(j=0;j<4;j++){
  for(i=0;i<5;i++){

    PLD2[i][j]=pow(PLD[i][j],2);
    CQD2[i][j]=pow(CQD[i][j],2);
    C7D2[i][j]=pow(C7D[i][j],2);
    L63D2[i][j]=pow(L63D[i][j],2);

    PLSUMD2[j][j]=PLSUMD2[j][j]+PLD2[i][j];
    CQSUMD2[j][j]=CQSUMD2[j][j]+CQD2[i][j];
    C7SUMD2[j][j]=C7D2[i][j]+C7D2[i][j];
    L63SUMD2[j][j]=L63D2[i][j]+L63D2[i][j];
  }
}
for(j=0;j<4;j++){

  PLDEV[j][j]= PLSUMD2[j][j]/5;
  CQDEV[j][j]= CQSUMD2[j][j]/5;
  L63DEV[j][j]= L63SUMD2[j][j]/5;
  C7DEV[j][j]= C7SUMD2[j][j]/5;
}
}
void sd(){

for(j=0;j<4;j++){
  PLSD[j][j]=sqrt(PLDEV[j][j]);
  CQSD[j][j]=sqrt(CQDEV[j][j]);
  L63SD[j][j]=sqrt(L63DEV[j][j]);
  C7SD[j][j]=sqrt(C7DEV[j][j]);
}
}
void prt(){

for(j=0;j<=3;j++){

  PWM=(j+1)*25;

  Serial.println("PL A PWM:");
  Serial.println(PWM);

  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( PL[i][j],4);
  }
  Serial.println("D");
  for(i=0;i<=4;i++){
    Serial.println(PLD[i][j],4);
  }
  Serial.println("D2");
  for(i=0;i<=4;i++){
    Serial.println(PLD2[i][j],4);
  }
  Serial.println("SUM | MED | DEV | SD");
  Serial.println(SUMPL[j],4);
  Serial.println(PLMED[j][j],4);
  Serial.println(PLDEV[j][j],4);
  Serial.println(PLSD[j][j],4);
}
for(j=0;j<=3;j++){

  PWM=(j+1)*25;

  Serial.println("L63 A PWM:");
  Serial.println(PWM);

  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( L63[i][j],4);
  }
  Serial.println("D");
  for(i=0;i<=4;i++){
    Serial.println(L63D[i][j],4);
  }
  Serial.println("D2");
  for(i=0;i<=4;i++){
    Serial.println(L63D2[i][j],4);
  }
  Serial.println("SUM | MED | DEV | SD");
  Serial.println(SUML63[j],4);
  Serial.println(L63MED[j][j],4);
  Serial.println(L63DEV[j][j],4);
  Serial.println(L63SD[j][j],4);
}
}

for(j=0;j<=3;j++){

  PWM=(j+1)*25;

  Serial.println("CQ A PWM:");
  Serial.println(PWM);
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( CQ[i][j],4);
  }
  Serial.println("D");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println(CQD[i][j],4);
  }
  Serial.println("D2");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println(CQD2[i][j],4);
  }
  Serial.println("SUM | MED | DEV | SD");
  Serial.println(SUMCQ[j],4);
  Serial.println(CQMED[j][j],4);
  Serial.println(CQDEV[j][j],4);
  Serial.println(CQSD[j][j],4);
}
}

for(j=0;j<=3;j++){

  PWM=(j+1)*25;

  Serial.println("C7 A PWM:");
  Serial.println(PWM);
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( C7[i][j],4);
  }
  Serial.println("D");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println(C7D[i][j],4);
  }
  Serial.println("D2");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println(C7D2[i][j],4);
  }
  Serial.println("SUM | MED | DEV | SD");
  Serial.println(SUMC7[j],4);
  Serial.println(C7MED[j][j],4);
}
}

```

```

    Serial.println(C7DEV[j][j],4);
    Serial.println(C7SD[j][j],4);
  }
}
void prtval(){
  PWM=50;
  for(j=0;j<=1;j++){
    PWM=PWM+25;
    Serial.println("PL A PWM:");
    Serial.println(PWM);
    Serial.println("VAL");
    for(i=0;i<5;i++){
      Serial.println( PL[i][j],4);
    }
  }
  PWM=50;
  for(j=0;j<=1;j++){
    PWM=PWM+25;
    Serial.println("L63 A PWM:");
    Serial.println(PWM);
    Serial.println("VAL");
    for(i=0;i<5;i++){
      Serial.println( L63[i][j],4);
    }
  }
  PWM=50;
  for(j=0;j<=1;j++){
    PWM=PWM+25;
    Serial.println("CQ A PWM:");
    Serial.println(PWM);
    Serial.println("VAL");
    for(i=0;i<5;i++){
      Serial.println( CQ[i][j],4);
    }
  }
  PWM=50;

```

```

for(j=0;j<=1;j++){
  PWM=PWM+25;
  Serial.println("C7 A PWM:");
  Serial.println(PWM);
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( C7[i][j],4);
  }
}
void prtfixpwm(){
  j=0;
  Serial.println("PL A PWM:");
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( PL[i][j],4);
  }
  Serial.println("L63 A PWM:");
  Serial.println(PWM);
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( L63[i][j],4);
  }
  Serial.println("CQ A PWM:");
  Serial.println(PWM);
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( CQ[i][j],4);
  }
  Serial.println("C7 A PWM:");
  Serial.println(PWM);
  Serial.println("VAL");
  for(i=0;i<5;i++){
    Serial.println( C7[i][j],4);
  }
}

```