

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Filtros óticos baseados em filmes finos para implementação num sistema de espectroscopia para o diagnóstico de malária

Mariana Silva dos Santos Costa

**Filtros óticos baseados em filmes finos para  
implementação num sistema de espectroscopia para o  
diagnóstico de malária**

Mariana Silva dos Santos Costa

Janeiro 2021

Janeiro 2021





**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Mariana Silva dos Santos Costa

**Filtros óticos baseados em filmes finos para  
implementação num sistema de espectroscopia para o  
diagnóstico de malária**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Dissertação orientada por

**Doutora Susana Oliveira Catarino**

**Doutora Maria Isabel Veiga**

Janeiro 2021

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

**Nome:** Mariana Silva dos Santos Costa

**Título da dissertação:** Filtros óticos baseados em filmes finos para implementação num sistema de espectroscopia para o diagnóstico de malária

**Orientadores:** Doutora Susana Catarino e Doutora Maria Isabel Veiga

**Ano de conclusão:** 2021

**Designação do mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

**Ramo de mestrado:** Eletrónica Médica

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, queria fazer um agradecimento especial à minha orientadora, Doutora Susana Catarino, por ter proporcionado a minha participação neste projeto e por todo o apoio, incentivo e disponibilidade para me auxiliar tanto a nível prático como teórico. Além disso, gostaria de enaltecer os conselhos e as aprendizagens transmitidas, que foram essenciais ao longo de todas as etapas, tendo elevado as minhas competências. Mais uma vez, muito obrigada pela excelente orientação e solicitude.

Queria agradecer, à Doutora Isabel Veiga por toda a cooperação, partilha das amostras utilizadas no desenvolver da atividade prática e contributo na revisão da dissertação.

Agradeço à Professora Doutora Graça Minas a ajuda e o acompanhamento facultados no desenvolvimento de todo o trabalho, que se revelaram fundamentais para a elaboração desta dissertação e para o enriquecimento da minha aprendizagem.

Grata também aos meus colegas do grupo de investigação, em especial à Vitória Baptista e ao Duarte Lima, por toda a disponibilidade, partilha e ótimo trabalho colaborativo.

Agracio ainda todos os meus amigos, que me acompanham desde sempre e os que fui conhecendo ao longo da minha vida académica, pois com a vossa amizade todo este percurso foi mais fácil e feliz. Nunca esquecerei os bons momentos vividos.

Finalmente, à minha família, muito obrigada pela vossa presença e motivação. Em especial aos meus pais, expresso a minha mais sincera gratidão por todo o amor, conselhos e apoio incondicional nas minhas decisões. A eles devo todo o sucesso alcançado ao longo da vida e a conclusão de mais uma etapa.

O trabalho desenvolvido foi apoiado pelo 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. Assim, gostaria de agradecer pelo apoio financeiro concedido pela bolsa ao abrigo do referido projeto.

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.

Universidade do Minho, janeiro 2021

Assinatura: \_\_\_\_\_

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa com elevada prevalência em regiões com condições de saúde debilitadas. Atualmente, o diagnóstico de malária baseia-se principalmente na microscopia e nos testes de diagnóstico rápidos, sendo limitados pela parasitemia que permitem detetar e pela necessidade de amostras de sangue dos pacientes. Assim, é urgente desenvolver novos métodos de diagnóstico precisos, independentes do utilizador, portáteis e de baixo custo, sem requererem amostras de sangue.

A presente dissertação integra um projeto de investigação que pretende desenvolver um método inovador e não invasivo de diagnóstico, baseado em espectrofotometria de reflectância ótica, para a quantificação de parasitas da malária, através da identificação de hemozoína, sem necessidade de amostras sanguíneas. O dispositivo integrará um conjunto de filtros óticos, com elevada transmitância e baixa largura a meia altura (FWHM, do inglês *low full width at half maximum*), para a reconstrução completa dos espectros de reflectância, de modo a distinguir entre glóbulos vermelhos saudáveis e infetados com o parasita da malária. Neste trabalho propõe-se o desenho, simulação e otimização de 16 filtros óticos passa-banda de largura de banda estreita e altamente seletivos, baseados em multicamadas de filmes finos de  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ , para a gama espectral entre 400 nm e 800 nm. As propriedades óticas dos materiais constituintes dos filmes finos, em particular os índices de refração, constituíram o foco deste estudo, pelo que três índices de refração diferentes foram considerados. Os resultados mostram que os filtros simulados são sensíveis a estas propriedades. Cada filtro, para um único comprimento de onda, apresenta uma FWHM <25 nm e um pico de transmitância >90%. A reconstrução dos espectros de reflectância originais foi verificada experimentalmente, a partir de um conjunto de 8 filtros óticos baseados em filmes finos, na mesma gama espectral, tendo sido possível distinguir entre diferentes parasitémias, até um limite de deteção de 12,5 parasitas/ $\mu\text{L}$  de glóbulos vermelhos. Os resultados obtidos exibem o potencial destes filtros óticos para integração no dispositivo ótico proposto, contribuindo para uma tecnologia disruptiva e inovadora de diagnóstico não invasivo de malária.

Palavras-chave: Filtros óticos, índice de refração, malária, reflectância, *TFCalc*.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease, highly prevalent in world regions with lacking healthcare conditions. Nowadays, malaria diagnostic is mainly based on microscopy and rapid diagnostic tests by immunochromatographic assays, being limited by the parasitaemia that they can detect and by the need for patients' blood samples. Thus, it is urgent to develop new accurate, user-independent, portable and low-cost diagnosis methods, without the need for blood samples.

This dissertation is part of a research project that aims to develop an innovative and non-invasive diagnostics method, based on optical reflectance spectrophotometry, for the quantification of malaria parasites, through the identification of hemozoin, without the need for blood samples. The device will comprise a set of optical filters, with high transmittance and low full width at half maximum (FWHM), for the complete reconstruction of the reflectance spectra, in order to distinguish between healthy and malaria-infected red blood cells. In this work, it is proposed the design, simulation and optimization of 16 narrowband and highly selective optical bandpass filters, based on multilayer  $\text{SiO}_2 / \text{TiO}_2$  thin films, for the spectral range between 400 nm and 800 nm. The optical properties of the thin films' materials, in particular the refractive indices, were the focus of this study, so three different refractive indices were considered. The results show that the simulated filters are highly sensitive to these properties. Each filter, for a single wavelength, shows a FWHM  $<25$  nm and a transmittance peak  $>90\%$ . The reconstruction of the original reflectance spectra was experimentally verified, using a set of 8 thin-film optical filters, in the same spectral range of the simulated ones, and it was possible to distinguish between different parasitaemia, up to a detection limit of 12.5 parasites/ $\mu\text{l}$  of red blood cells. The obtained results enhance the potential of these optical filters for integration in the proposed optical device, supporting this disruptive and innovative technology for non-invasive malaria diagnosis.

Keywords: Malaria, optical filters, reflectance, refractive index, TFCalc.

# ÍNDICE

1	Introdução.....	1
1.1	Enquadramento.....	2
1.2	Motivação.....	4
1.3	Objetivo.....	7
1.4	Estrutura da Dissertação.....	8
2	Estado de Arte.....	10
2.1	Métodos de diagnóstico de malária.....	11
2.1.1	Diagnóstico clínico.....	12
2.1.2	Microscopia.....	12
2.1.3	Testes de diagnóstico rápidos (TDR).....	14
2.1.4	Diagnóstico molecular.....	15
2.1.5	Outras abordagens inovadoras.....	17
2.2	Deteção de malária por espectroscopia ótica.....	18
2.2.1	Revisão de literatura de métodos de espectroscopia ótica para a deteção de hemozoína.....	18
2.2.2	Reflectância ótica na quantificação de hemozoína.....	20
2.3	Filtros óticos.....	23
2.3.1	Tipos de filtros óticos.....	23
2.3.1	Aplicações de filtros óticos.....	24
3	Teoria dos Filtros.....	27
3.1	Filtros óticos baseados em filmes finos.....	28
3.1.1	Conceitos básicos da propagação da luz num meio.....	30
3.1.2	Reflectância numa estrutura simples de um filme fino.....	34
3.1.3	Reflectância numa estrutura multicamada de filmes finos.....	37
3.2	Exemplo de filtros óticos com multicamadas de filmes finos dielétricos.....	39
3.2.1	Matriz característica para uma espessura ótica de um quarto ou metade do comprimento de onda.....	40
3.2.2	Desenho de um filtro ótico baseado em multicamada com espessura ótica de um quarto ou metade do comprimento de onda.....	41
3.2.3	Caraterísticas estruturais de um filtro ótico baseado em multicamada de filmes finos.....	42
4	Metodologia.....	47
4.1	Desenho dos filtros óticos baseados em filmes finos.....	48
4.1.1	Projeto dos filtros óticos.....	48
4.2	Simulação de filtros óticos de filmes finos.....	50

4.2.1	Software de simulação TFCalc 3.5.....	50
4.2.2	Índices de refração ideais.....	51
4.2.3	Aproximação dos índices de refração aos valores reais .....	53
4.2.4	Impacto das espessuras das camadas nos índices de refração dos materiais....	55
4.3	Ensaio experimentais para caracterização de filtros óticos .....	57
4.3.1	Seleção e preparação dos 8 filtros óticos.....	59
4.3.2	Montagem experimental .....	60
5	Resultados e Discussão .....	64
5.1	Simulações dos 16 filtros óticos baseados em filmes finos .....	65
5.1.1	Exemplos da influência dos filtros óticos simulados no espectro de reflectância de amostras com diferentes concentrações do parasita da malária .....	68
5.2	Caracterização experimental dos filtros óticos.....	71
5.2.1	Resultados experimentais utilizando fonte de luz branca .....	71
5.2.2	Resultados experimentais utilizando placa com LEDs .....	73
5.2.3	Exemplos da influência dos 8 filtros óticos caracterizados experimentalmente no espectro de reflectância de amostras com diferentes concentrações do parasita da malária.....	76
6	Conclusão e Trabalho Futuro .....	82
6.1	Conclusão .....	83
6.2	Trabalho futuro .....	85
	Referências.....	87
	<b>ANEXO 1</b> .....	95
	<b>ANEXO 2</b> .....	96
	<b>ANEXO 3</b> .....	103
	<b>ANEXO 4</b> .....	105
	<b>ANEXO 5</b> .....	106
	<b>ANEXO 6</b> .....	108

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do processo físico de reflexão da luz.....	20
Figura 2: Espectros de reflectância normalizada entre os 400 nm e os 800 nm, de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infectados in vitro com diferentes parasitémias (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos) de <i>P. falciparum</i> , nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença.....	21
Figura 3: Representação esquemática da interação da luz (refletida e transmitida) com um filme fino.....	28
Figura 4: Representação esquemática de estrutura multicamada de filmes finos.....	30
Figura 5: Representação esquemática da propagação da luz numa estrutura com um filme fino depositado num substrato.....	34
Figura 6: Representação esquemática da propagação da luz numa estrutura multicamada constituída por dois filmes finos depositados num substrato.....	37
Figura 7: Representação esquemática de uma estrutura de interferómetro Fabry-Perot.....	42
Figura 8: Representação esquemática de uma estrutura em multicamada de um filtro ótico..	43
Figura 9: Representação esquemática do comportamento da luz incidente ao atravessar o filtro ótico multicamada.....	44
Figura 10: Gráfico representativo da FWHM de um filtro ótico.....	45
Figura 11 - Representação esquemática da estrutura em multicamada de um filtro ótico, baseado no interferómetro de Fabry-Perot, constituído por 11 camadas alternadas de SiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> .....	49
Figura 12: Janela de definição de parâmetros iniciais, no TFCalc 3.5.....	51
Figura 13: Fotografias de alguns dos filtros óticos utilizados nos ensaios experimentais. (a) filtros óticos passa-banda, baseados em filmes finos, centrados nos comprimentos de onda de 419 nm, 585 nm e 603 nm; (b) filtros comerciais passa-alto de 370 nm, 550 nm e 600 nm e filtro comercial passa-baixo de 500 nm.....	58
Figura 14: Representação esquemática do setup experimental.....	61
Figura 15: Fotografia do setup experimental quando é utilizada a fonte de luz branca nas medições de transmitância.....	61
Figura 16: (a) Fotografia da placa PBC para a atuação dos 13 LEDs; (b) Representação esquemática do circuito impresso na placa PBC.....	62
Figura 17: Fotografia do setup experimental quando é utilizada como fonte de luz uma placa PCB com um conjunto de 13 LEDs.....	63
Figura 18: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para a matriz de 16 filtros óticos (representação estrutural na tabela 2), utilizando os índices de refração da base de dados Sopra S.A.....	65
Figura 19: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para a matriz de 16 filtros óticos (representação estrutural na tabela 4), utilizando os índices de refração da base de dados refractiveindex.info <sup>101</sup> .....	66

Figura 20: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda, para a matriz de 16 filtros óticos (representação estrutural na tabela 6), utilizando os índices de refração do grupo de investigação Pimenta et al <sup>82</sup> .....	67
Figura 21: FWHM (nm) dos 16 filtros óticos, para cada um dos conjuntos de índices de refração simulados. ....	68
Figura 22: Espectro representativo da multiplicação dos espectros de transmitância ótica dos 16 filtros óticos simulados pelos espectros de reflectância ótica normalizada de glóbulos vermelhos saudáveis (GV) e GV com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos) de <i>P. falciparum</i> , nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença. ....	69
Figura 23: Espectro do efeito cumulativo resultante da superposição dos espectros de transmitância de todos os filtros óticos simulados em cada comprimento de onda (obtidos pela área sob a curva de cada filtro), multiplicado pelo espectro de reflectância normalizada de GV saudáveis e de GV infetados com o parasita da malária com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos) de <i>P. falciparum</i> , nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença. ....	70
Figura 24: Espectro de luz branca, medido em corrente (A), correspondente à luz incidente nos filtros óticos, gerada pela fonte de luz de 200 W Quartz Tungsten Halogen (modelo 66881, Oriol Newport), e medida por um fotodiodo comercial. ....	72
Figura 25: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para os 8 filtros óticos existentes no laboratório do CMEMS, quando é utilizada uma fonte de luz branca comercial. 72	72
Figura 26: Espectro de luz incidente nos filtros óticos, medida pela contagem de fótons no espectrofotómetro AvaSpec-ULS2048XL EVO (Avantus), gerada por uma placa PBC constituída por 13 LEDs (2 emissores na zona dos 405 nm, 2 emissores na zona dos 800 nm e 9 emissores na zona do visível) e controlada por uma onda PWM com duty cycle a 50%. ....	74
Figura 27: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para os 7 filtros óticos existentes no laboratório do CMEMS, quando é utilizada uma placa PCB constituída por 13 LEDs (2 emissores na zona dos 405 nm, 2 emissores na zona dos 800 nm e 9 emissores na zona do visível) e controlada por uma onda PWM com duty cycle a 50%. ....	75
Figura 28: FWHM (nm) dos 8 filtros óticos medida no conjunto dos ensaios experimentais, quando é utilizada a fonte de luz branca e a placa de LEDs. ....	75
Figura 29: Espectro representativo da multiplicação dos espectros de transmitância ótica dos filtros óticos medidos experimentalmente pelos espectros de reflectância ótica de glóbulos vermelhos saudáveis (GV) e GV com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos) de <i>P. falciparum</i> , nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença: (a) com a fonte de luz branca; (b) com a placa PBC constituída por 13 LEDs. ....	77
Figura 30: Espectro do efeito cumulativo resultante da superposição dos espectros de transmitância de todos os filtros óticos caracterizados experimentalmente, em cada comprimento de onda (obtidos pela área sob a curva de cada filtro), multiplicado pelo espectro de reflectância de GV e de GV infetados com o parasita da malária com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos) de <i>P. falciparum</i> , nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença: (a) fonte de luz branca; (b) fonte de luz com LEDs. ....	78

Figura 31: Gráfico de barras representativo dos declives das retas entre intervalos de comprimentos de onda obtidos a partir da figura 29, quando é utilizada: (a) a fonte de luz branca; (b) a placa de LEDs. ....	80
Figura 32: Resposta espectral dos 16 filtros óticos simulados, utilizando os índices de refração de Sopra S.A.. Cada filtro é centrado: (a) 400 nm; (b) 435 nm; (c) 520 nm; (d) 590 nm; (e) 610 nm; (f) 620 nm; (g) 630 nm; (h) 640 nm; (i) 650 nm; (j) 660 nm; (k) 670 nm; (l) 680 nm; (m) 700 nm; (n) 720 nm; (o) 740 nm; (p) 800 nm.....	98
Figura 33: Resposta espectral dos 16 filtros óticos simulados, utilizando os índices de refração de refractiveindex.info <sup>101</sup> . Cada filtro é centrado: (a) 400 nm; (b) 435 nm; (c) 520 nm; (d) 590 nm; (e) 610 nm; (f) 620 nm; (g) 630 nm; (h) 640 nm; (i) 650 nm; (j) 660 nm; (k) 670 nm; (l) 680 nm; (m) 700 nm; (n) 720 nm; (o) 740 nm; (p) 800 nm.....	100
Figura 34: Resposta espectral dos 16 filtros óticos simulados, utilizando os índices de refração experimentais retirados de Pimenta et al. <sup>82</sup> . Cada filtro é centrado: (a) 400 nm; (b) 435 nm; (c) 520 nm; (d) 590 nm; (e) 610 nm; (f) 620 nm; (g) 630 nm; (h) 640 nm; (i) 650 nm; (j) 660 nm; (k) 670 nm; (l) 680 nm; (m) 700 nm; (n) 720 nm; (o) 740 nm; (p) 800 nm. ....	102
Figura 35: Resposta espectral da multiplicação dos espectros de transmitância dos 16 filtro óticos com os espectros de reflectância de GV: (a) saudáveis; (b) com 12 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$ de GV; (c) com 25 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$ de GV; (d) 50 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$ de GV; (e) 125 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$ de GV; (f) 250 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$ de GV; (g) 500 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$ de GV; (h) 12 parasitas (trofozoitos)/ $\mu\text{L}$ de GV; (i) 25 parasitas (trofozoitos)/ $\mu\text{L}$ de GV; (j) 50 parasitas (trofozoitos)/ $\mu\text{L}$ de GV; (k) 125 parasitas (trofozoitos)/ $\mu\text{L}$ de GV; (l) 250 parasitas (trofozoitos)/ $\mu\text{L}$ de GV; (m) 500 parasitas (trofozoitos)/ $\mu\text{L}$ de GV.....	104
Figura 36: Resposta espectral dos filtros óticos, utilizando a fonte de luz branca. Cada filtro é centrado em: (a) 397 nm; (b) 419 nm; (c) 516 nm; (d) 585 nm; (e) 603 nm; (f) 649 nm; (g) 701 nm; (h) 746 nm.....	105
Figura 37: Resposta espectral dos filtros óticos comerciais utilizados: (a) passa-alto centrado em 370 nm; (b) passa-alto centrado em 480 nm; (c) passa-alto centrado em 500 nm; (d) passa-alto centrado em 550 nm; (e) passa-alto centrado em 600 nm; (f) passa-baixo centrado em 450 nm; (g) passa-baixo centrado em 500 nm; (h) passa-baixo centrado em 600 nm; (i) passa-baixo centrado em 650 nm; (j) passa-baixo centrado em 700 nm; (k) passa-baixo centrado em 800 nm. ....	107

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Índices de refração dos materiais retirados da base de dados de Sopra S.A. ....	52
Tabela 2: Filtros óticos nas regiões UV/VIS, VIS, VIS/IR e respetiva espessura das camadas, constituídas por SiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> com índices de refração ideais (Sopra S.A.). ....	53
Tabela 3: Índices de refração dos materiais retirados da base de dados refractiveindex.info <sup>101</sup> . ....	54
Tabela 4: Filtros óticos nas regiões UV/VIS, VIS, VIS/IR e respetiva espessura das camadas, constituídas por SiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> com índices de refração próximos dos reais (refractiveindex.info <sup>101</sup> ). ....	54
Tabela 5: Índices de refração dos materiais, calculados por interpolação dos dados de Pimenta et al. (2016) <sup>82</sup> , para cada espessura das camadas que constituem os filtros óticos e cada comprimento de onda específico. ....	56
Tabela 6: Filtros óticos nas regiões UV/VIS, VIS, VIS/IR e respetiva espessura das camadas, constituídas por SiO <sub>2</sub> e TiO <sub>2</sub> com índices de refração experimentais retirados de Pimenta et al. (2016) <sup>82</sup> . ....	57
Tabela 7: Correspondência entre os comprimentos de onda seleccionados, onde ocorrem os picos de transmitância no espectro ótico, para os filtros óticos experimentais e os filtros óticos simulados. ....	59
Tabela 8: Comprimentos de onda limitantes de cada filtro passa-alto e passa-baixo, utilizados para filtrar o espectro ótico de transmitância cada filtro ótico experimental considerado...	60
Tabela 9: Cálculo da FWHM dos espectros de máxima transmitância para cada um dos 16 filtros óticos simulados (representação estrutural na tabela 4), utilizando os índices de refração de Sopra S.A., de refractiveindex.info e do trabalho desenvolvido por Pimenta et al. <sup>82</sup> . ....	95
Tabela 10: Cálculo da FWHM do espectro de máxima transmitância para cada um dos 8 filtros óticos experimentais, quando utilizada a fonte de luz branca. ....	108
Tabela 11: Cálculo da FWHM do espectro de máxima transmitância para cada um dos 8 filtros óticos experimentais, quando utilizada a placa de 13 LEDs como fonte de luz. ....	108

## LISTA DE ACRÓNIMOS

<b>Acrónimo</b>	<b>Significado</b>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CMEMS	Unidade de investigação em microsistemas eletromecânicos
CMOS	Metal-óxido-semicondutor complementar (do inglês <i>complementary metal-oxide-semiconductor</i> )
DIP	Pacote duplo em linha (do inglês <i>dual in line package</i> )
FWHM	Largura a meia altura (do inglês <i>full width at half maximum</i> )
GV	Glóbulos vermelhos
Hb	Hemoglobina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hz	Hemozoína
IBD	Deposição de feixe de iões (do inglês <i>ion beam deposition</i> )
ICVS	Instituto de investigação em ciências da vida e saúde
IDE	Ambiente de desenvolvimento integrado (do inglês <i>Integrated Development Environment</i> )
IR	Infravermelho
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i>
LEDs	Díodos emissores de luz (do inglês <i>Light Emitting Diodes</i> )
LOD	Limite de deteção
MOEMS	Sistema micro-opto-electro-mecânico
MSM	Metal-Semicondutor-Metal
NAAT	Testes de amplificação do ácido nucleico (do inglês <i>nucleic acid amplification test</i> )
NASBA	Amplificação baseada nas sequências de ácidos nucleicos
NDIR	Espectrómetro infravermelho não dispersivo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCB	Circuito Impresso (do inglês <i>printed circuit board</i> )
PVD	Deposição física de vapor (do inglês <i>Physical Vapor Deposition</i> )
PWM	Modulação por largura de pulso (do inglês <i>pulse width modulation</i> )

QT-NASBA	Sequências de ácidos nucleicos quantitativos
RCP	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SEM	Microscópio eletrônico de varrimento (do inglês <i>Scanning Electron Microscope</i> )
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SiO <sub>2</sub>	Dióxido de silício
SMD	Dispositivo de tecnologia de montagem superficial (do inglês <i>surface-mount device</i> )
TDR	Testes de diagnóstico rápidos
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade
A	Absorvência ótica	-
$\vec{B}$	Vetor de indução magnética	T
B	Campo elétrico normalizado	V.m <sup>-1</sup>
C	Campo magnético normalizado	A.m <sup>-1</sup>
c	Velocidade da luz no vácuo	m.s <sup>-1</sup>
$\vec{D}$	Vetor de deslocamento elétrico	C.m <sup>-2</sup>
d	Espessura do filme	m
dr	Espessura da cavidade de ressonância	m
ds	Espessura da camada	m
$\vec{E}$	Vetor do campo elétrico	V.m <sup>-1</sup>
f	Frequência da onda eletromagnética	Hz
H	Elevado índice de refração	-
$\vec{H}$	Vetor do campo magnético	A.m <sup>-1</sup>
$\vec{J}$	Vetor de densidade de corrente elétrica	A.m <sup>-2</sup>
$\vec{k}$	Vetor de onda	rad m <sup>-1</sup>
L	Baixo índice de refração	-
n/ n <sub>s</sub> / n <sub>m</sub> / n <sub>r</sub> / n <sub>0</sub> / n <sub>1</sub> / n <sub>2</sub>	Índice de refração	-
OPL	Comprimento do caminho ótico	m
Q	Qualquer número inteiro de camadas	-
q	Ordem de interferência do filtro ótico	-
R	Reflectância ótica	-
Re	Componente real	-
R1/ R2/ R3/ R4	Feixe de luz refletido	-
r	Número da fronteira	-
$\vec{r}$	vetor de posição	m
T	Transmitância ótica	-
T1/ T2/ T3/ T4	Feixe de luz transmitido	-
u	Densidade de energia eletromagnética	W.m <sup>-2</sup>

$v$	Velocidade de propagação da luz num meio	$m.s^{-1}$
$Y$	Admitância ótica	S
$\delta$	Desvio de fase do filme fino	rad
$\epsilon$	Permissividade elétrica do meio	$F.m^{-1}$
$\epsilon_0$	Permissividade elétrica	$F.m^{-1}$
$\theta/\theta_0$	Ângulo de incidência	graus
$\theta_r$	Ângulo reflexão	graus
$\lambda$	Comprimento de onda	m
$\mu$	Permeabilidade magnética do meio	$H.m^{-1}$
$\mu_0$	Permeabilidade magnética	$H.m^{-1}$
$\rho_r$	Amplitude do coeficiente de reflexão	-
$\rho$	Densidade de carga elétrica	$C.m^{-3}$
$\sigma$	Condutividade elétrica	$S.m^{-3}$
$\phi$	Fase de onda	rad
$\omega$	Frequência angular	rad

# **1 INTRODUÇÃO**

A introdução contém o enquadramento, a motivação, os objetivos desta dissertação e um resumo da sua organização estrutural. No enquadramento, será abordado o tema geral desta investigação, na motivação justifica-se a sua relevância e originalidade e, na secção de objetivos, serão detalhadas as metas esperadas com a realização do presente trabalho.

## 1.1 ENQUADRAMENTO

A malária é uma doença infecciosa com um impacto mundial severo<sup>1</sup>. Atualmente, a doença da malária é um grave problema de saúde pública em cerca de 91 países<sup>2</sup>, sendo que constitui a principal causa de morte nas regiões endémicas da África Subsaariana, do Pacífico Ocidental, da América do Sul e Central, do Sudeste Asiático e do Mediterrâneo Oriental<sup>3</sup>. Além disso, as infeções da malária nas áreas não endémicas, importadas por viajantes oriundos das regiões endémicas, têm aumentado significativamente<sup>1,4</sup>. Segundo o último relatório emitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2020, aproximadamente 229 milhões de pessoas ficaram infetadas com malária e, desta doença, resultaram 409 mil mortes<sup>5</sup>. As regiões endémicas constituem um desafio no combate à doença, uma vez que carecem de infraestruturas, atendimento médico apropriado e de condições de vida condignas, o que agrava a probabilidade de infeção por malária junto da população<sup>6</sup>.

Aproximadamente metade da população mundial corre o risco de ficar infetada com a doença da malária<sup>4</sup>. No entanto, existem grupos populacionais mais vulneráveis, isto é, que apresentam maior risco de contrair a doença: bebés, crianças até aos 5 anos, mulheres grávidas, pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou com o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), viajantes não imunes, populações nómadas e migrantes<sup>5,7</sup>. De acordo com a OMS, os sintomas de malária, normalmente, têm início entre 7 e 15 dias após a contaminação infecciosa, em casos em que nenhum medicamento preventivo da malária tenha sido previamente ministrado. O sintoma mais característico da doença da malária é a febre cíclica<sup>8</sup>, que se deve ao conjunto de estadios sincronizados que o parasita apresenta, e que serão descritos adiante. Particularmente, quando ocorre a rutura dos esquizontes nos glóbulos vermelhos (GV), libertando os merozoítos na corrente sanguínea, o sistema imunitário é ativado

desencadeando a febre. Por outro lado, quando estes invadem os novos GV, ocorre redução da febre<sup>8</sup>. No geral, os primeiros sintomas a surgir são semelhantes aos de uma gripe comum, sendo aconselhado, sempre que possível, que o diagnóstico clínico seja acompanhado de um diagnóstico laboratorial<sup>9</sup>. Um tratamento inadequado com terapias antimaláricas em pacientes sem um diagnóstico confirmado para a doença, pode desencadear o aumento da resistência do parasita aos medicamentos, tornando-os cada vez menos eficazes<sup>10</sup>, uma problemática bem assente atualmente.

A malária é uma doença transmitida por mosquitos, apresentando como agentes causadores os parasitas protozoários do género *Plasmodium*<sup>7</sup>. Este parasita contém mais de 200 espécies diferentes, tendo vários hospedeiros como os répteis, pássaros, anfíbios e mamíferos<sup>11</sup>. Nos seres humanos, o *Plasmodium* é transmitido através da picada do mosquito fêmea *Anopheles*<sup>7</sup>. Até ao momento, existem 6 espécies deste parasita que infetam os humanos, nomeadamente: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi*<sup>12</sup>. No entanto, a possibilidade de infeção, desta última espécie, nos seres humanos ainda se encontra pouco documentada. A espécie mais virulenta e fatal é a *P. falciparum*, especialmente em crianças pequenas, com imunidade protetora insuficiente, ou em mulheres grávidas. Embora as restantes espécies também possam causar problemas graves na saúde humana, a sua taxa de mortalidade é significativamente menor<sup>13</sup>.

Nos seres humanos, o ciclo de vida bastante complexo do *Plasmodium* inicia-se com a picada do mosquito *Anopheles* infetado, em que os parasitas na forma de esporozoítos, presentes nas glândulas salivares do mosquito, são inoculados na corrente sanguínea do hospedeiro<sup>12</sup>. Os esporozoítos migram até ao fígado, onde ocorre a fase do ciclo exoeritrocítico. As células do fígado são infetadas, ocorrendo maturação dos esporozoítos para a forma de esquizontes e o rompimento dos esquizontes, libertando milhares de parasitas na forma de merozoítos na corrente sanguínea. De seguida, inicia-se o ciclo eritrocítico, fase sintomática da doença, em que merozoítos infetam os GV desencadeando a multiplicação assexuada do parasita<sup>13</sup>. Dentro dos GV, os merozoítos desenvolvem-se em trofozoítos e estes amadurecem para esquizontes, que irão romper e libertar mais merozoítos para infetar mais GV. Dependendo da espécie, este ciclo pode

demorar entre 48 e 72 horas. Alguns merozoítos, nesta fase, diferenciam-se em gametócitos, parte fundamental para completar o ciclo do parasita, uma vez que serão ingeridos pelo mosquito *Anopheles*, aquando da sua alimentação. Desta forma, é iniciado o ciclo esporogónico, em que o mosquito, ao ingerir os gametócitos masculinos e feminino, permite que ocorra a formação de zigotos no seu estômago, que se desenvolvem em oocinetes, tornando-se longos e móveis. Por sua vez, os oocinetes invadem a parede intestinal do mosquito e evoluem para oocistos, que rompem e libertam esporozoítos, que se deslocam para as glândulas salivares do mosquito. Assim, o ciclo de vida da malária é perpetuado com a nova inoculação dos esporozoítos no novo hospedeiro<sup>4,6,12,14</sup>.

A infeção dos glóbulos vermelhos pelos parasitas, que desencadeia o desenvolvimento intracelular supramencionado, origina a degradação da hemoglobina (Hb)<sup>15</sup>, fonte de nutrientes para o parasita, mas leva à libertação do grupo *heme*, tóxico, tanto para o hospedeiro humano como para o parasita, e impossível de digerir por este. De forma a remover o *heme* livre, o parasita promove a formação de um cristal anisotrópico, a hemozoína (Hz), também conhecida como o pigmento da malária<sup>16</sup>. Com a progressão da doença, desencadeia-se o aumento da concentração de Hz e a diminuição de Hb nos GV. A formação de Hz é um produto intrínseco ao parasita, pelo que o sangue humano não infetado não apresenta Hz, apresentando, assim, um potencial para ser utilizada como um biomarcador para a deteção de malária<sup>14</sup>. Desta forma, alcançar um método de diagnóstico baseado na deteção e quantificação de Hz, capaz de ultrapassar as limitações dos atuais métodos de diagnóstico, descritas no capítulo 2, será uma mais valia<sup>6,14</sup>.

## 1.2 MOTIVAÇÃO

Atualmente, existem diversos métodos disponíveis para o diagnóstico de malária, que se baseiam na deteção dos parasitas no sangue. Os métodos mais usados são baseados na microscopia ótica de lâminas de esfregaço de sangue corado com Giemsa<sup>17</sup>, no diagnóstico molecular por reação em cadeia da polimerase (RCP)<sup>18</sup> e em vários testes de diagnóstico rápidos (TDR), com base na imunocromatografia<sup>19</sup>.

A microscopia ótica permite a quantificação e distinção de espécies, contudo requer equipamentos laboratoriais e técnicos qualificados para a utilização dos materiais, o que pode levar a uma interpretação subjetiva dos resultados<sup>20</sup>. Por outro lado, os TDR têm uma sensibilidade comparável com a microscopia e podem ser utilizados na maioria dos locais remotos. Porém, os TDR são caros e não permitem a quantificação de parasitas, apenas a deteção da presença dos mesmos<sup>21</sup>. No geral, em termos de sensibilidade, o melhor método é o RCP<sup>22</sup>, no entanto este método implica laboratórios equipados, pelo que não pode ser utilizado como diagnóstico de rotina. Além disso, todos estes métodos são invasivos, uma vez que requerem a colheita de amostras de sangue (ainda que em pequenas quantidades) e reagentes descartáveis e/ou consumíveis. É importante realçar que os casos diagnosticados com a doença de malária têm diminuído ao longo dos anos. No entanto, desde 2016, esta redução tem vindo a desacelerar, mantendo-se constante o número de casos registados. Esta estagnação pode relacionar-se com a impossibilidade dos métodos de diagnóstico atuais de detetarem baixas parasitémias, que circulam na população assintomática e são suficientes para serem transmitidas pela picada do mosquito.

Assim, torna-se claro que o diagnóstico de malária necessita urgentemente de ser melhorado, devido ao défice de dispositivos capazes de auxiliar na fase de eliminação de malária. Os avanços tecnológicos emergentes, nomeadamente as microtecnologias e a microeletrónica, em conjunto com o conhecimento detalhado do ciclo de vida do parasita, podem desencadear o desenvolvimento de novos dispositivos de diagnóstico com resultados precisos e independentes do utilizador, portáteis e de baixo custo, visando soluções inovadoras, sem necessitarem de reagentes ou amostras de sangue e, portanto, não invasivos.

A presente dissertação integra o projeto de investigação financiado (MalariaChip, referência NORTE-01-0145-FEDER-028178) cujo principal objetivo consiste no desenvolvimento de um dispositivo de diagnóstico inovador e não invasivo, baseado em espectrofotometria de reflectância ótica para deteção e quantificação de parasitas da malária, através da identificação de Hz, sem ser necessária a recolha de amostras de sangue do paciente infetado. Esta última característica constitui uma enorme vantagem, uma vez que permitirá detetar os parasitas em qualquer estadio da doença e com uma

sensibilidade alcançável elevada. Isto é, os métodos convencionais, ao recorrerem a amostras sanguíneas, detetam apenas os parasitas no estadio de anel, que são os únicos que circulam na corrente sanguínea. À medida que o ciclo do parasita avança e os parasitas, com mais quantidade de Hz, aderem às células endoteliais, deixam de ser detetados pelos métodos convencionais, podendo ser na mesma detetados pelo método proposto nesta dissertação. Adicionalmente, o dispositivo, ao ser não invasivo e automático, permite levar os testes de diagnóstico a zonas remotas onde, normalmente por falta de condições, é impossível chegarem, diminuindo os tratamentos sem diagnóstico confirmado.

Desta forma, para implementar o dispositivo de reflectância ótica, com um limite de deteção até 12,5 parasitas/ $\mu$ l de glóbulos vermelhos, o valor esperado a ser alcançado para se tornar comparável com os melhores métodos de diagnóstico no mercado, é necessário que este dispositivo contenha filtros óticos passa-banda. Estes filtros deverão ser específicos para comprimentos de onda seleccionados (descritos na secção 2.2.2), com alta transmitância ótica e baixa largura a meia altura (FWHM, do inglês *full width at half maximum*), com a finalidade de reconstruir, quando depositados sobre uma matriz de fotodíodos, os espectros de reflectância ótica das amostras dos pacientes, de modo a permitir a sua distinção entre GV saudáveis e infetados com malária. O dispositivo ótico previsto no projeto incluirá uma fonte de luz branca, que emite e direciona a luz para a amostra. Além da fonte de luz, o dispositivo incluirá uma matriz de fotodíodos capaz de receber e converter a luz refletida pela amostra em corrente elétrica, e um conjunto de filtros óticos (16, como será posteriormente detalhado), projetados para seleccionar e filtrar a luz em diferentes comprimentos de onda, ajudando a reconstruir, a partir de 16 pontos discretos, o espectro original de cada amostra. O espectro originado pela reflexão da luz na amostra será específico para a sua composição química e molecular.

Os filtros óticos a incluir no dispositivo devem ser constituídos por filmes finos distribuídos em multicamada, capazes de serem depositados, durante a fase de fabrico, no topo de uma matriz de 16 fotodíodos de silício (4x4), fabricados em tecnologia CMOS (do inglês *complementary metal-oxide-semiconductor*) e incluídos no dispositivo ótico. Os filtros óticos de filmes finos são altamente sensíveis às propriedades e espessura dos

materiais que os constituem, pelo que a principal motivação deste trabalho será estudar a resposta espectral de diferentes materiais dielétricos, com diferentes propriedades óticas, visando a sua caracterização completa antes do fabrico.

Acredita-se que a tecnologia apresentada para o dispositivo não invasivo para diagnóstico de malária, através de reflectância ótica, medida diretamente na pele do paciente, é totalmente inovadora, não havendo trabalhos na literatura que se baseiem em tal abordagem. Assim, este trabalho de dissertação, ao realizar a simulação e desenho dos filtros óticos para implementação no dispositivo referido, compreende um passo essencial para a concretização do objetivo primordial do projeto, realçando a sua novidade e originalidade.

### 1.3 OBJETIVO

Com base na secção anterior, onde é apresentada a motivação do problema, o principal objetivo da dissertação é o desenho, simulação e otimização de 16 filtros óticos passa-banda, baseados em estrutura multicamada de filmes finos, para utilização na gama espectral entre 400 nm e 800 nm (radiação visível e próxima do infravermelho). Os filtros deverão possibilitar a reconstrução dos espectros de reflectância de diferentes amostras (saudáveis e com diferentes parasitémias), de modo a permitir o diagnóstico de malária num dispositivo portátil, automático e miniaturizado. No sentido de concretizar o objetivo principal, o presente trabalho contém os seguintes objetivos intermédios:

- Estudar as diferentes configurações, presentes na literatura, de filtros óticos passa-banda baseados em filmes finos multicamada;
- Simular os filtros óticos utilizando como ferramenta o *software TFCalc*;
- Estudar o dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) e o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) como materiais para integrar em filtros óticos passa-banda altamente seletivos;
- Otimizar, no *software TFCalc*, a transmitância e FWHM dos filtros óticos desenhados;
- Estudar o efeito da espessura dos materiais selecionados para os filmes finos nos 16 espectros de transmitância obtidos;

- Estudar o efeito das propriedades óticas dos materiais dos filmes finos, nomeadamente o seu índice de refração, nos espectros de transmitância obtidos. Desta forma, diferentes índices de refração (de diferentes bases de dados) serão considerados;
- Analisar e discutir a resposta espectral dos filtros simulados e o seu desempenho;
- Analisar os espectros de reflectância de diversas amostras (saudáveis e com diferentes parasitémias), reconstruídos a partir de 16 pontos, usando os 16 filtros óticos simulados, e avaliar o seu potencial para distinguir amostras saudáveis e não saudáveis;
- Verificar experimentalmente, a partir de um conjunto de filtros óticos baseados em filmes finos (já disponíveis no laboratório CMEMS, Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho), a capacidade de reconstrução de espectros de reflectância de amostras com diferentes parasitémias (com um mínimo de 8 comprimentos de onda);
- Discutir o potencial dos filtros desenhados e simulados para integração num dispositivo inovador, portátil e miniaturizado para diagnóstico não invasivo de malária por reflectância ótica.

## 1.4 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se dividida em seis capítulos.

No primeiro capítulo, é abordada, de uma forma geral, a doença da malária, assim como as suas características, o seu impacto mundial e o modo como ocorre o crescimento e desenvolvimento do seu parasita. Além disso, a motivação que desencadeou o presente trabalho de investigação, assim como os seus objetivos, são também apresentados.

No capítulo dois é descrito o estado de arte, onde são abordados os diferentes métodos de diagnóstico de malária existentes, comercialmente e/ou sob investigação; é apresentada uma introdução sobre a espectroscopia de reflectância ótica, enquadrando a sua utilização para a deteção de H<sub>2</sub>; assim como é efetuada uma breve revisão dos diferentes filtros óticos que podem integrar um dispositivo como o pretendido.

No terceiro capítulo é realizada uma contextualização dos fundamentos teóricos relativos ao comportamento dos filtros óticos passa-banda, baseados em estruturas de multicamadas de filmes finos.

No capítulo quatro é detalhada a metodologia que sustenta o trabalho desenvolvido, sendo abordados os requisitos necessários para a construção dos filtros óticos e apresentadas as técnicas de desenho e simulação computacional destes. Além disso, explicam-se ainda as metodologias e os protocolos utilizados nos ensaios experimentais preliminares.

No capítulo cinco são expostos e discutidos os resultados obtidos nas simulações dos filtros óticos, assim como os resultados das experiências laboratoriais efetuadas. Apresentam-se ainda resultados da análise combinada dos espectros de transmitância ótica dos filtros e da reflectância ótica de amostras com diferentes parasitémias.

Finalmente, no último capítulo são apresentadas as principais conclusões e análise dos resultados obtidos, na realização da dissertação, no contexto do projeto de investigação que integra, e expostas as perspectivas de trabalho futuro.

## **2 ESTADO DE ARTE**

O capítulo do estado de arte começa por apresentar uma contextualização dos principais métodos de diagnóstico de malária existentes comercialmente e/ou sob investigação. Além disso, apresenta uma introdução à espectroscopia ótica, em particular à reflectância ótica, assim como uma revisão da literatura destes métodos aplicados à deteção de Hz. Por fim, o capítulo expõe uma breve revisão dos principais sistemas de filtros óticos que podem integrar o dispositivo pretendido para diagnóstico de malária, conforme o objetivo deste trabalho de investigação.

## 2.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

Atualmente, existe uma multiplicidade de técnicas de diagnóstico de malária, desde métodos que requerem técnicos especializados e instalações laboratoriais altamente equipadas e de elevado custo, até métodos capazes de detetar a presença de malária fora do laboratório, de forma simples e automática, nomeadamente através de dispositivos portáteis *point-of-care*<sup>23</sup>. A deteção do parasita da malária, *Plasmodium*, é um desafio, uma vez que este se replica rapidamente nos glóbulos vermelhos humanos, e a densidade de parasitas no paciente (parasitémia) pode variar bastante entre pacientes e entre tempos de recolha de amostras<sup>24</sup>, desde menos de um até dezenas de milhares de parasitas por microlitro de sangue<sup>25</sup>. Esta variação resulta de padrões de idade, reflete a exposição ao longo da vida e a imunidade a nível populacional, adquirida naturalmente<sup>26</sup>. Além disso, esta variação também está relacionada com o momento de recolha de amostras, uma vez que o desenvolvimento sincronizado do ciclo intraeritrocitário do parasita, no hospedeiro, desencadeia uma maior parasitémia, aquando da rutura dos esquizontes. Uma ferramenta de diagnóstico adequada deverá ser capaz de fornecer um resultado rápido e preciso, numa fase inicial, para permitir o tratamento do paciente atempado e mais adequado<sup>7</sup>.

Nesta secção serão apresentadas as abordagens mais comumente utilizadas, atualmente, para diagnóstico de malária, como: diagnóstico clínico<sup>27</sup>; microscopia ótica<sup>20</sup>; testes de diagnóstico rápidos (TDR)<sup>21</sup>; diagnóstico molecular através da reação em cadeia da polimerase (RCP)<sup>28</sup>, da amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) e da amplificação baseada nas sequências de ácidos nucleicos (NASBA), entre outros métodos.

### 2.1.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

A avaliação clínica é o método mais tradicional, simples e comum de diagnóstico de malária<sup>6</sup>. Este método consiste na análise, realizada por um especialista, dos sintomas dos pacientes, apresentando, como consequência, riscos associados à subjetividade da avaliação médica<sup>29</sup>. Numa perspectiva clínica, apesar de a febre cíclica<sup>8</sup> ser um sintoma característico de malária, nem sempre é evidenciado pelo paciente e, no geral, os sintomas acabam por se manifestar similares aos de uma gripe e de diversas doenças tropicais, o que pode levar a diagnósticos e tratamentos inapropriados. Desta forma, o diagnóstico clínico, não acompanhado de um diagnóstico laboratorial, é apenas utilizado quando não há disponibilidade de instalações laboratoriais adequadas<sup>30</sup>. Na maioria das regiões endêmicas, os sistemas de saúde são débeis e frágeis, as instalações e materiais laboratoriais básicos são muito limitados e os profissionais de saúde capazes e treinados são escassos, pelo que este diagnóstico torna-se, na maioria dos casos, o único método disponível<sup>31</sup>. Isto leva a que muitos casos suspeitos sejam tratados com medicação antimalárica, aumentando a resistência do parasita aos medicamentos<sup>5</sup>. Cerca de 24% de todas as crianças em África tomam medicamentos antimaláricos sem diagnóstico confirmado<sup>9</sup>. Devido às limitações do diagnóstico meramente clínico, no caso de suspeita clínica da doença, os pacientes devem ser preferencialmente testados através de análise por microscopia ou TRD, métodos que serão descritos nas subseções seguintes<sup>7</sup>.

### 2.1.2 MICROSCOPIA

A microscopia, que consiste na visualização de distensões sanguíneas (extensão de uma fina camada de sangue sobre uma lâmina de microscopia) e identificação do parasita *Plasmodium* no sangue dos pacientes infetados, constitui o método de diagnóstico de malária mais utilizado em todo o mundo<sup>32</sup>.

Em 1904, Gustav Giemsa introduziu e desenvolveu uma solução corante de azul de metileno e eosina para a identificação de glóbulos vermelhos infetados em esfregaços<sup>6</sup>. A utilização de lâminas com o corante de Giemsa tem sido uma ferramenta amplamente usada para a observação de amostras de sangue periférico ao microscópio, quer por gota espessa quer com esfregaços finos<sup>33</sup>. Para a visualização de gotas espessas, é

realizada a recolha de sangue capilar (uma gota) do dedo do paciente, com auxílio de uma lanceta, e colocada numa lâmina de vidro. Desta forma, sucede-se a fixação de diversas camadas celulares em que, ao adicionar o corante de Giemsa, ocorre a rutura dos glóbulos vermelhos, permitindo apenas a visualização dos leucócitos, plaquetas e parasitas<sup>34</sup>. No caso do esfregaço de sangue, a amostra do paciente é espalhada numa grande área na lâmina de vidro, permitindo a fixação de uma só camada celular. Neste caso, a amostra é fixada com metanol e, depois de seca, é adicionada a solução de Giemsa<sup>35</sup>. De uma forma geral, a gota espessa, por conter várias camadas celulares, quando visualizada no microscópio, permite detetar com mais sensibilidade a presença de parasitas *Plasmodium* e determinar a parasitémia. Por outro lado, os esfregaços, uma vez que apresentam uma única camada de células onde os GV permanecem intactos, são utilizados para identificar as espécies de *Plasmodium* responsáveis pela infeção e o seu estadio de desenvolvimento<sup>7</sup>. Assim, a microscopia continua a ser amplamente utilizada, uma vez que é um método barato e permite a diferenciação entre espécies de malária e a quantificação dos parasitas<sup>36</sup>.

A sensibilidade e a especificidade da microscopia dependem essencialmente da experiência do técnico de microscopia, da qualidade do esfregaço (preparação das lâminas com amostra e soluções), da qualidade e manutenção dos equipamentos, do nível de parasitémia periférica e da espécie de *Plasmodium* causadora da infeção<sup>37</sup>. Na microscopia considera-se um limite de deteção de 4 a 20 parasitas/ $\mu$ L de sangue, em laboratórios altamente especializados, no entanto a microscopia laboratorial, nas regiões com menores recursos e laboratórios mais débeis, apenas consegue atingir limites de deteção entre 50 e 100 parasitas/ $\mu$ L de sangue<sup>13</sup>. Além disso, o método é moroso e exige muito trabalho por parte dos técnicos. Estas restrições debilitam o diagnóstico microscópico no contexto da redução da prevalência da malária e têm conduzido a que, cada vez mais, novos métodos de diagnóstico sejam explorados, de modo a ultrapassar as limitações da microscopia<sup>31</sup>.

Apesar da existência de algumas restrições, na globalidade, a microscopia é ainda considerada um método economicamente barato com uma eficiência razoável, que exige reduzidos volumes de amostras de sangue e infraestruturas laboratoriais sem

elevada complexidade, e que permite o acompanhamento dos pacientes após o tratamento<sup>31</sup>.

### 2.1.3 TESTES DE DIAGNÓSTICO RÁPIDOS (TDR)

Os TDR têm vindo a ser cada vez mais utilizados no diagnóstico de malária, devido à sua simplicidade de utilização e rapidez de deteção<sup>4</sup>. Estes são dispositivos *point-of-care* capazes de detetar a doença da malária em pequenas amostras de sangue através de ensaios imunocromatográficos, detetando imunologicamente os diferentes antigénios da malária<sup>38</sup>. Este método utiliza anticorpos monoclonais marcados com corante para se ligarem aos antigénios do parasita da malária, presentes numa tira com a amostra<sup>13</sup>. A interação do complexo antigénio-anticorpo resulta numa reação colorimétrica que produz uma linha colorida visível<sup>13,31</sup>.

Os TRD podem demorar entre 5 e 20 minutos, dependendo das suas características. Além disso, estes testes não requerem energia elétrica, são portáteis, simples de realizar e não necessitam de nenhum conhecimento específico para interpretação dos resultados<sup>6</sup>. Atualmente, existem cerca de duzentos TRD disponíveis para diagnóstico em campo.

Em relação à sua utilidade, alguns TRD apenas detetam uma espécie de *Plasmodium* (*P. falciparum* ou *P. vivax*), enquanto que outros são capazes de detetar várias espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*). Alguns dos testes permitem ainda diferenciar entre infeções *P. falciparum* e não *P. falciparum*, ou entre espécies específicas, o que poderá ser relevante no tratamento a administrar ao paciente<sup>39</sup>.

No entanto, os TRD, apesar de acessíveis e fáceis de utilizar, são relativamente caros e sujeitos a resultados falsos positivos, uma vez que o antigénio da malária mantém-se no sangue até duas semanas após a eliminação<sup>13</sup> do parasita. Além disso, o limite de deteção (LOD) para um TDR convencional é de cerca de 100 parasitas/ $\mu$ L de sangue<sup>31</sup> e não fornecem valores de parasitémia. Relativamente à sensibilidade e especificidade, os TDR apresentam valores similares aos da microscopia<sup>38</sup>.

Finalmente, os benefícios destes testes em comparação com outros métodos incluem a utilização simples e a interpretação de resultados independente do utilizador, não sendo

necessário investigadores nem técnicos altamente treinados, nem laboratórios especializados para os realizar<sup>39</sup>.

#### 2.1.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As técnicas de diagnóstico molecular são consideradas as mais sensíveis e específicas para o diagnóstico de malária. No entanto, requerem infraestruturas adequadas, técnicos e equipamentos altamente especializados e de elevado custo, o que limita a sua utilização nas regiões economicamente debilitadas. Por este motivo, as técnicas de diagnóstico molecular são utilizadas apenas em investigação e desenvolvimento, não sendo utilizadas em diagnóstico de campo<sup>4</sup>.

Nesta secção são abordadas três técnicas diferentes de diagnóstico molecular, baseadas na amplificação do ácido nucleico (NAAT, do inglês *nucleic acid amplification test*): RCP<sup>22</sup>, LAMP<sup>40</sup> e NASBA<sup>31</sup>.

##### 2.1.4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RCP)

Em 1983, foi desenvolvido o método RCP, que se baseia nas propriedades termoestáveis de polimerases do ácido desoxirribonucleico (ADN) para a amplificação de pequenos fragmentos de ADN<sup>7</sup>. A técnica é considerada das mais eficientes para o diagnóstico de malária, atingindo elevada precisão, especificidade e sensibilidade. Para detetar diferentes espécies de *Plasmodium* existem várias abordagens de RCP: *nested* RCP; *semi-nested* RCP; *single step multiplex* RCP; ensaios em tempo real ou quantitativos de RCP e RCP direta<sup>13</sup>. Todos estes métodos baseiam-se na identificação de sequências de nucleótidos específicas do genoma do parasita, na sua amplificação e na repetição de ciclos de amplificação para gerar várias cópias de fragmentos específicos de material genético, juntamente com uma posterior deteção e análise dos produtos resultantes do processo de amplificação<sup>41</sup>. A RCP é capaz de detetar parasitas com um limite de deteção entre 1 e 5 parasitas/ $\mu$ L de sangue, para as seis espécies de parasitas infecciosos<sup>31</sup>.

Embora este método apresente claras vantagens, baseia-se em sequências de nucleótidos complementares entre o *primer* (sequência conhecida) e o ADN alvo homólogo (sequência desconhecida), pelo que os parasitas com várias sequências

genéticas na região alvo do iniciador são propensos a falhas de detecção ou a uma diminuição na eficácia de amplificação, o que reduzirá a sensibilidade do teste de RCP<sup>42</sup>. Além disso, esta técnica tem um elevado custo devido ao material e equipamento necessário, assim como à exigência de técnicos especializados e ao elevado tempo necessário para a análise<sup>7</sup>.

#### 2.1.4.2 AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)

Os ensaios LAMP amplificam material genético a uma única temperatura (isotérmica) em menos de uma hora, através de polimerases. O precipitado resultante deste processo aumenta a turbidez da solução, simplificando a identificação visual de amostras positivas<sup>43</sup>.

A LAMP apresenta uma precisão equivalente à RCP. Relativamente à sensibilidade e especificidade, diversos estudos na literatura<sup>31</sup> indicam que estas são muito elevadas para a detecção de diferentes espécies de parasitas *Plasmodium*. A técnica LAMP apresenta um limite de detecção de aproximadamente 1 parasita/ $\mu$ L de sangue, no entanto pode atingir valores entre 0,025 e 0,1 parasitas/ $\mu$ L de sangue. Além disso, a sua execução experimental requer material menos sofisticado que o RCP, tempos de resposta mais curtos e apresenta custos mais reduzidos que RCP<sup>40</sup>.

Assim, a LAMP pode ser uma boa alternativa ao método RCP, uma vez que a reação que a constitui pode ser facilmente conduzida num tubo a temperatura constante, sendo um fator importante para um possível diagnóstico rápido da malária em regiões remotas<sup>7</sup>.

#### 2.1.4.3 AMPLIFICAÇÃO BASEADA NAS SEQUÊNCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS (NASBA)

Em 1997, a NASBA foi utilizada pela primeira vez para detetar o parasita da malária com base na amplificação do 18S ácido ribonucleico ribossómico (do inglês rRNA). Este método de diagnóstico baseia-se na combinação de três enzimas para alcançar a amplificação de ácido ribonucleico (RNA), sem necessitar de um ciclo térmico<sup>44</sup>.

Ao longo do tempo têm vindo a ser desenvolvidas diferentes versões desta técnica, como os ensaios de amplificação baseada nas sequências de ácidos nucleicos quantitativos (QT-NASBA), sendo, cada vez mais, investigados para utilização em tempo

real<sup>45</sup>. Estes são utilizados na deteção de espécies distintas de *Plasmodium*, contendo um limite de deteção entre 0,01 e 0,1 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue<sup>46</sup>. Além disso, considera-se que ultrapassam os TDR e o RCP ao nível da sensibilidade e especificidade.

Finalmente, as tecnologias NASBA são uma alternativa vantajosa, no sentido em que não requerem equipamentos de ciclos térmicos, são de rápida execução, utilizam um procedimento de preparação de amostras simples, requerem quantidades pequenas de sangue e não interferem com o ADN<sup>31</sup>.

### 2.1.5 OUTRAS ABORDAGENS INOVADORAS

Os métodos de diagnóstico referidos anteriormente são os mais comuns para o diagnóstico de malária, quer para atuação em campo (diagnóstico clínico, microscopia e TRD) quer na investigação em laboratório (métodos moleculares). No entanto, de modo a ultrapassar as limitações dos métodos existentes e com o progresso emergente em novas tecnologias, têm vindo a ser desenvolvidas outras técnicas, em que a deteção do parasita difere dos métodos presentes. Alguns exemplos são: a deteção de atividade enzimática através de um círculo rotativo<sup>6</sup>, sendo que a atividade catalítica da enzima *Plasmodium topoisomerase I* é transformada em produtos de ADN amplificados isotermicamente; a deteção serológica do parasita *Plasmodium* utilizando soro sanguíneo de pacientes com malária<sup>6</sup>; os dispositivos baseados em microfluídica<sup>47</sup>; citometria de fluxo para classificação através de laser e a identificação de glóbulos vermelhos infetados<sup>48</sup> e diagnóstico específico de parasitas *Plasmodium* mediado por aptâmeros ou anticorpos químicos<sup>7</sup>. Mais recentemente, muitos investigadores têm vindo a explorar o potencial de Hz no diagnóstico de malária, focando-se nas suas propriedades magnéticas<sup>49</sup>, superparamagnéticas<sup>50</sup>, acústicas<sup>51,52</sup> ou óticas<sup>53</sup>. Um destes exemplos, é um método de deteção foto-acústica, baseado em nanobolhas de vapor<sup>52</sup>, criadas através da estimulação, por um laser pulsado, da Hz presente no sangue do paciente infetado.

Particularmente, os métodos óticos têm vindo a ser desenvolvidos para diagnóstico de malária a partir da quantificação de Hz por espectroscopia, tal como será detalhado na secção seguinte, constituindo o ponto de partida para o presente trabalho.

## 2.2 DETEÇÃO DE MALÁRIA POR ESPECTROSCOPIA ÓTICA

Assim como referido previamente na motivação do trabalho (secção 1.2), a presente dissertação enquadra-se num projeto de investigação financiado (MalariaChip, referência NORTE-01-0145-FEDER-028178) que tem como principal objetivo o desenvolvimento de um dispositivo não invasivo, baseado em espectrofotometria de reflectância ótica para a deteção do parasita da malária, através da identificação de Hz (um subproduto da digestão do parasita da malária), sem ser necessário uma recolha de amostras de sangue de pacientes infetados. Assim, no seguimento da revisão de literatura apresentada na secção anterior (secção 2.1), e focando nos principais objetivos do trabalho de investigação, esta secção apresenta, por sua vez, uma revisão dos atuais métodos de espectroscopia ótica em desenvolvimento para o diagnóstico de malária com base na deteção da Hz. Apresenta-se, ainda, uma breve descrição da espectrofotometria de reflectância ótica, o método utilizado neste trabalho para a deteção de Hz e diagnóstico de malária.

### 2.2.1 REVISÃO DE LITERATURA DE MÉTODOS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA PARA A DETEÇÃO DE HEMOZOÍNA

O parasita *Plasmodium*, agente causador da doença da malária, quando presente nos glóbulos vermelhos, origina um conjunto de alterações bioquímicas e morfológicas no interior destas células. A degradação da Hb constitui uma das alterações ocorrentes do metabolismo do parasita durante o seu desenvolvimento intracelular<sup>54</sup>. O produto resultante da digestão da Hb é o grupo *heme*, que é tóxico e o parasita armazena na sua forma metabolicamente cristalizada não toxica, denominada de Hz. A Hz é, desta forma, um produto exclusivo do parasita, podendo servir como um biomarcador para o diagnóstico de malária<sup>7</sup>. Assim, têm vindo a ser desenvolvidas várias técnicas de espectroscopia ótica para o estudo das propriedades físicas e químicas da Hz, que podem ser integradas em dispositivos cada vez mais miniaturizados, automatizados e não invasivos, com o objetivo de ajudar a diagnosticar esta doença na sua fase inicial<sup>55</sup>.

De uma forma genérica, a espectroscopia estuda a interação entre a radiação eletromagnética e as biomoléculas numa determinada amostra, sendo a mais utilizada

de todas as técnicas analíticas disponíveis em laboratório. Desta forma, a espectroscopia tem a capacidade de identificar uma biomolécula específica, assim como a caracterizar estruturalmente, quantificar a sua concentração e determinar uma atividade enzimática<sup>56</sup>.

A espectroscopia permite a identificação de substâncias através da reflexão ou absorção da luz em diferentes comprimentos de onda do espectro ótico. O processo caracteriza-se pela incidência de um feixe de radiação eletromagnética que passa pela amostra, fazendo com que a intensidade de radiação transmitida e/ou refletida diminua em determinadas frequências da radiação incidente<sup>57</sup>. A seleção destas frequências e, conseqüentemente dos comprimentos de onda, depende das substâncias presentes na amostra em questão, uma vez que cada substância absorve energia de radiação a diferentes comprimentos de onda<sup>6</sup>.

Entre as diversas técnicas espectroscópicas em desenvolvimento para detecção de Hz, podem destacar-se a espectroscopia ultravioleta-visível (UV/VIS)<sup>58</sup>, a espectroscopia de Raman<sup>59</sup> e a espectroscopia foto acústica<sup>60</sup>. A primeira permite distinguir entre diferentes fases da maturação do parasita<sup>61</sup>. A espectroscopia de Raman permite a medição do comprimento de onda e da intensidade da luz, emitida por uma molécula espalhada inelasticamente. Esta emissão ocorre devido a interações da luz incidente com as energias vibracionais da molécula, possibilitando a identificação da substância e a observação das suas alterações moleculares<sup>62</sup>. Especificamente, a espectroscopia de Raman de superfície aumentada é utilizada na detecção da Hz, durante a replicação assexuada, uma vez que, sendo a Hz um subproduto paramagnético que contém ferro da digestão da Hb, usando nanopartículas de prata, ocorre um aumento do sinal Raman da Hz<sup>7</sup>. Finalmente, a espectroscopia foto acústica permite o estudo das propriedades óticas e termoelásticas da Hz. A absorção ótica causa expansão termoelástica e contração dos cristais de Hz, criando ondas de pressão que se propagam através dos tecidos mais profundos, quando comparadas com as ondas de luz<sup>63</sup>. Desta forma, a Hz, devido às suas elevadas propriedades de absorção ótica, pode ser estudada através desta espectroscopia em comprimentos de onda óticos, e em frequências de ultrassom diagnóstico<sup>61</sup>.

No presente trabalho, como já referido, a quantificação de H<sub>z</sub> será efetuada a partir de espectrofotometria por reflectância ótica no espectro UV/VIS, seguidamente descrita.

### 2.2.2 REFLECTÂNCIA ÓTICA NA QUANTIFICAÇÃO DE HEMOZOÍNA

Quando a luz incide numa superfície ou meio ocorrem três fenómenos: a transmissão, a absorção e a reflexão. Nesta secção será feita uma análise da luz que é refletida numa superfície ou meio, sendo que a figura 1 é representação esquemática desse fenómeno em condições ideais, incluindo os fenómenos de reflexão especular e difusa<sup>64</sup>.

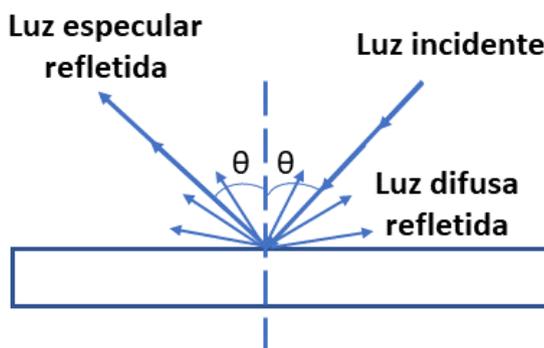


Figura 1: Representação esquemática do processo físico de reflexão da luz.

A reflectância é uma fração de luz que retorna à superfície ou meio onde incidiu, sendo por isso refletida<sup>65</sup>. Normalmente, a luz refletida depende da direção, da frequência ótica e do comprimento de onda da luz incidente. Além disso, constitui uma propriedade ótica intrínseca de um filme fino, permitindo obter-se informações sobre transparência, estrutura de banda de energia, frequência do plasma, espessura do filme e qualidade da superfície<sup>65,66</sup>.

A figura 1 permite observar que no fenómeno de reflectância pode ocorrer reflexão difusa e/ou especular<sup>64</sup>. A reflexão especular ocorre quando a luz incide numa superfície muito lisa (metal polido ou vidro), fazendo com que o feixe de luz incidente seja refletido num único feixe com ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência<sup>67</sup>. Por outro lado, a reflexão difusa é produzida através de superfícies rugosas e de espalhamento no interior do material refletor, caracterizando-se segundo a reflexão da luz por uma ampla distribuição de ângulos<sup>68</sup>.

Especificamente, o presente trabalho baseia-se no princípio de que a H<sub>z</sub> e a H<sub>b</sub> possuem espectros óticos característicos diferentes, principalmente na faixa do visível, com picos

de absorvância e reflectância distintos, sendo que se modificam consoante as concentrações de Hb e Hz no sangue. Quando o parasita da malária está presente no organismo humano, a Hz aumenta e a Hb diminui, o que possibilita a deteção do parasita por espectrofotometria de reflectância ótica e permite detetar o progresso da infeção. O grupo de investigação CMEMS (Unidade de Investigação em Microsistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho), tem vindo desde 2018 a aplicar, em cooperação com o Laboratório Associado ICVS (Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde) /3B's, também da Universidade do Minho, este princípio para deteção de Hz por reflectância ótica<sup>69,70</sup>.

A figura 2 representa um exemplo de espectros normalizados de reflectância ótica de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados com o parasita da malária, em diferentes níveis de parasitémia, nos estados iniciais (anéis) e avançados (trofozoitos) da doença. As medições dos espectros foram realizadas num *setup* espectrofotométrico composto por uma fonte de luz de halogénio de tungsténio de quartzo com 200 W de potência ótica (modelo 66881, *Oriel Newport*), fibras óticas, um suporte para cuvetes e um espetrofotómetro *AvaSpec-ULS2048XL EVO (Avantes)*.

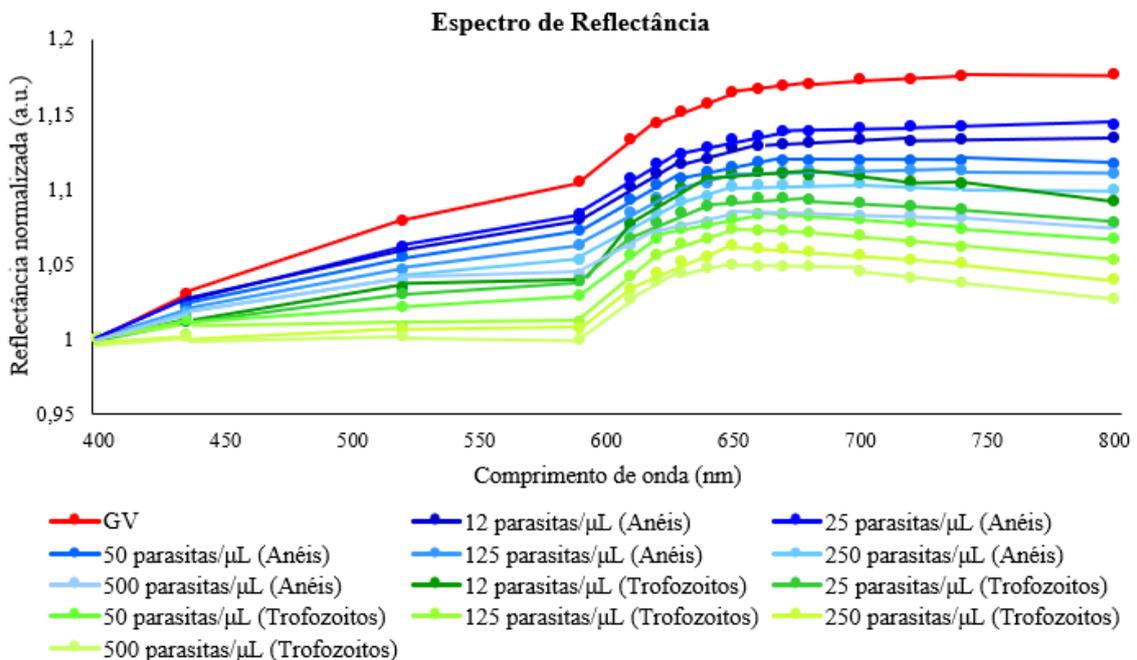


Figura 2: Espectros de reflectância normalizada entre os 400 nm e os 800 nm, de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados *in vitro* com diferentes parasitémias (12,5 a 50 parasitas/μL de glóbulos vermelhos) de *P. falciparum*, nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença.

Os dados dos espectros, com intervalos de 1 nm, foram recolhidos utilizando o *software* *AvaSoft 8.11* e foi usado sulfato de bário como referência para as medições. As amostras de GV infetado com *Plasmodium falciparum* referidas, foram cultivadas *in vitro* nas instalações do ICVS<sup>69</sup>.

Os dados do trabalho de investigação, representado no gráfico da figura anterior, obtidos nos laboratórios do grupo de investigação CMEMS, permitiram seleccionar, no espectro ótico, 16 comprimentos de onda relevantes que, por si só, possibilitam a reconstrução dos espectros contínuos de reflectância das amostras<sup>69</sup>. Os comprimentos de onda seleccionados, identificados por pontos no gráfico, são: 400, 435, 520, 590, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 700, 720, 740 e 800 nm. As amostras, utilizadas para a obtenção do gráfico mencionado, foram medidas numa cuvete de caminho ótico de 1 mm com 40% de hematócrito para representar a quantidade de glóbulos vermelhos no sangue humano.

A partir dos espectros de reflectância apresentados e da seleção de 16 comprimentos de onda, é possível desenvolver um dispositivo ótico inovador com base em reflectância ótica para deteção de Hz. Com a finalidade de reconstruir os espectros de reflectância ótica das amostras a partir de um conjunto de 16 pontos discretos, é necessário que este dispositivo seja constituído por: uma fonte de luz branca capaz de emitir e direccionar a luz para as amostras; uma série de filtros óticos passa-banda (16 filtros, no caso particular do trabalho em desenvolvimento), específicos para seleccionar e filtrar a luz em comprimentos de onda seleccionados, com alta transmitância e baixa FWHM e um conjunto de 16 fotodíodos em silício, fabricados em tecnologia CMOS, que vão receber a luz refletida e convertê-la em corrente elétrica. Os filtros devem ser filmes finos de multicamadas, capazes de ser depositados, durante a fabricação, no topo da matriz de 16 fotodíodos. Desta forma, o desenho e a simulação dos filtros óticos, baseados em filmes finos de multicamada, constituem um avanço no estado de arte da técnica, permitindo contribuir de modo fulcral para o desenvolvimento do dispositivo inovador de diagnóstico de malária que se espera obter. A secção que se segue apresenta, assim, um resumo do estado de arte de filtros óticos, que será o ponto de partida para o desenho e simulação dos 16 filtros óticos pretendidos.

## 2.3 FILTROS ÓTICOS

No sentido de implementar o dispositivo proposto para o diagnóstico de malária, baseado na espectroscopia de reflectância ótica, é necessário, como supramencionado, um conjunto de 16 filtros óticos. Nesta secção, serão apresentados alguns exemplos de aplicações com base em filtros óticos, sendo que, no capítulo 3, serão abordados mais detalhadamente os princípios teóricos nos quais se baseiam.

### 2.3.1 TIPOS DE FILTROS ÓTICOS

Os filtros óticos são dispositivos ou materiais capazes de alterar a distribuição espectral de um feixe de luz espectralmente seletivo ou não seletivo, apresentando como vantagens a simplicidade, robustez e, na maioria dos casos, no seu relativo baixo custo<sup>71</sup>. Nos sistemas e nas comunicações óticas, são utilizados diferentes tipos de filtros óticos para transmitir ou bloquear seletivamente certos comprimentos de onda<sup>72</sup>.

Desta forma, os filtros óticos transmitem luz a diferentes comprimentos de onda e eliminam a luz nas regiões espectrais indesejadas. Alguns exemplos de filtros óticos, comumente usados, são: filtros *Fabry-Perot*<sup>73</sup>; filtros de grade de *Bragg* de fibra<sup>74</sup>; filtros ajustáveis<sup>75</sup>; filtros absorventes<sup>72</sup>; filtros infravermelhos<sup>76</sup>; filtros ultravioleta<sup>76</sup> e filtros dicroicos<sup>77</sup>.

A estrutura típica de um filtro *Fabry-Perot* será a base dos filtros projetados no trabalho desenvolvido, pelo que será abordado mais aprofundadamente nas secções seguintes. Os filtros *Fabry-Perot*, ou também conhecidos como filtros de filmes finos multicamada, são constituídos por dois espelhos altamente refletivos separados por uma cavidade. Neste caso, a luz pode ser transmitida atravessando a cavidade ou pode ser refletida para o meio<sup>78</sup>.

Os filtros de grade de *Bragg* de fibra são filtros refletivos com largura de banda muito estreita, constituindo um elemento chave nos sistemas de fibras óticas. Neste caso, a luz propaga-se através de regiões com índice de refração elevado e baixo, alternadamente, sendo parcialmente refletida em cada interface das regiões. Para comprimentos de onda específicos, quando a distância entre as regiões mencionadas é

tal que todas as reflexões parciais se somam em fase, a reflexão total é aproximadamente 100%. Por outro lado, para todos os outros comprimentos de onda, as reflexões fora de fase vão cancelar-se, desencadeando elevada transmissão. Deste modo, estes filtros atuam como filtros rejeita banda, ocorrendo transmissão nos comprimentos de onda que não estão em ressonância com a grade e reflexão nos comprimentos de onda que satisfazem a condição de *Bragg*<sup>79</sup>.

Os filtros ajustáveis são filtros óticos passa-banda ou rejeita banda em que é possível variar a sua frequência através do ajuste dos seus componentes, quer manualmente como quer através de sistemas de controlo eletrónicos. Por exemplo, num filtro passa-banda, o comprimento de onda central pode ser alterado ou a sua largura de banda pode ser ajustada. Existem, ainda, filtros ajustáveis em que a transmissão pode ser alterada para uma ampla gama de comprimentos de onda<sup>75</sup>.

Os filtros absorventes podem ser feitos de vidro e com diferentes componentes orgânicos ou inorgânicos adicionados. Estes componentes vão absorver alguns comprimentos de onda da luz e transmitir outros. Nestes filtros, aos componentes pode ser adicionado plástico, produzindo um filtro de gel, tornando-se mais leves e de menor custo do que os filtros à base de vidro<sup>72</sup>.

Os filtros infravermelhos e os ultravioletas são filtros óticos de cor que permitem bloquear ou absorver luz na zona do infravermelho e na zona do ultravioleta, respetivamente. As suas principais aplicações são ao nível da fotografia, metrologia, astronomia e termografia<sup>72,76</sup>.

Finalmente, os filtros dicróicos são utilizados para a transmissão de luz em gamas específicas de comprimentos de onda, e são comumente usados para aplicações de filtros passa alto e passa baixo<sup>72,77</sup>.

### 2.3.1 APLICAÇÕES DE FILTROS ÓTICOS

Ao nível das aplicações, os filtros óticos podem ser utilizados nas áreas da fotografia, instrumentos óticos, iluminação cromática, espectroscopia de fluorescência, equipamentos científicos, computadores, redes de comunicação ótica e unidades de armazenamento de dados, assim como outros sistemas tecnológicos<sup>72</sup>. Alguns exemplos

de aplicações são: os sistemas de imagem colorida, em que os filtros óticos controlam as propriedades espectrais da luz e alteram a sua cor; o melhoramento de imagem, sendo que sistemas de filtros de passagem de banda azul são usados para bloquear a luz amarela e escurecer o fundo de imagem; os microscópios de fluorescência, onde os sistemas de filtros passa-banda eliminam a luz do sinal de fluorescência; os sistemas de detecção de moléculas alvo, em que os sistemas de filtros óticos, constituídos por filmes finos, são utilizados para melhorar a transmissão, bloqueio e propriedades da frente de onda transmitida e refletida, resultando em imagens mais brilhantes e com elevado contraste<sup>80</sup> e os detetores CMOS lineares e planos, quer em instrumentação médica, quer em aplicações comerciais, governamentais e aeroespaciais, que utilizam filtros óticos multiespectrais.

Particularmente, na área da instrumentação e aplicações médicas existem, na literatura, diversos trabalhos que abordam filtros óticos. Na Universidade do Minho, Minas et al. desenvolveram vários estudos que se baseiam no fabrico de filtros óticos para a medição da concentração de biomoléculas em fluidos biológicos (como a urina, soro, plasma), através de espectrofotometria de absorção ótica<sup>73,78,81</sup>. No estudo realizado em Minas et al.<sup>73</sup>, os filtros óticos fabricados são constituídos por camadas alternadas de SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> baseando-se na estrutura de *Fabry-Perot*. Os comprimentos de onda selecionados, para a medição das diferentes concentrações das biomoléculas, encontram-se na zona espectral entre 450 nm e 650 nm. Os picos de máxima transmitância ótica, resultante de cada comprimento de onda projetado num filtro ótico, são maiores do que 86% e a FWHM menor do que 6 nm. Por outro lado, no trabalho de Minas et al.<sup>81</sup>, apesar de os materiais e o princípio básico estrutural do desenho dos filtros ótico serem idênticos ao trabalho anterior, foram selecionados apenas 2 comprimentos de onda (495 nm e 592 nm), definidos pela reação de um reagente específico com uma biomolécula específica. Os picos de máxima transmitância ótica, obtidos para estes dois comprimentos de onda, foram superiores a 90% e a FWHM igual a 8 nm. Pimenta et al. propôs o desenho, otimização e fabrico de filtros óticos de largura de banda estreita com o objetivo de extrair um conjunto de sinais de reflectância difusa e fluorescência de fantasmas representativos de tecidos gastrointestinais<sup>68,82</sup>. Nesta investigação, 16 comprimentos de onda foram selecionados (entre 350 nm e 750 nm) para o projeto de 16 filtros óticos

constituídos por filmes finos de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ , alternadamente. As percentagens das máximas transmitâncias óticas resultantes para cada caso são próximas de 90% e o valor médio da FWHM é de 13 nm. Além disso, Ferreira et al. desenvolveram filtros óticos para integrarem detetores de espectroscopia optoelectrónica para avaliar tecidos esofágicos<sup>83</sup>. Um outro exemplo surge com Pereira et al., que propôs o fabrico de filtros óticos para aplicação em sondas neuronais, nomeadamente, para integrarem sistemas de leitura de sinais fluorescentes emitidos por fluoróforos<sup>84</sup>.

Na generalidade, os filtros óticos podem surgir, ainda, noutros tipo de aplicações diferentes, como em Luigi Bibbò et al.<sup>85</sup>, em que é sugerido o desenho e fabrico de um filtro ótico de largura de banda estreita, antirreflexo e sintonizável para ser aplicado em moduladores, ecrãs e na extração de cor nas imagens. A sua estrutura é uma meta-superfície, baseada em nanopartículas plasmónicas, num filme eletro-ótico com uma configuração de três camadas de metal-dielétrico-metal, atuando na região do visível/infravermelho (VIS/IR)<sup>85</sup>. Outra abordagem é proposta por Rubio et al.<sup>86</sup>, num trabalho em que sugere o estudo da resposta ótica de um dispositivo baseado num interferómetro de *Fabry-Perot* sintonizável e fabricado com tecnologia MOEMS (sistema micro-opto-electro-mecânico). O dispositivo destina-se a integrar sistemas de espectrómetros infravermelhos não dispersivos (NDIR) para a medição e deteção ótica de gases. Também Calaza et al.<sup>87</sup> têm vindo a desenvolver trabalho de investigação em filtros óticos. Atualmente, os vários filtros óticos têm vindo a ser integrados em diversos sistemas e com as mais variadas aplicações. Esta valência e flexibilidade para utilização de filtros óticos motivou a sua utilização no trabalho desenvolvido nesta dissertação.

# **3 TEORIA DOS FILTROS**

Neste capítulo serão abordados os fundamentos teóricos relativos ao comportamento dos filtros óticos passa-banda baseados em estruturas de multicamadas de filmes finos. Será, também, realizada uma análise e compreensão de como as estruturas de filmes finos podem ser aplicadas em projetos de filtros óticos.

### 3.1 FILTROS ÓTICOS BASEADOS EM FILMES FINOS

O conceito de filme fino pode ser definido como uma camada com espessura igual ou inferior a  $1\ \mu\text{m}$ . Esta camada, quando usada em aplicações de filtros óticos, é constituída por um material sólido específico depositada num substrato adequado<sup>88</sup>, como o vidro ou o quartzo. A figura 3 esquematiza, num sistema composto por substrato, filme fino e ar, o comportamento da luz quando incide no filme fino, compreendendo tanto a sua reflexão como transmissão. As setas indicam a trajetória que a luz realiza aquando da interação com o filme e  $n_0$ ,  $n_1$  e  $n_2$  representam, respetivamente, os índices de refração do ar, do material que constitui a camada do filme fino e do substrato.

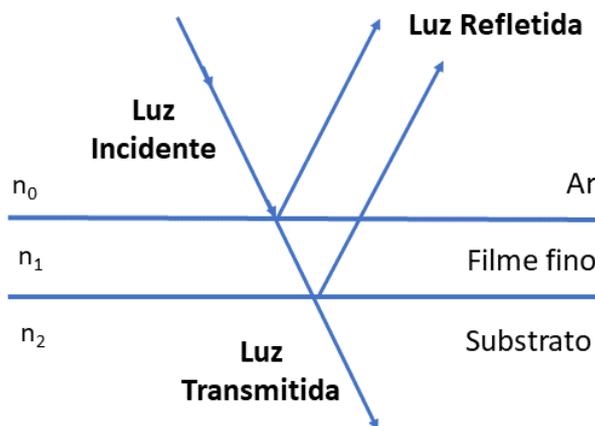


Figura 3: Representação esquemática da interação da luz (refletida e transmitida) com um filme fino.

Como se observa na figura 3, quando a luz incide num meio sólido, pode ocorrer a transmissão da mesma ao longo do meio (filme fino + substrato), ou a mesma pode ser refletida. Normalmente, os filmes finos são transparentes, pelo que não ocorre absorção de energia, sendo que a característica do filtro em reflexão será complementar à característica do filtro em transmissão. Desta forma, uma parte da luz incidente no filme será refletida e a outra parte transmitida para o substrato<sup>89</sup>.

O desempenho dos filtros óticos baseados em filmes finos compreende-se, qualitativamente, através de três conceitos fundamentais<sup>90</sup>:

1. A amplitude da luz refletida na fronteira entre dois meios é dada pela expressão:

$$\frac{1 - \rho_r}{1 + \rho_r} \quad (1)$$

em que o símbolo  $\rho_r$  corresponde à razão entre os índices de refração ( $n$ ) dos dois meios<sup>91</sup>. Por sua vez, o índice de refração do meio,  $n$ , define-se como a razão entre as velocidades da luz no vázio e nesse meio, como será descrito adiante. A partir da expressão anterior, é possível obter a reflectância, calculada através da expressão:

$$\left(\frac{1 - \rho_r}{1 + \rho_r}\right)^2 \quad (2)$$

2. A luz sofre um desvio de fase de  $180^\circ$ , quando a reflectância ocorre num meio com menor índice de refração que o do meio adjacente. Por outro lado, quando a reflectância ocorre num meio com maior índice de refração, comparativamente com o do meio adjacente, o desvio de fase será de  $0^\circ$ <sup>88</sup>.
3. O feixe de luz incidente será dividido em duas componentes resultantes da reflexão que ocorre na superfície superior e inferior do filme fino. Estes dois feixes, resultantes da reflexão, recombina-se num outro feixe, apresentando uma amplitude que corresponde à diferença ou à soma das amplitudes das duas componentes. Caso o desvio de fase da luz seja de  $180^\circ$ , a amplitude será calculada através da diferença entre as amplitudes das componentes, sendo que os feixes interferem destrutivamente. Caso o desvio de fase seja de  $0^\circ$ , a amplitude é obtida pela soma das amplitudes de ambas as componentes e os feixes interferem construtivamente<sup>80</sup>.

Normalmente, a implementação de filtros óticos de filmes finos requer estruturas em multicamadas de filmes finos, uma vez que constitui a forma elementar para obter elevada reflectância<sup>82</sup>. Desta forma, esta multicamada será constituída por uma série de

camadas com índices de refração, alternadamente, elevados e baixos, sendo depositada num substrato<sup>73</sup>, como representado no esquema da figura 4.

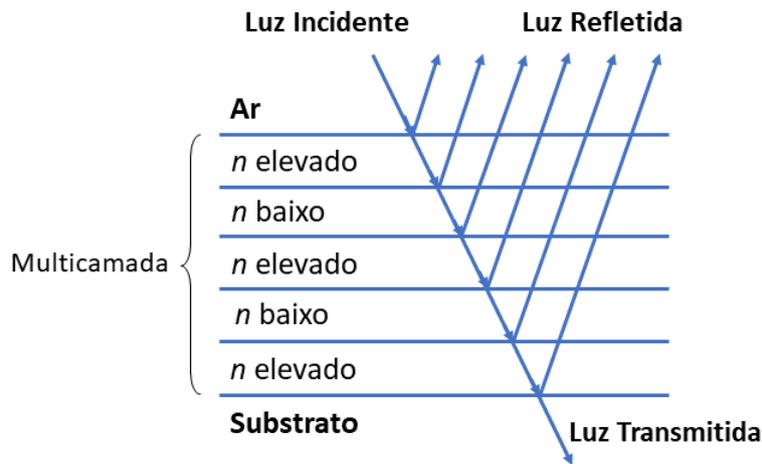


Figura 4: Representação esquemática de estrutura multicamada de filmes finos.

A luz incidente na multicamada é alvo de sucessivas reflexões nas fronteiras de cada camada. As camadas, ao serem constituídas por materiais com índice de refração elevado e baixo, alternadamente, permitem que os feixes de luz refletidos se combinem construtivamente num só feixe, uma vez que surgem todos em fase na superfície das diferentes fronteiras. Assim, a reflexão efetiva da estrutura formada é otimizada para ser elevada, sendo que aumenta com o número de camadas<sup>90</sup>. No entanto, esta reflectância mantém-se elevada dentro de uma gama limitada de comprimentos de onda, pelo que a combinação de vários filmes com espessuras específicas resulta num espectro de reflectância com máximos e mínimos, em comprimentos de onda específicos. A característica do filtro na reflexão será complementar à da transmissão, quando a absorbância é zero<sup>88</sup>.

### 3.1.1 CONCEITOS BÁSICOS DA PROPAGAÇÃO DA LUZ NUM MEIO

Na subsecção que se segue serão apresentados os cálculos matemáticos que ajudam na compreensão da propagação da luz incidente num determinado meio.

### 3.1.1.1 EQUAÇÕES DE MAXWELL E ONDAS ELETROMAGNÉTICAS

A luz é uma onda eletromagnética, pelo que as suas características eletromagnéticas podem ser matematicamente descritas segundo as seguintes equações de Maxwell, considerando o meio isotrópico e uniforme<sup>80,88</sup>:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D} = \rho \quad (3)$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \quad (4)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\frac{\partial}{\partial t} \vec{B} \quad (5)$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial}{\partial t} \vec{D} \quad (6)$$

$\vec{D}$  representa o vetor de deslocamento elétrico,  $\rho$  a densidade de carga elétrica,  $\vec{B}$  o vetor de indução magnética,  $\vec{E}$  o vetor de campo elétrico,  $\vec{H}$  o vetor de campo magnético e, finalmente,  $\vec{J}$  corresponde ao vetor de densidade de corrente elétrica.

Por sua vez, a densidade de corrente elétrica e o deslocamento elétrico relacionam-se com o campo elétrico através das seguintes equações<sup>92</sup>:

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} \quad (7)$$

$$\vec{D} = \epsilon \vec{E} \quad (8)$$

onde  $\sigma$  e  $\epsilon$  representam a condutividade elétrica e a permissividade elétrica do meio, respetivamente.

Além disso, a indução magnética pode ser relacionada com a intensidade do campo magnético segundo a equação (9), onde  $\mu$  corresponde à permeabilidade magnética do meio<sup>93</sup>:

$$\vec{B} = \mu \vec{H} \quad (9)$$

No vácuo, os valores da permissividade elétrica ( $\epsilon_0$ ) e da permeabilidade magnética ( $\mu_0$ ) são, respetivamente:

$$\epsilon_0 = \frac{10^{-9}}{36\pi} F/m \quad (10)$$

$$\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} H/m \quad (11)$$

As duas componentes relacionam-se segundo a seguinte expressão, sendo  $c$  a velocidade da luz no vazio ( $c=2,997925 \times 10^8$  m/s):

$$\epsilon_0 = \frac{1}{\mu_0 c^2} \quad (12)$$

Seguidamente, serão apresentados matematicamente um conjunto de fenómenos, tendo em conta a literatura<sup>80,88,90,92</sup>, de forma a auxiliar uma melhor compreensão do modo de propagação da luz. Os campos magnético e elétrico podem ser considerados duas componentes de um único fenómeno físico, o campo eletromagnético. Quando ocorre uma variação eletromagnética, esta prolonga-se independentemente da fonte que a originou. Considere-se um meio livre de fontes, ou seja, onde  $J=0$  e  $\rho=0$ .

Neste caso, a equação 5 pode ser resolvida através da combinação das equações (3), (6), (8) e (9), obtendo-se a expressão que se segue:

$$\nabla^2 \vec{E} = \mu\epsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (13)$$

Recorrendo ao mesmo procedimento, é possível obter-se a equação (14) para a indução magnética:

$$\nabla^2 \vec{B} = \mu\epsilon \frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2} \quad (14)$$

As equações (13) e (14) são equações de onda, sendo que o produto  $\mu\epsilon$  presente pode relacionar-se com a velocidade de propagação da luz num meio ( $v$ ), através da expressão:

$$v = \frac{1}{\sqrt{\mu\epsilon}} \quad (15)$$

Como anteriormente referido, o índice de refração de um meio é determinado pela razão entre a velocidade de propagação da luz no vácuo ( $c$ ) e a velocidade de propagação da luz nesse meio ( $v$ ), podendo ser calculado através da equação 16:

$$n = \frac{c}{v} = \sqrt{\frac{\epsilon\mu}{\epsilon_0\mu_0}} \quad (16)$$

Normalmente, o efeito das propriedades magnéticas do meio na velocidade de propagação da luz é insignificante, sendo que se pode considerar  $\mu \approx \mu_0$ . Assim, o índice de refração é determinado apenas pela permissividade do meio, que depende da frequência da onda eletromagnética incidente.

No caso de ondas planas, isto é, ondas com fase constante, cujas frentes de onda são planos infinitos e paralelos, as equações (13) e (14) têm a seguinte solução:

$$\vec{E} = Re \left\{ \vec{E}_0 e^{i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \phi)} \right\} \quad (17)$$

$$\vec{B} = Re \left\{ \vec{B}_0 e^{i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \phi)} \right\} \quad (18)$$

Nas equações anteriores,  $Re$  indica a componente real,  $\vec{E}_0$  e  $\vec{B}_0$  correspondem aos vetores da amplitude de oscilação,  $\omega$  é a frequência angular,  $\vec{r}$  e  $\vec{k}$  são os vetores de posição e de onda, respetivamente, e  $\phi$  é a fase de onda.

A frequência ( $f$ ) e o comprimento de onda ( $\lambda$ ) da onda eletromagnética são calculados através das seguintes equações:

$$f = \frac{\omega}{2\pi} \quad (19)$$

$$\lambda = \frac{2\pi}{|\vec{k}|} \quad (20)$$

A onda eletromagnética é uma forma de transportar energia, sendo possível calcular a sua densidade de energia eletromagnética ( $u$ ):

$$u = \frac{1}{2} (\vec{E} \cdot \vec{D} + \vec{B} \cdot \vec{H}) \quad (21)$$

Finalmente, outra característica importante a ser analisada no desenho de estruturas com filmes finos é a admitância ótica, uma vez que define a maior ou menor facilidade que a luz apresenta em atravessar um filme. Assim, a admitância ótica de um material é numericamente igual ao índice de refração do meio ( $n$ ) e relaciona os campos magnético ( $\vec{H}$ ) e elétrico ( $\vec{E}$ ):

$$\vec{H} = n\vec{E} \quad (22)$$

Todas as equações supramencionadas constituem o princípio base teórico para a realização deste trabalho.

### 3.1.2 REFLECTÂNCIA NUMA ESTRUTURA SIMPLES DE UM FILME FINO

Nesta secção serão abordados conceitos importantes para um caso da medição da reflectância ótica numa estrutura formada por um filme fino, apresentando duas fronteiras, como observado no esquema da figura 5.

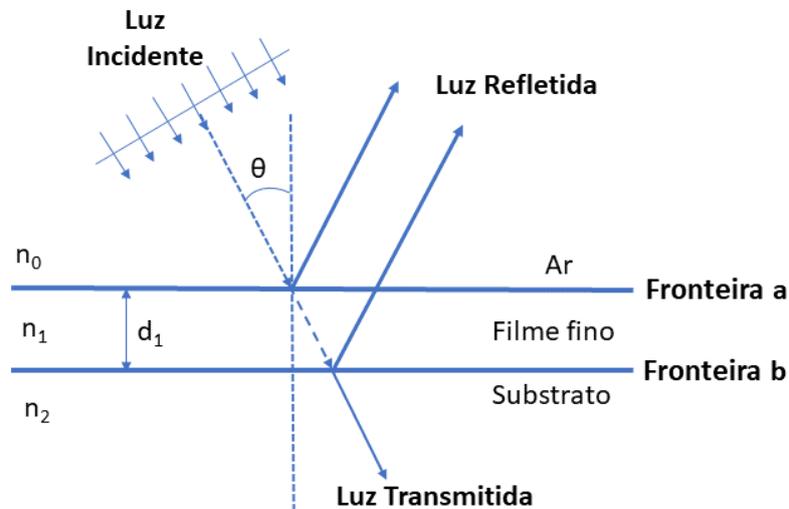


Figura 5: Representação esquemática da propagação da luz numa estrutura com um filme fino depositado num substrato.

Numa análise da propagação da luz, e em particular nesta estrutura de filme fino, é necessário definir a direção de incidência da onda, usando-se o símbolo “+” (sentido positivo) para as ondas que estão na direção de incidência e o símbolo “-” (sentido negativo) para as ondas na direção oposta<sup>91,94</sup>.

Na fronteira  $b$ , entre o filme fino e o substrato, apenas são formadas ondas no sentido positivo no substrato. Por outro lado, no filme fino verifica-se a presença de ondas tanto

no sentido negativo como no sentido positivo, pelo que os campos elétrico e magnético totais podem ser definidos através da soma de ambas as ondas<sup>80,95</sup>:

$$E_b = E_{1b}^+ + E_{1b}^- \quad (23)$$

$$H_b = n_1 E_{1b}^+ - n_1 E_{1b}^- \quad (24)$$

Obtendo-se:

$$E_{1b}^+ = \frac{1}{2} \left( \frac{H_b}{n_1} + E_b \right) \quad (25) \quad E_{1b}^- = \frac{1}{2} \left( \frac{H_b}{n_1} - E_b \right) \quad (26)$$

$$H_{1b}^+ = n_1 E_{1b}^+ = \frac{1}{2} (H_b + n_1 E_b) \quad (27) \quad H_{1b}^- = -n_1 E_{1b}^- = \frac{1}{2} (H_b - n_1 E_b) \quad (28)$$

Na fronteira  $a$ , no mesmo instante e num ponto com coordenadas  $x$  e  $y$  semelhantes, os campos elétrico e magnético podem ser definidos alterando a fase da onda, permitindo a mudança da coordenada  $z$  de 0 para  $d_1$ . Desta forma, pode ser calculado o desvio de fase ( $\delta$ ), que representa a mudança de fase da onda quando esta atravessa a distância  $d_1$ , através da seguinte expressão<sup>88,90,92</sup>:

$$\delta = \frac{2\pi n_1 d \cos \theta}{\lambda} \quad (29)$$

Na equação anterior,  $d$  representa a espessura do filme e  $\theta$  o ângulo de incidência. Além disso, é possível obter-se, através da equação (30), o comprimento do caminho ótico (OPL), ou seja, a distância que a luz percorre no filme fino<sup>92</sup>:

$$OPL = n_1 d_1 \cos \theta \quad (30)$$

Os campos elétricos e magnéticos na fronteira  $a$  são calculados pelas seguintes expressões:

$$E_{1a}^+ = E_{1b}^+ e^{\delta} = \frac{1}{2} \left( \frac{H_b}{n_1} + E_b \right) e^{\delta} \quad (31) \quad E_{1a}^- = E_{1b}^- e^{-\delta} = \frac{1}{2} \left( -\frac{H_b}{n_1} + E_b \right) e^{-\delta} \quad (32)$$

$$H_{1a}^+ = H_{1b}^+ e^\delta = \frac{1}{2} (H_b + n_1 E_b) e^\delta \quad (33) \quad H_{1a}^- = H_{1b}^- e^{-\delta} = \frac{1}{2} (H_b - n_1 E_b) e^{-\delta} \quad (34)$$

A partir destas equações obtém-se:

$$E_a = E_{1a}^+ + E_{1a}^- = E_b \left( \frac{e^\delta + e^{-\delta}}{2} \right) + H_b \left( \frac{e^\delta + e^{-\delta}}{2n_1} \right) = E_b \cos \delta + H_b \frac{\sin \delta}{n_1} \quad (35)$$

$$H_a = H_{1a}^+ + H_{1a}^- = E_b n_1 \left( \frac{e^\delta + e^{-\delta}}{2} \right) + H_b \left( \frac{e^\delta + e^{-\delta}}{2n_1} \right) = E_b n_1 \sin \delta + H_b \cos \delta \quad (36)$$

As equações anteriores podem ser escritas sob notação matricial:

$$\begin{bmatrix} E_a \\ H_a \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \delta & \sin \delta / n_1 \\ n_1 \sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_b \\ H_b \end{bmatrix} \quad (37)$$

Esta equação relaciona as componentes tangenciais de  $\vec{E}$  e  $\vec{H}$  na fronteira  $a$ , fronteira de incidência, com as componentes tangenciais de  $\vec{E}$  e  $\vec{H}$  na fronteira  $b$ , pelo que a matriz 2x2 é definida como a matriz característica de um filme fino<sup>93,96</sup>.

Adicionalmente, através dos campos elétrico e magnético da fronteira  $a$ , é possível definir a admitância ótica do filme fino:

$$Y = \frac{H_a}{E_a} \quad (38)$$

Finalmente, um conceito, ainda importante, a compreender é a reflectância da fronteira entre o meio incidente, de admitância igual a  $n_0$ , e o meio incidente, de admitância igual a  $Y$ , que pode ser calculada segundo a seguinte equação:

$$R = \left( \frac{n_0 - Y}{n_0 + Y} \right) \left( \frac{n_0 - Y}{n_0 + Y} \right) \quad (39)$$

A equação (37) pode ser normalizada dividindo todas as variáveis por  $E_b$ :

$$\begin{bmatrix} E_a/E_b \\ H_a/E_b \end{bmatrix} = [C] = \begin{bmatrix} \cos \delta & \sin \delta / n_1 \\ n_1 \sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ n_2 \end{bmatrix} \quad (40)$$

As componentes  $B$  e  $C$  correspondem aos campos elétricos e magnéticos normalizados na superfície incidente, sendo que são utilizados para extrair as propriedades óticas dos filmes finos, através da manipulação das equações (38) e (40):

$$Y = \frac{H_a}{E_a} = \frac{C}{B} = \frac{n_2 \cos \delta + n_1 \sin \delta}{\cos \delta + \left(\frac{n_2}{n_1}\right) \sin \delta} \quad (41)$$

Assim, a reflectância pode ser calculada através de  $B$  e  $C$  segundo as equações (39) e (41), pelo que, como referido, a matriz  $\begin{bmatrix} B \\ C \end{bmatrix}$  constitui a matriz característica da estrutura de filmes finos.

### 3.1.3 REFLECTÂNCIA NUMA ESTRUTURA MULTICAMADA DE FILMES FINOS

Na secção anterior foi efetuada uma revisão dos conceitos importantes para a compreensão do fenómeno de reflectância ótica numa estrutura com apenas um filme de fino. Da mesma forma, uma metodologia semelhante pode ser aplicada para estruturas em multicamadas de filmes finos. A figura 6 apresenta uma representação esquemática de uma estrutura constituída por duas camadas de filmes finos entre o substrato e o meio de incidência.

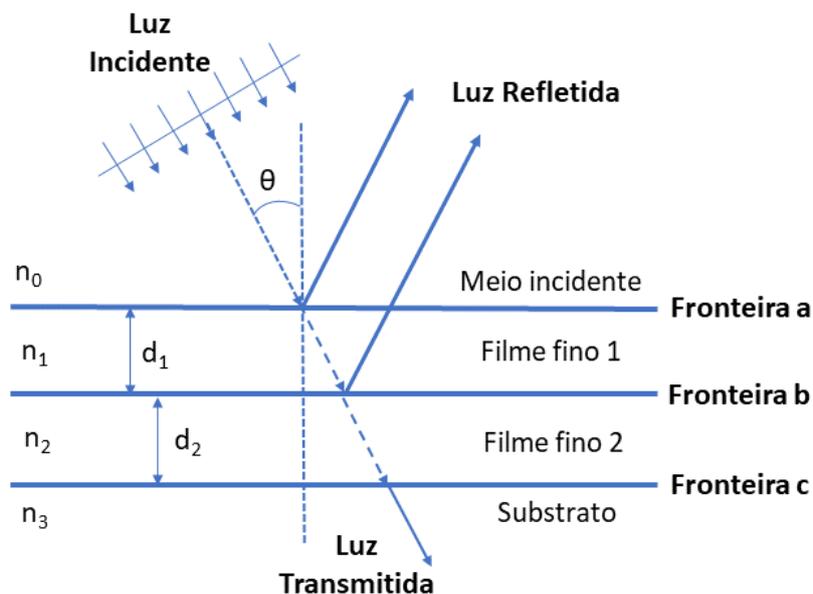


Figura 6: Representação esquemática da propagação da luz numa estrutura multicamada constituída por dois filmes finos depositados num substrato.

Considerando as expressões apresentadas na secção anterior, a matriz característica do filme fino 2 será:

$$\begin{bmatrix} \cos \delta_2 & \sin \delta_2/n_2 \\ n_2 \sin \delta_2 & \cos \delta_2 \end{bmatrix} \quad (42)$$

Aplicando a equação (37) para este filme fino, e tendo em conta os parâmetros das fronteiras 1 e 2, obtêm-se:

$$\begin{bmatrix} E_b \\ H_b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \delta_2 & \sin \delta_2/n_2 \\ n_2 \sin \delta_2 & \cos \delta_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_c \\ H_c \end{bmatrix} \quad (43)$$

$$\begin{bmatrix} E_a \\ H_a \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \delta_1 & \sin \delta_1/n_1 \\ n_1 \sin \delta_1 & \cos \delta_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos \delta_2 & \sin \delta_2/n_2 \\ n_2 \sin \delta_2 & \cos \delta_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_c \\ H_c \end{bmatrix} \quad (44)$$

Assim, a matriz característica da estrutura constituída por dois filmes finos será dada por:

$$\begin{bmatrix} B \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \delta_1 & \sin \delta_1/n_1 \\ n_1 \sin \delta_1 & \cos \delta_1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos \delta_2 & \sin \delta_2/n_2 \\ n_2 \sin \delta_2 & \cos \delta_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 \\ n_3 \end{bmatrix} \quad (45)$$

No caso em que a estrutura é constituída por multicamadas de filmes finos, a matriz anterior pode ser generalizada e estendida para um número  $Q$  de camadas. Desta forma, a matriz característica de qualquer estrutura de filmes finos pode ser obtida pelo produto das matrizes individuais de cada filme, segundo uma ordem correta, definida a partir da superfície de incidência até à superfície do substrato. A equação (46) corresponde ao cálculo da matriz característica de uma estrutura em multicamada com  $Q$  filmes finos, em que  $n_m$  representa o índice de refração no substrato e  $r$  o número da fronteira.

$$\begin{bmatrix} B \\ C \end{bmatrix} = \left\{ \prod_{r=1}^Q \begin{bmatrix} \cos \delta_r & \sin \delta_r/n_r \\ n_r \sin \delta_r & \cos \delta_r \end{bmatrix} \right\} \begin{bmatrix} 1 \\ n_m \end{bmatrix} \quad (46)$$

O desvio de fase é, neste caso, calculado a partir da seguinte expressão:

$$\delta_r = \frac{2\pi n_r d_r \cos \theta_r}{\lambda} \quad (47)$$

Quando o ângulo de incidência ( $\theta_0$ ) é conhecido, consegue-se determinar o valor de  $\theta_r$  recorrendo às leis de Snell:

$$n_0 \sin \theta_0 = n_r \sin \theta_r = n_m \sin \theta_m \quad (48)$$

Além disso, através da equação (46) é, ainda, possível calcular três características óticas fundamentais, que se relacionam entre si: a reflectância ( $R$ ), transmitância ( $T$ ) e absorvância ( $A$ ). É importante realçar que, para que as expressões seguintes sejam fisicamente corretas e coerentes, o meio incidente deve ser transparente e o substrato opaco:

$$R = \left( \frac{n_0 B - C}{n_0 B + C} \right) \left( \frac{n_0 B - C}{n_0 B + C} \right) \quad (49) \quad T = \frac{4n_0 \text{Re}(n_m)}{(n_0 B + C)(n_0 B + C)} \quad (50)$$

$$A = \frac{4n_0 \text{Re}(BC - n_m)}{(n_0 B + C)(n_0 B + C)} \quad (51)$$

A absorvância é um fenómeno que ocorre quando a luz incidente é convertida noutra forma de energia, normalmente em calor, no interior do filme fino, podendo-se relacionar com a reflectância e a transmitância segundo a seguinte expressão:

$$1 = R + T + A \quad (52)$$

A transmitância, por sua vez, consiste na razão entre a luz transmitida e a luz incidente num determinado substrato.

### 3.2 EXEMPLO DE FILTROS ÓTICOS COM MULTICAMADAS DE FILMES FINOS DIELECTRICOS

De seguida, serão apresentados alguns conceitos teóricos para a compreensão do funcionamento dos filtros óticos formados por filmes finos, assim como os cálculos necessários para o seu desenvolvimento na presença de multicamadas.

### 3.2.1 MATRIZ CARACTERÍSTICA PARA UMA ESPESSURA ÓTICA DE UM QUARTO OU METADE DO COMPRIMENTO DE ONDA

A matriz característica de um filme fino dielétrico (um filme com baixa radiação absorvida, permitindo a obtenção de uma reflectância praticamente complementar à transmitância e um melhor desempenho do filtro ótico) é simplificada quando a espessura ótica do mesmo é um quarto ( $\lambda/4$ ) ou metade ( $\lambda/2$ ) do comprimento de onda<sup>88</sup>, usado como referência para a projeção do filtro ótico, representado na estrutura da figura 6. Para estes casos particulares, o cálculo da matriz característica do filme fino, para uma luz incidente normal (ângulo de incidência igual a 0º), pode ser simplificado.

No primeiro caso, em que a espessura da camada é  $\lambda/4$ , considera-se que:

$$\delta = \frac{\pi}{2}, \quad \cos \delta = \cos \frac{\pi}{2} = 0 \quad e \quad \sin \delta = \sin \frac{\pi}{2} = 1$$

Assim, obtém-se a seguinte matriz característica:

$$\begin{bmatrix} \cos \delta & \sin \delta/n \\ n \sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 1/n \\ n & 0 \end{bmatrix} \quad (53)$$

Neste caso, a reflectância da estrutura será máxima ou mínima, dependendo do valor do índice de refração do filme fino ( $n$ ), isto é, depende apenas se o valor de  $n$  é maior ou menor que o valor do índice de refração do substrato.

No segundo caso, tendo a espessura da camada um  $\lambda/2$ , os valores das variáveis serão:

$$\delta = \pi, \quad \cos \delta = \cos \pi = -1 \quad e \quad \sin \delta = \sin \pi = 0$$

Pelo que, substituindo os valores, a matriz característica será:

$$\begin{bmatrix} \cos \delta & \sin \delta/n \\ n \sin \delta & \cos \delta \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \quad (54)$$

Neste caso, tratando-se de uma matriz unitária, o filme fino terá uma interferência nula na reflectância ou transmitância da estrutura.

### 3.2.2 DESENHO DE UM FILTRO ÓTICO BASEADO EM MULTICAMADA COM ESPESSURA ÓTICA DE UM QUARTO OU METADE DO COMPRIMENTO DE ONDA

A simplicidade dos cálculos das matrizes característica para estes casos particulares, especificados na secção anterior, permite que as estruturas de filmes finos sejam, normalmente, desenvolvidas utilizando camadas com  $\lambda/4$  e  $\lambda/2$  de espessura, recorrendo-se apenas a dois materiais distintos<sup>80</sup>. Na generalidade, neste tipo de representação, é convencional utilizar a letra *H* para referir as camadas com  $\lambda/4$  de espessura, constituídas pelo material com o maior índice de refração. Por outro lado, a letra *L* é utilizada comumente para desenhar as camadas com  $\lambda/4$  de espessura, formadas pelo material com menor índice de refração. Uma simbologia semelhante é utilizada para as camadas com  $\lambda/2$  de espessura, sendo *HH* ou *LL* quando se pretende referir as camadas com maior ou menor índice de refração<sup>56,82</sup>.

Assim, um exemplo de uma estrutura em multicamada de filmes finos, constituída por 9 camadas com espessuras  $\lambda/4$  e  $\lambda/2$ , pode ser representada através da seguinte forma: *LHLHLLHLL*. Considerando-se o ar como meio de incidência da luz e o vidro como substrato, é possível calcular a matriz característica das várias camadas ( $n_1$  representa o índice de refração mais elevado,  $n_2$  corresponde ao índice de refração mais baixo e  $n_m$  o índice de refração do substrato):

$$\begin{aligned} & \begin{bmatrix} 0 & 1/n_2 \\ n_2 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_1 \\ n_1 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_2 \\ n_2 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_1 \\ n_1 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_1 \\ n_1 & 0 \end{bmatrix} \\ & \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_2 \\ n_2 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_1 \\ n_1 & 0 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 0 & 1/n_2 \\ n_2 & 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \end{aligned} \quad (55)$$

Finalmente, a matriz característica da estrutura em multicamada de filmes finos será:

$$\begin{bmatrix} B \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 1 \\ n_m \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 \\ -n_m \end{bmatrix} \quad (56)$$

No exemplo anterior, assim como previamente referido, considerou-se como meio incidente o ar, com índice de refração ( $n_0$ ) de 1, e considerou-se como substrato o vidro, com índice de refração ( $n_m$ ) de 1,52. Desta forma, os valores de *B* e *C* serão, respetivamente, -1 e -1,52. A partir destes valores, e segundo a análise realizada nas

secções anteriores, pode calcular-se a reflectância e a transmitância da estrutura em multicamada do exemplo apresentado. Neste caso, como o substrato é constituído por vidro, não ocorre absorbância.

$$R = \left( \frac{n_0 B - C}{n_0 B + C} \right) \left( \frac{n_0 B - C}{n_0 B + C} \right) = \left( \frac{1 \times -1 + 1,52}{1 \times -1 - 1,52} \right) \left( \frac{1 \times -1 + 1,52}{1 \times -1 - 1,52} \right) = 0,0426 \quad (57)$$

$$T = 1 - R = 0,9574 \quad (58)$$

### 3.2.3 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE UM FILTRO ÓTICO BASEADO EM MULTICAMADA DE FILMES FINOS

Os filtros óticos passa-banda seleccionados são caracterizados por uma largura de banda estreita e tiram proveito das combinações construtivas e destrutivas da multicamada de filmes finos, sendo por isso possível a produção simultânea de bandas óticas de passagem e de rejeição. A estrutura em multicamada apresentada para os filtros óticos projetados é semelhante a uma estrutura de interferómetro *Fabry-Perot*, com um total de 11 camadas de materiais dielétricos<sup>1</sup>.

#### 3.2.3.1 ESTRUTURA EM MULTICAMADA

A figura 7 representa o esquema de um exemplo de uma estrutura de interferómetro *Fabry-Perot*, sendo caracterizada pela presença de dois espelhos, altamente refletivos, paralelos, separados por uma camada com espessura definida ( $d_r$ ), a cavidade de ressonância<sup>68</sup>.

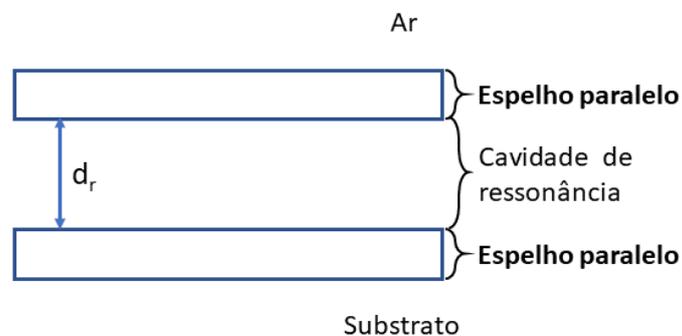


Figura 7: Representação esquemática de uma estrutura de interferómetro *Fabry-Perot*.

Os espelhos (ou refletores) paralelos podem ser implementados através de filmes metálicos ou dielétricos<sup>73</sup>. Neste caso, serão utilizados filmes constituídos por materiais dielétricos, uma vez que, ao apresentarem baixas taxas de energia por absorção, fazem com que a sua capacidade de reflectância seja praticamente complementar com a sua capacidade de transmitância. Desta forma, apesar de apresentarem um processo de fabrico mais complexo, os filmes dielétricos possibilitam a formação de filtros óticos passa-banda com melhor desempenho (elevada transmitância em comprimentos de onda específicos) em detrimento dos filmes metálicos<sup>73,78,90</sup>.

A figura 8 corresponde a uma estrutura de interferómetro de *Fabry-Perot* constituída por filmes dielétricos de dois materiais diferentes, alternadamente. Esta estrutura apresenta 11 camadas de filmes finos e representa a composição exemplo de um filtro ótico proposto. Segundo a literatura<sup>82,83,97</sup>, para se obterem filtros com elevado desempenho, o número de camadas deve ser 9 ou 11.

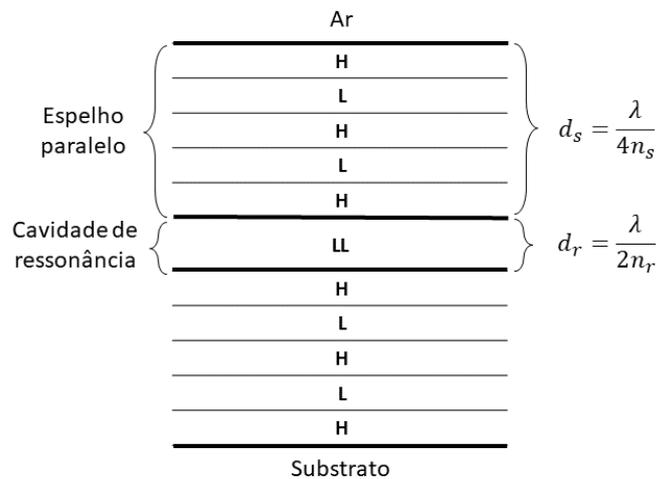


Figura 8: Representação esquemática de uma estrutura em multicamada de um filtro ótico.

No presente trabalho, após as simulações, apresentadas nos próximos capítulos, verificou-se que os filtros exibiam bom funcionamento com 11 camadas, pelo que cada espelho de espessura  $d_s$  irá ser constituído por 5 camadas de filmes finos dielétricos de materiais com elevado índice de refração ( $H$ ) e baixo índice de refração ( $L$ ), alternadamente, e a cavidade de ressonância, com espessura  $d_r$ , constituída por materiais com baixo índice de refração<sup>73</sup>.

Na cavidade de ressonância ocorre interferência de múltiplo feixe, como se pode observar na figura 9, o que vai permitir uma elevada capacidade de transmitância numa

largura de banda estreita de comprimentos de onda em torno do comprimento de onda central, que depende da espessura da cavidade de ressonância. Ainda na figura 9 é possível visualizar, de forma esquemática, todo o comportamento da luz à medida que atravessa as multicamadas de filmes finos.

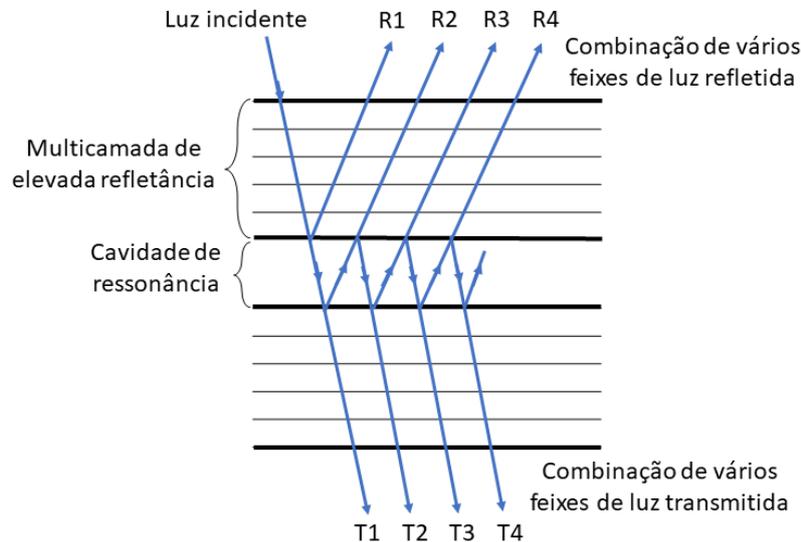


Figura 9: Representação esquemática do comportamento da luz incidente ao atravessar o filtro óptico multicamada.

Como se pode verificar através da figura 9, quando o feixe de luz incidente atinge a primeira superfície da cavidade de ressonância divide-se em dois: um feixe de luz, que é refletido ( $R1$ ), e o outro, que é transmitido para o interior da cavidade de ressonância. Este segundo feixe de luz irá alcançar a segunda superfície da cavidade e irá, por sua vez, ser dividido em dois: um feixe de luz transmitido ( $T1$ ) e outro refletido, que se direciona no sentido da primeira superfície da cavidade de ressonância ( $R2$ ). Este processo de sucessivas reflexões e transmissões repetir-se-á ao longo de toda a cavidade de ressonância, obtendo-se, no final, um total de luz refletida e de luz transmitida correspondente à soma dos feixes refletidos ( $R1+R2+R3+R4$ ) e dos feixes transmitidos ( $T1+T2+T3+T4$ ), respetivamente<sup>97,98</sup>.

O funcionamento da estrutura apresentada anteriormente, que será utilizada para a implementação de cada filtro óptico, rege-se segundo a equação:

$$\lambda q = 2n_r d_r \quad (59)$$

em que  $n_r$  e  $d_r$  representam o índice de refração e a espessura da cavidade de ressonância, respetivamente. Adicionalmente,  $\lambda$  corresponde ao comprimento de onda da luz transmitida e  $q$  à ordem de interferência do filtro. Neste caso, será considerado um filtro de primeira ordem ( $q=1$ ) com um ângulo de incidência da luz de  $0^\circ$ . A espessura de cada uma das camadas,  $d_s$ , que constitui os espelhos refletores paralelos, também pode ser calculada através de uma expressão semelhante à da equação (59):

$$\lambda = 4n_s d_s \quad (60)$$

em que  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz transmitida e  $n_s$  corresponde ao índice de refração do material que constitui a camada.

Os filtros óticos baseados neste tipo de estrutura são desenhados para que um determinado comprimento de onda adquira uma transmitância máxima no espectro ótico, estando esta característica relacionada essencialmente com a espessura da cavidade de ressonância ( $d_r$ ), ainda que as espessuras das camadas ( $d_s$ ) possam também influenciar<sup>99</sup>.

### 3.2.3.2 SELETIVIDADE DO FILTRO ÓTICO

Na caracterização de um filtro ótico, como já referido, é importante ter em consideração o parâmetro relativo à largura a meia altura, FWHM, que define a largura do pico de transmitância, quando a intensidade é metade do seu valor máximo. O cálculo da FWHM é realizado através da subtração do comprimento de onda à direita com o comprimento de onda à esquerda ( $\lambda_2 - \lambda_1$ ), quando a transmitância é metade do seu valor máximo em ambos os casos, como é possível verificar na figura 10.

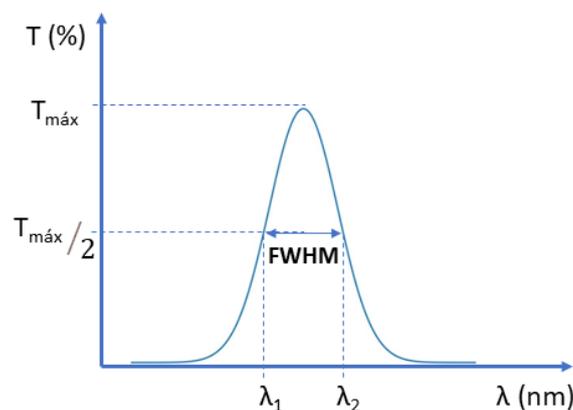


Figura 10: Gráfico representativo da FWHM de um filtro ótico.

Além disso, o valor da FWHM está diretamente relacionado com o número de camadas do filtro ótico, uma vez que quanto maior for o número de camadas da estrutura, menor será o valor da FWHM, mais estreita é a largura de banda dos comprimentos de onda e maior será a seletividade do filtro ótico. No entanto, quanto menor for o número de camadas do filtro ótico, mais simples e eficaz é o seu fabrico, pelo que tem que haver um compromisso entre o valor da FWHM e o número total de camadas de cada filtro<sup>56</sup>.

# **4 METODOLOGIA**

Neste capítulo, será apresentada a metodologia do trabalho desenvolvido, que sustenta a investigação realizada nesta dissertação. Desta forma, inicialmente, serão abordados os requisitos tomados como ponto de partida para a construção dos filtros óticos, baseados em multicamadas de filmes finos. De seguida, serão apresentadas técnicas de desenho e simulação computacional dos filtros óticos, em relação ao seu desempenho. Por fim, será explicada a metodologia e protocolo utilizados para um ensaio experimental preliminar, com o objetivo de demonstrar, tendo por base filtros óticos passa-banda pré-existentes no laboratório, o que se pretende obter com os filtros idealizados na aplicação pretendida de diagnóstico de malária.

## 4.1 DESENHO DOS FILTROS ÓTICOS BASEADOS EM FILMES FINOS

No trabalho realizado, foram propostos 16 filtros óticos passa-banda de largura de banda estreita, baseados em estruturas multicamada de filmes finos, centrados em diferentes comprimentos de onda do espectro ótico (selecionados de acordo com a figura 2 presente na secção 2.2.2). Nesta secção, será estudada a estrutura selecionada para a idealização dos filtros óticos, assim como identificados os materiais que a constituem.

### 4.1.1 PROJETO DOS FILTROS ÓTICOS

Os 16 filtros óticos, baseados em multicamadas de filmes finos, foram desenhados segundo a estrutura de interferómetro *Fabry-Perot* (analisada na secção 3.2.3), contendo 11 camadas de materiais dielétricos com índice de refração elevado e baixo, alternadamente, e centrados em comprimentos de onda específicos. Considerando os requisitos supramencionados, os comprimentos de onda selecionados foram 400, 435, 520, 590, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 700, 720, 740 e 800 nm. Idealmente, para cada um destes valores, o seu espectro ótico apresentará o pico de transmitância com o maior valor possível (pelo menos o dobro da intensidade de qualquer pico de ruído que possa existir no espectro em análise) e uma FWHM menor que 10. Neste sentido, é necessário proceder ao estudo do melhor desenho, que permitirá obter estas características no filtro ótico, para isso as espessuras de cada camada e os índices de refração dos materiais serão alterados conforme o filtro ótico projetado.

4.1.1.1 SELEÇÃO DOS MATERIAIS

A estrutura em multicamada selecionada requer, como abordado extensamente no capítulo 3, que as camadas sejam constituídas por filmes finos formados por dois materiais dielétricos diferentes, uma vez que produzem elevadas taxas de transmitância e baixas perdas por absorção.

Desta forma, procedeu-se à escolha dos dois materiais, um com índice de refração elevado e outro com índice de refração baixo, como referido nas secções teóricas. Para o efeito, optou-se pelo dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ), como material com índice de refração baixo, e pelo dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), como material com índice de refração elevado. Esta seleção deve-se às características vantajosas que apresentam estes materiais, a saber: são duros, tornando-se extremamente difíceis de serem removidos do substrato após a sua deposição; apresentam, na zona espectral de interesse, boas propriedades; têm elevada compatibilidade com o processo de fabrico CMOS e são comumente depositados por IBD (do inglês *Ion Beam Deposition*), um processo usado no fabrico de filtros óticos. Individualmente, o  $\text{SiO}_2$  foi escolhido porque apresenta uma dependência, praticamente constante, do índice de refração, na gama visível do espectro ótico de luz. O  $\text{TiO}_2$  foi escolhido por apresentar uma maior facilidade de fabrico, visto que o seu processo de deposição se encontra bem caracterizado<sup>100</sup>. A figura 11 representa a estrutura final selecionada para a construção e projeção de cada filtro ótico, centrado no comprimento de onda específico mencionado.

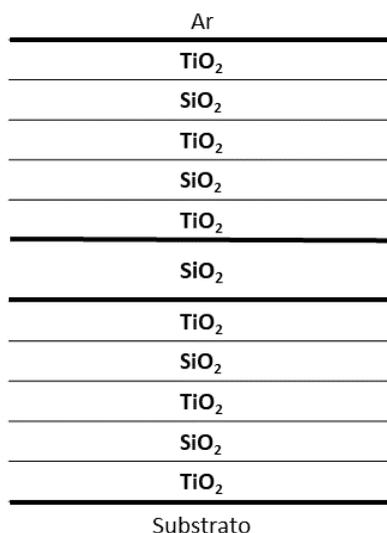


Figura 11 - Representação esquemática da estrutura em multicamada de um filtro ótico, baseado no interferómetro de Fabry-Perot, constituído por 11 camadas alternadas de  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ .

## 4.2 SIMULAÇÃO DE FILTROS ÓTICOS DE FILMES FINOS

No sentido de averiguar a eficácia dos 16 filtros óticos projetados, recorreu-se ao *software TFCalc 3.5*, utilizado para proceder ao desenho e simulação computacional perante diferentes modificações nos materiais. As simulações permitem identificar a espessura que as camadas de cada filtro devem adquirir para que a transmitância ótica seja a maior possível e a FWHM o mais próximo de 10. Assim, foram realizados três tipos de simulações: na primeira, utilizaram-se índices de refração da base de dados de *Sopra S.A.*, considerados como ideais para os materiais selecionados; na segunda, usaram-se índices de refração considerados próximos dos seus valores reais de fabrico, considerando a base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup> e, na terceira, utilizaram-se índices de refração para os materiais, medidos de acordo com a espessura projetada para cada uma das camadas, e de acordo com trabalho prévio de Pimenta et al.<sup>82</sup>.

### 4.2.1 SOFTWARE DE SIMULAÇÃO TFCALC 3.5

Os 16 filtros óticos foram desenhados e simulados computacionalmente, utilizando o *software TFCalc 3.5*, baseado em métodos de elementos finitos, fornecido pela *Software Spectra Inc*<sup>102</sup>. O *software* em questão foi desenvolvido especialmente para os cálculos óticos pretendidos e caracterizados na secção teórica desta dissertação. O principal objetivo destas simulações é utilizar técnicas de otimização computacional que partem de uma estrutura grosseira em direção a uma estrutura melhorada, através da variação dos diversos parâmetros existentes<sup>56</sup>. Para o estudo e compreensão das etapas a concretizar na realização de todas as simulações recorreu-se ao manual de instruções de utilização do referido *software*<sup>103</sup>.

De forma a otimizar o projeto e os futuros processos de fabrico, os 16 filtros foram divididos em três regiões espectrais: ultravioleta/visível (UV/VIS), dos 400 nm aos 435 nm; visível (VIS), dos 520 nm aos 620 nm e visível/infravermelho (VIS/IR), dos 620 nm aos 800 nm. Deste modo, é possível centrar os filtros óticos em diferentes bandas espectrais, ajustando apenas a espessura da cavidade de ressonância de SiO<sub>2</sub>. As espessuras das restantes camadas de filmes finos, em ambos os espelhos, são mantidas

iguais. A figura 12 corresponde à janela inicial do programa, que surge com os parâmetros a definir para o ambiente de simulação.

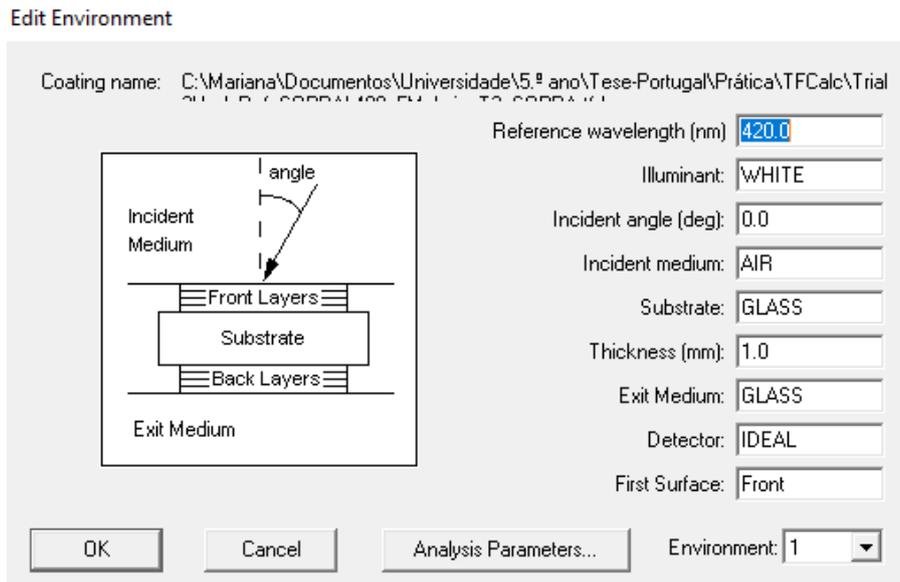


Figura 12: Janela de definição de parâmetros iniciais, no TFCalc 3.5.

Para todas as simulações, são indicadas as propriedades que influenciam a resposta ótica dos filtros. No presente trabalho, o material escolhido para o substrato e para o meio de saída é o vidro e, por sua vez, o material selecionado para o meio incidente é o ar. Além disso, são definidos comprimentos de onda de referência para cada uma das regiões espectrais supramencionadas: 420 nm para a região UV/VIS; 550 nm para a região VIS e 680 nm para a região VIS/IR. Para todas as simulações apresentadas, nas secções seguintes, as variáveis supracitadas mantêm-se fixas, sendo que os únicos parâmetros de entrada que são alterados são os diferentes índices de refração, em análise, de cada material ( $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ ).

#### 4.2.2 ÍNDICES DE REFRAÇÃO IDEAIS

Nas primeiras simulações realizadas, utilizaram-se os índices de refração da base de dados de *Sopra S.A.*, dado que são considerados os valores ideais para ambos os materiais ( $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ ) e dependem apenas do comprimento de onda ótico para o qual o filtro ótico é projetado. A empresa *Sopra S.A.* (França) disponibilizou o acesso a esta base de dados ótica, assim como à conversão destes valores para o formato do *software TFCalc*. Deste modo, os índices de refração de *Sopra S.A.* encontram-se pré-definidos no

programa e são gerados automaticamente, quando se introduz o comprimento de onda para o qual se pretende projetar o filtro ótico. Na tabela 1, estão identificados os valores dos índices de refração usados para o projeto e simulação de cada filtro ótico.

Tabela 1: Índices de refração dos materiais retirados da base de dados de Sopra S.A.

Comprimento de onda (nm)	Índices de refração (n)	
	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>
400	1,4701	3,2860
435	1,4668	3,2192
520	1,4613	3
590	1,4584	2,91
610	1,4577	2,8893
620	1,4574	2,88
630	1,4571	2,8750
640	1,4568	2,87
650	1,4565	2,86
660	1,4563	2,85
670	1,456	2,8443
680	1,4558	2,84
700	1,4553	2,83
720	1,4549	2,82
740	1,4544	2,81
800	1,4533	2,79

Posteriormente, procedeu-se à simulação de cada filtro ótico. A tabela 2 apresenta a combinação das espessuras de cada camada, que constituem os 16 filtros óticos desenhados no *TFCalc*. Os valores das espessuras estão otimizados de forma a que a transmitância resultante, associada a cada comprimento de onda, seja a maior possível.

Desta forma, na tabela que se segue, observa-se que os filtros óticos passa-banda dividem-se em quatro conjuntos para as diferentes gamas de comprimentos de onda: os 400 nm e os 435 nm; entre os 520 nm e os 620 nm; entre os 630 nm e os 720 nm e os 740 nm e os 800 nm. Em cada uma destas quatro regiões, verifica-se que as espessuras das camadas constituintes dos espelhos refletor são simetricamente iguais, isto é, cada um dos espelhos é formado por 5 camadas alternadas de SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>, em que as camadas com o mesmo material apresentam igual espessura. Por exemplo, para o comprimento de onda 400 nm, as espessuras das camadas de TiO<sub>2</sub> são 33 nm, enquanto que as espessuras de SiO<sub>2</sub> são 73 nm.

Tabela 2: Filtros óticos nas regiões UV/VIS, VIS, VIS/IR e respetiva espessura das camadas, constituídas por SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> com índices de refração ideais (Sopra S.A.).

Pico de transmitância máxima por $\lambda$ (nm)																
	400	435	520	590	610	620	630	640	650	660	670	680	700	720	740	800
	Espessura da camada (nm)															
TiO <sub>2</sub>	33		46				60						70			
SiO <sub>2</sub>	73		94				117						121			
TiO <sub>2</sub>	33		46				60						70			
SiO <sub>2</sub>	73		94				117						121			
TiO <sub>2</sub>	33		46				60						70			
<b>SiO<sub>2</sub> (RC)</b>	<b>127</b>	<b>151</b>	<b>168</b>	<b>219</b>	<b>235</b>	<b>243</b>	<b>196</b>	<b>204</b>	<b>211</b>	<b>219</b>	<b>226</b>	<b>233</b>	<b>247</b>	<b>262</b>	<b>248</b>	<b>291</b>
TiO <sub>2</sub>	33		46				60						70			
SiO <sub>2</sub>	73		94				117						121			
TiO <sub>2</sub>	33		46				60						70			
SiO <sub>2</sub>	73		94				117						121			
TiO <sub>2</sub>	33		46				60						70			

Por outro lado, a espessura da camada da cavidade de ressonância é diferente para todos os comprimentos de onda em análise. A semelhança nos valores das espessuras das camadas facilita o desenho das máscaras no processo de fabrico dos filtros óticos, baseados em filmes finos.

Salienta-se que, assim como verificado nesta simulação, para todas as seguintes, os 16 comprimentos de onda estão divididos em quatro regiões; os espelhos refletorres apresentam simetria entre si e as espessuras das cavidades de ressonância são sempre diferentes em todos os comprimentos de onda. Esta última característica surge porque o ajuste da espessura da cavidade de ressonância permite a obtenção de uma transmitância mais elevada.

#### 4.2.3 APROXIMAÇÃO DOS ÍNDICES DE REFRAÇÃO AOS VALORES REAIS

As simulações que se seguem são semelhantes às anteriores, no entanto os índices de refração dos materiais, que constituem as camadas dos 16 filtros óticos, são alterados para valores considerados próximos dos reais. Desta forma, recorreu-se à base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup> para recolher estes valores, segundo cada comprimento de onda

e material em análise, apresentado na tabela 3. Estes dados são considerados próximos dos valores reais que se obtêm quando se procede ao fabrico dos filtros óticos.

Tabela 3: Índices de refração dos materiais retirados da base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup>.

Comprimento de onda (nm)	Índices de refração (n)	
	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>
400	1,4841	2,3379
435	1,481	2,2690
520	1,4759	2,1824
590	1,4733	2,1456
610	1,4727	2,1379
620	1,4724	2,1344
630	1,4722	2,1311
640	1,4719	2,128
650	1,4717	2,1251
660	1,4715	2,1223
670	1,4713	2,1197
680	1,4711	2,1172
700	1,4707	2,1126
720	1,4703	2,1084
740	1,47	2,1046
800	1,4692	2,0951

Assim, a tabela 4 representa a configuração resultante das novas simulações dos 16 filtros óticos, baseados em filmes finos. De acordo com o referido na secção anterior, para cada uma das quatro regiões, as camadas dos espelhos refletores assumem valores iguais, enquanto que a cavidade de ressonância é diferente em todos os comprimentos de onda.

Em comparação com a tabela 2, na tabela 4 verifica-se que as camadas constituídas por TiO<sub>2</sub> aumentam de espessura para todos os comprimentos de onda. Da mesma forma, a espessura das camadas formadas por SiO<sub>2</sub> também aumenta nos comprimentos de onda da segunda região, apesar do aumento ser pouco significativo. Por outro lado, na primeira região (400 nm e 435 nm), as espessuras mantêm-se iguais e, nas duas últimas regiões, as espessuras das camadas diminuem ligeiramente. É de realçar que os valores da espessura obtidos são seleccionados para que a transmitância seja a maior possível e a FWHM próximo de 10, em todos os filtros óticos.

Tabela 4: Filtros óticos nas regiões UV/VIS, VIS, VIS/IR e respetiva espessura das camadas, constituídas por SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> com índices de refração próximos dos reais (refractiveindex.info<sup>101</sup>).

Pico de transmitância máxima por $\lambda$ (nm)																
	400	435	520	590	610	620	630	640	650	660	670	680	700	720	740	800
	Espessura da camada (nm)															
TiO <sub>2</sub>	44		64				78						96			
SiO <sub>2</sub>	73		98				114						120			
TiO <sub>2</sub>	44		64				78						96			
SiO <sub>2</sub>	73		98				114						120			
TiO <sub>2</sub>	44		64				78						96			
<b>SiO<sub>2</sub> (RC)</b>	<b>125</b>	<b>159</b>	<b>149</b>	<b>218</b>	<b>238</b>	<b>248</b>	<b>192</b>	<b>201</b>	<b>211</b>	<b>218</b>	<b>231</b>	<b>240</b>	<b>260</b>	<b>280</b>	<b>234</b>	<b>293</b>
TiO <sub>2</sub>	44		64				78						96			
SiO <sub>2</sub>	73		98				114						120			
TiO <sub>2</sub>	44		64				78						96			
SiO <sub>2</sub>	73		98				114						120			
TiO <sub>2</sub>	44		64				78						96			

#### 4.2.4 IMPACTO DAS ESPESSURAS DAS CAMADAS NOS ÍNDICES DE REFRAÇÃO DOS MATERIAIS

O desenho dos 16 filtros óticos baseados em filmes finos, que será apresentado de seguida, foi realizado com o intuito de averiguar o comportamento dos filtros simulados quando o índice de refração varia com a espessura da camada. Assim, neste conjunto de simulações, utilizaram-se os índices de refração presentes na tabela 5, tendo sido obtidos através da interpolação dos dados facultados pela investigação experimental de Pimenta et al. (2016)<sup>82</sup>.

Para a obtenção dos índices de refração pretendidos, segundo os comprimentos de onda e as espessuras das camadas específicas em análise, foi necessário o cálculo da interpolação dos valores medidos experimentalmente. Isto deve-se ao facto de a investigação em causa apresentar características óticas diferentes, nomeadamente ao nível das espessuras das camadas e dos comprimentos de onda selecionados.

Tabela 5: Índices de refração dos materiais, calculados por interpolação dos dados de Pimenta et al. (2016)<sup>82</sup>, para cada espessura das camadas que constituem os filtros óticos e cada comprimento de onda específico.

Comprimento de onda (nm)	Índices de refração							
	SiO <sub>2</sub>				TiO <sub>2</sub>			
	Espessura (nm)				Espessura (nm)			
	73	94	115	120	44	58	70	90
400	1,4752	1,4884	1,5016	1,5048	2,6185	2,6643	2,7037	2,7692
435	1,4761	1,4874	1,4987	1,5014	2,5581	2,5999	2,6358	2,6955
520	1,4775	1,4858	1,4940	1,4959	2,4590	2,4946	2,5251	2,5760
590	1,4783	1,4849	1,4915	1,4931	2,4076	2,4402	2,4681	2,5146
610	1,4784	1,4847	1,4909	1,4924	2,3961	2,4280	2,4553	2,5009
620	1,4785	1,4846	1,4907	1,4921	2,3907	2,4223	2,4494	2,4944
630	1,4786	1,4845	1,4904	1,4918	2,3856	2,4169	2,4438	2,4885
640	1,4789	1,4846	1,4902	1,4916	2,3808	2,4118	2,4385	2,4828
650	1,4787	1,4844	1,4900	1,4913	2,3761	2,4069	2,4333	2,4773
660	1,4788	1,4843	1,4898	1,4911	2,3717	2,4022	2,4284	2,4721
670	1,4788	1,4842	1,4895	1,4908	2,3674	2,3978	2,4238	2,4671
680	1,4789	1,4842	1,4894	1,4906	2,3634	2,3935	2,4193	2,4623
700	1,4792	1,4841	1,4890	1,4902	2,3558	2,3855	2,4110	2,4534
720	1,4792	1,484	1,4887	1,4898	2,3489	2,3782	2,4033	2,4452
740	1,4792	1,4838	1,4883	1,4894	2,3425	2,3715	2,3963	2,4377
800	1,4797	1,4836	1,4876	1,4885	2,3261	2,3542	2,3783	2,4185

Deste modo, como se pode observar a partir da tabela 5, os índices de refração obtidos, para ambos os materiais (SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>), aumentam com o aumento da espessura, contudo diminuem ao longo dos comprimentos de onda selecionados (desde 400 nm a 800 nm). No caso do SiO<sub>2</sub>, por exemplo, verifica-se que, na espessura 73 nm, os índices de refração são aproximadamente 1,47, com uma variação na ordem da terceira casa decimal. Por outro lado, quando a espessura é 120 nm, o índice de refração aumenta para valores próximos de 1,5, diminuindo na ordem da primeira casa decimal ao longo dos comprimentos de onda. O mesmo pode ser observado para o material TiO<sub>2</sub>, sendo que na espessura de 44 nm os índices de refração variam entre 2,6 e 2,3 e na espessura de 90 nm os índices de refração variam entre 2,7 e 2,4.

Na tabela 6 está representada a estrutura dos 16 filtros óticos, podendo-se visualizar os valores das espessuras das camadas para cada comprimento de onda, no sentido de se obter o melhor desempenho possível em cada caso (máxima transmitância e FWHM próximo de 10).

Tabela 6: Filtros óticos nas regiões UV/VIS, VIS, VIS/IR e respetiva espessura das camadas, constituídas por SiO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> com índices de refração experimentais retirados de Pimenta et al. (2016)<sup>82</sup>.

Pico de transmitância máxima por $\lambda$ (nm)																
	400	435	520	590	610	620	630	640	650	660	670	680	700	720	740	800
	Espessura da camada (nm)															
TiO <sub>2</sub>	44		58				70						90			
SiO <sub>2</sub>	73		94				115						120			
TiO <sub>2</sub>	44		58				70						90			
SiO <sub>2</sub>	73		94				115						120			
TiO <sub>2</sub>	44		58				70						90			
<b>SiO<sub>2</sub> (RC)</b>	<b>114</b>	<b>144</b>	<b>151</b>	<b>211</b>	<b>229</b>	<b>238</b>	<b>185</b>	<b>194</b>	<b>203</b>	<b>211</b>	<b>220</b>	<b>228</b>	<b>245</b>	<b>263</b>	<b>210</b>	<b>262</b>
TiO <sub>2</sub>	44		58				70						90			
SiO <sub>2</sub>	73		94				115						120			
TiO <sub>2</sub>	44		58				70						90			
SiO <sub>2</sub>	73		94				115						120			
TiO <sub>2</sub>	44		58				70						90			

Da mesma forma que nas simulações anteriores, esta simulação cumpre as características anteriormente referidas relativas às espessuras das camadas, isto é, os espelhos refletores apresentam valores iguais para cada região e as cavidades de ressonância valores diferentes para cada um dos filtros óticos. Em comparação com a tabela 4, na tabela 6 observa-se que as espessuras das camadas dos espelhos refletores se mantêm iguais nos comprimentos de onda 400 nm e 435 nm, em ambos os materiais, e nos comprimentos de onda 740 nm e 800 nm, para o material SiO<sub>2</sub>. Relativamente às restantes camadas, quando o material é TiO<sub>2</sub>, verificou-se uma diminuição para a segunda, terceira e quarta região. Quando o material é SiO<sub>2</sub>, constata-se uma diminuição nas camadas da segunda região e um aumento nas camadas da terceira região.

### 4.3 ENSAIOS EXPERIMENTAIS PARA CARACTERIZAÇÃO DE FILTROS ÓTICOS

Na impossibilidade de depositar os filmes finos necessários ao fabrico dos filtros óticos simulados, e com o objetivo de verificar as configurações e propriedades dos 16 filtros

óticos baseados em filmes finos simulados na secção 4.2, procedeu-se à realização de ensaios experimentais com filtros óticos passa-banda baseados em filmes finos, para gamas de comprimentos de onda semelhantes aos utilizados em simulação, e já existentes no laboratório CMEMS. Os filtros óticos passa-banda utilizados foram previamente fabricados pelo grupo de investigação, no decorrer do trabalho de investigação de Pimenta et al.<sup>82</sup>. O trabalho em questão tratava-se de uma aplicação diferente, com comprimentos de onda também diferentes, pelo que somente 8 dos filtros óticos fabricados, durante o trabalho em questão, foram seleccionados para caracterização, uma vez que apresentavam bandas espectrais centradas em comprimentos de onda com valores próximos dos seleccionados para este projeto (secção 2.2.2). Assim, os 8 filtros óticos utilizados estão centrados nos seguintes comprimentos de onda: 397 nm, 419 nm, 516 nm, 585 nm, 603 nm, 649 nm, 701 nm e 746 nm. Além disso, foram utilizados diversos conjuntos de filtros passa-alto e passa-baixo comerciais (*Edmund Optics* e *Thorlabs*) para filtrar o sinal no espectro de luz ótica de forma a se obter, no espectro resultante de cada filtro ótico, apenas o pico central de transmitância do filtro (que se pretende analisar), evitando assim a presença de ruído nas gamas espectrais restantes. A figura 13 (a) apresenta fotografias de alguns dos filtros óticos passa-banda utilizados, baseados em filmes finos, centrados nos comprimentos de onda de 419 nm, 585 nm e 603 nm. A figura 13 (b) contém os filtros comerciais passa-alto de 370 nm, 550 nm e 600 nm, assim como o filtro passa-baixo de 500 nm, utilizados nos ensaios experimentais.

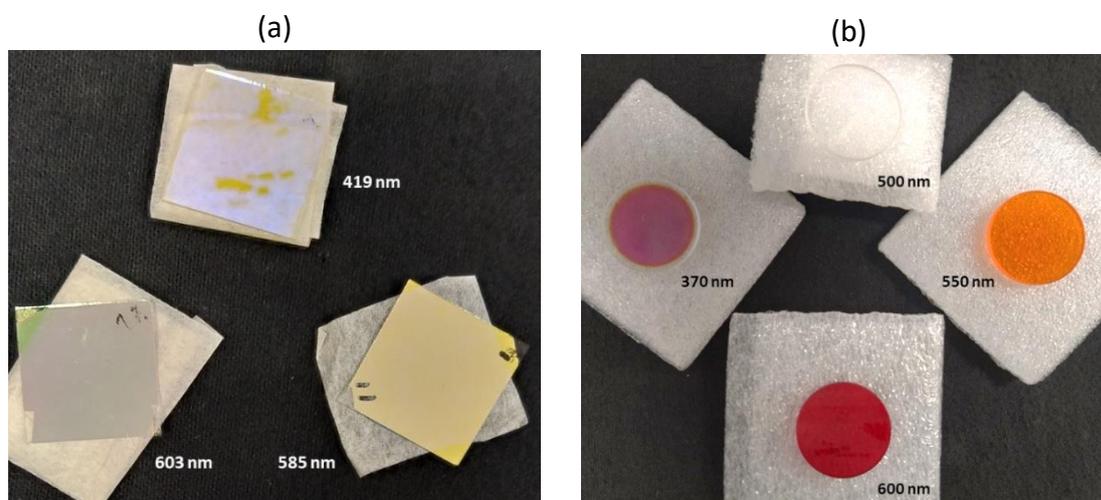


Figura 13: Fotografias de alguns dos filtros óticos utilizados nos ensaios experimentais. (a) filtros óticos passa-banda, baseados em filmes finos, centrados nos comprimentos de onda de 419 nm, 585 nm e 603 nm; (b) filtros comerciais passa-alto de 370 nm, 550 nm e 600 nm e filtro comercial passa-baixo de 500 nm.

### 4.3.1 SELEÇÃO E PREPARAÇÃO DOS 8 FILTROS ÓTICOS

Como referido anteriormente, foram selecionados 8 filtros óticos entre o conjunto de filtros disponíveis no laboratório do CMEMS, com bandas espectrais centradas em comprimentos de onda de interesse para o presente trabalho.

Na tabela 7 encontra-se a correspondência das bandas espectrais, onde ocorrem os picos máximos de transmitância ótica, entre os 8 filtros óticos experimentais selecionados e alguns dos filtros óticos simulados.

*Tabela 7: Correspondência entre os comprimentos de onda selecionados, onde ocorrem os picos de transmitância no espectro ótico, para os filtros óticos experimentais e os filtros óticos simulados.*

<b>Filtros óticos experimentais</b>	<b>Filtros óticos simulados</b>
397 nm	400 nm
419 nm	435 nm
516 nm	520 nm
585 nm	590 nm
603 nm	610 nm
649 nm	650 nm
701 nm	700 nm
746 nm	740 nm

Os espectros de transmitância dos 8 filtros óticos experimentalmente caracterizados apresentam picos de elevada transmitância fora da banda espectral de interesse, como será demonstrado no capítulo 5. Assim, foi necessário incluir na montagem experimental um conjunto de filtros passa-alto e passa-baixo para eliminar as interferências da transmissão da luz nessas regiões. Deste modo, os filtros passa-alto e passa-baixo vão limitar a passagem de luz nos comprimentos de onda menores e maiores que o seu comprimento de onda central, respetivamente. Por exemplo, no caso de se utilizar um filtro passa-alto a 500 nm, a transmissão de luz, no espectro de luz ótica, adquire valores próximos de zero para os comprimentos de onda menores que 500 nm (neste comprimento de onda, correspondente ao valor de corte, a transmissão será cerca de 70% da transmissão de luz máxima). No caso de um filtro passa-baixo a 500 nm, o mesmo irá acontecer, porém para os comprimentos de onda maiores do que 500 nm. Assim, através destes filtros, o sinal torna-se mais perceptível para a aplicação em questão, permitindo observar, apenas, o pico máximo de intensidade nos espectros óticos. A tabela 8, que se segue, exhibe o conjunto de filtros comerciais utilizados para

cada um dos comprimentos de onda a caracterizar, que permitem melhorar o desempenho de cada um dos 8 filtros óticos passa-banda de interesse.

Tabela 8: Comprimentos de onda limitantes de cada filtro passa-alto e passa-baixo, utilizados para filtrar o espectro ótico de transmitância cada filtro ótico experimental considerado.

Filtro ótico baseado em filmes finos (nm)	Valor de corte do filtro passa-alto usado (nm)	Valor de corte do filtro passa-baixo usado (nm)
397	370	450
		500
		600
419	370	450
		500
		600
516	480	650
585	500	650
603	550	650
649	600	700
701	600	800
746	600	800

#### 4.3.2 MONTAGEM EXPERIMENTAL

Para a caracterização espectral da transmitância dos 8 filtros óticos passa-banda, efetuada num dos laboratórios do CMEMS, da Universidade do Minho, foram consideradas duas montagens experimentais, com duas fontes de luz distintas: uma com uma fonte comercial de luz branca e uma com uma placa de circuito impresso (PCB, do inglês *Printed Circuit Board*) personalizada com um conjunto de díodos emissores de luz (LEDs, do inglês *Light Emitting Diodes*).

No primeiro caso, para a caracterização dos espectros de transmitância dos 8 filtros, recorreu-se a uma montagem ótica constituída por: uma fonte de luz halogênio de tungstênio de quartzo de 200 W (modelo 66881, *Oriel Newport*); um monocromador para efetuar o varrimento espectral da luz (modelo 74000, *Thermo Oriel instruments*); uma fibra ótica; um suporte para a colocação dos filtros óticos; um fotodíodo; um pico amperímetro (*Keithley 487*) e um computador para aquisição e análise dos dados, com o *software Spectronic 3.0*, desenvolvido em *LabView* no CMEMS. As figuras 14 e 15 correspondem, respetivamente, a uma representação esquemática e a uma fotografia de todo o *setup* experimental utilizado.



Figura 14: Representação esquemática do setup experimental.

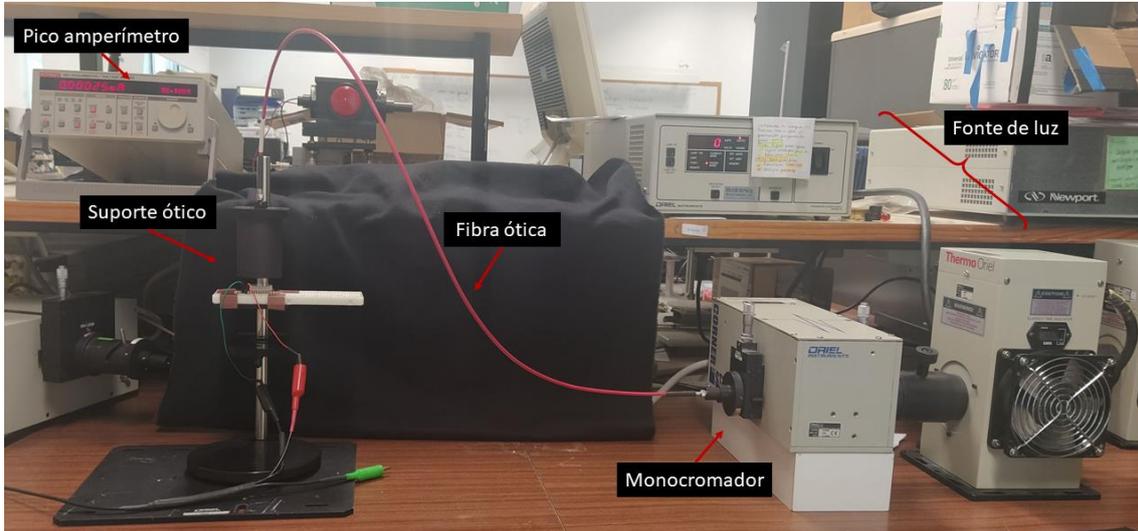


Figura 15: Fotografia do setup experimental quando é utilizada a fonte de luz branca nas medições de transmitância.

O *setup* experimental apresentado contém uma fonte de luz que vai emitir luz branca para o monocromador, onde ocorre a seleção e varrimento dos comprimentos de onda específicos<sup>84</sup>. De seguida, a fibra ótica transmitirá a luz desde o monocromador até ao suporte onde se encontram posicionados os filtros óticos. A luz entra pelo orifício superior do cilindro preto (figura 15) e atravessa o conjunto de filtros óticos (secção 4.3.1), que se encontram por cima de um fotodíodo. Deste modo, a luz é recebida pelo fotodíodo, que permite medir a intensidade dos componentes espectrais da luz transmitida em relação a um comprimento de onda específico (seleccionado por cada filtro ótico) e converte essa luz em corrente elétrica<sup>97</sup>. Esta corrente é medida pelo pico amperímetro e, finalmente, lida pelo *software Spectronic 3.0*, através do qual o espectro de transmitância ótica, resultante de cada conjunto de filtros que se pretende medir, é armazenado para, posteriormente, ser visualizado.

Após a caracterização da transmitância ótica dos 8 filtros, recorrendo à fonte de luz branca comercial, repetiu-se o processo de caracterização ótica dos filtros, mas agora recorrendo-se a uma alteração na montagem experimental, de modo a variar a fonte de

luz utilizada. O projeto em que esta dissertação se insere pretende a implementação dos filtros óticos num dispositivo automático e portátil para deteção de malária, para isso optou-se por efetuar também a caracterização da transmitância dos filtros óticos recorrendo a um protótipo preliminar de uma placa PCB miniaturizada para a emissão de luz. Assim, em substituição da fonte de luz branca, foi também utilizada uma placa PCB constituída por um conjunto de 13 LEDs (9 *LEDSW50*, 2 *LED405L* e 2 *LED800L*, todos da *Thorlabs*), que operam na gama do infravermelho, do visível e do ultravioleta. As figuras 16 (a) e (b) correspondem, respetivamente, a uma fotografia da placa impressa com os 13 LEDs, e à representação esquemática do circuito de atuação da mesma placa.

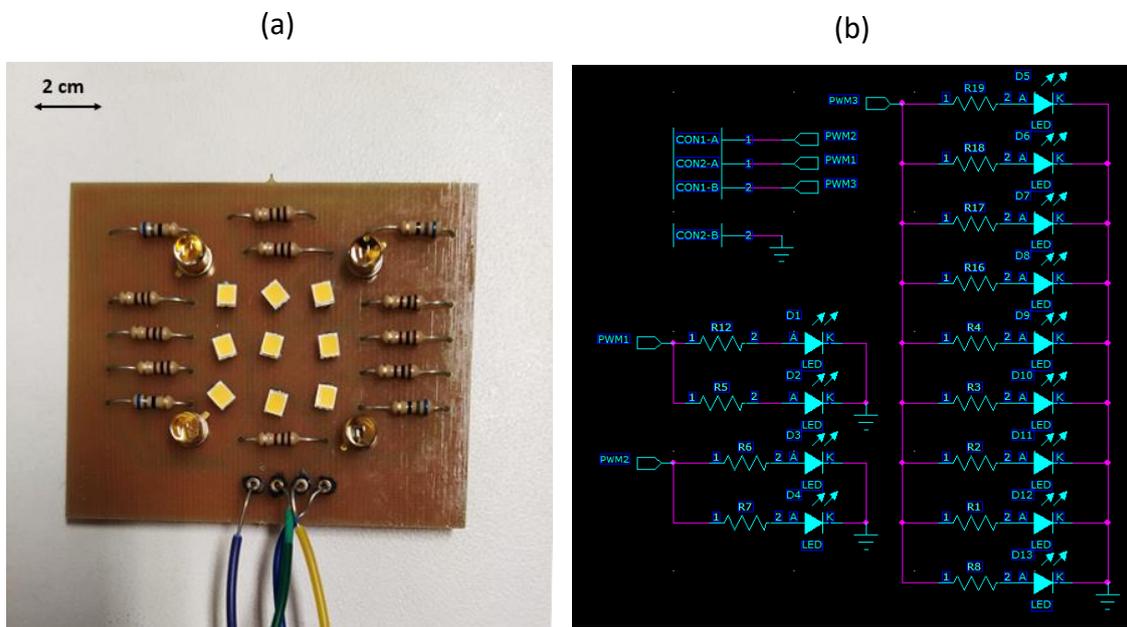


Figura 16: (a) Fotografia da placa PBC para a atuação dos 13 LEDs; (b) Representação esquemática do circuito impresso na placa PBC.

A placa impressa em PCB é constituída pelos 13 LEDs e o mesmo número de resistências, assim como conectores para a ligação de fios. Os LEDs distinguem-se da seguinte forma: nas extremidades existem 4 LEDs *dual in line package* (DIP), dois com um pico de emissão no comprimento de onda de 405 nm e os outros dois com um pico de emissão no comprimento de onda de 800 nm; no centro encontra-se o conjunto dos 9 LEDs em tecnologia de montagem superficial (SMD, do inglês *surface-mount device*) que emitem na zona do visível, na gama espectral entre 425 nm e 725 nm. A placa é ligada a um microcontrolador Arduino (*ATMEGA2560*), por sua vez conectado a um computador com o software *Arduino IDE* (do inglês *Arduino Integrated Development Environment*).

A placa é alimentada e controlada através do *software*, por meio de uma onda modulada por largura de pulso (PWM, do inglês *Pulse Width Modulation*), que varia entre 0 e 5 V, com uma frequência de 490 Hz e com *duty cycle* variável.

Para a leitura dos espectros de transmitância, recorrendo a esta fonte, utilizou-se o *setup*, presente na figura 17, que é constituído por: placa PCB com o conjunto de LEDs; um *Arduíno*; um suporte para a colocação dos filtros óticos; uma fibra ótica; um espectrofotómetro *AvaSpec-ULS2048XL EVO (Avantes)*, com monocromador e detetor integrado, e um computador com os *softwares AvaSoft 8.11* e *Arduino IDE*.

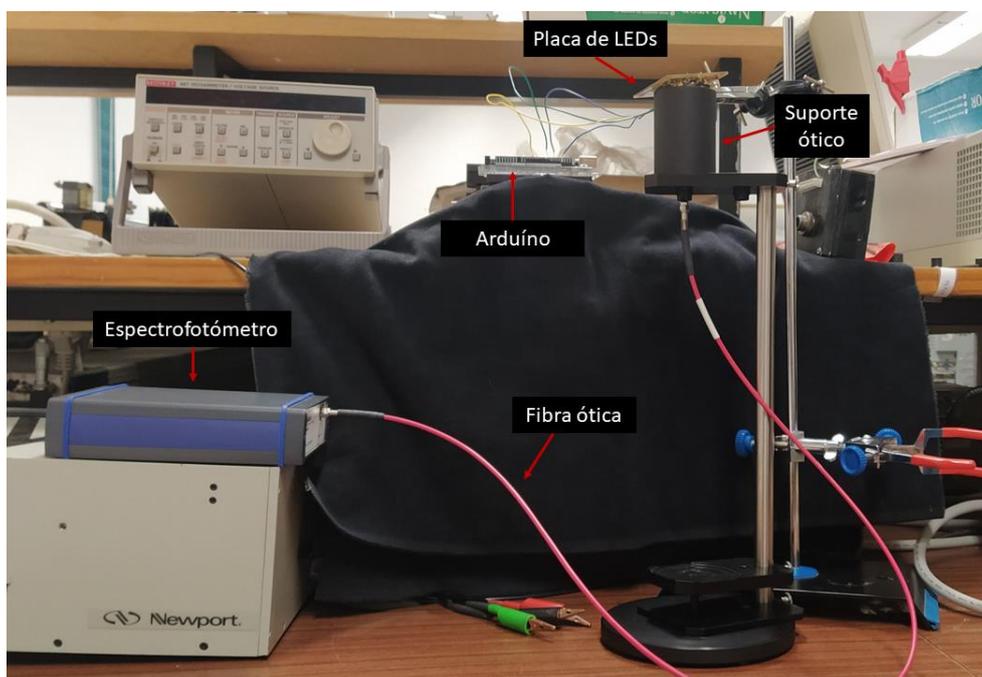


Figura 17: Fotografia do *setup* experimental quando é utilizada como fonte de luz uma placa PCB com um conjunto de 13 LEDs.

Na montagem representada, a placa de LEDs é colocada na parte superior do cilindro preto do suporte ótico, permitindo que a luz incida sobre o conjunto dos filtros óticos, colocados numa placa de suporte na parte inferior deste mesmo cilindro. A fibra ótica é conectada à placa onde se encontram os filtros óticos, possibilitando a entrada da luz transmitida. De seguida, esta luz é encaminhada pela fibra ótica até ao espectrofotómetro, com monocromador interno, onde a luz transmitida é medida em cada comprimento de onda do espectro. O espectrofotómetro, através de uma conexão USB, envia a informação adquirida ao *software AvaSoft 8.11*, onde é possível visualizar os espectros de transmitância.

# **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nesta secção apresentam-se, tanto os resultados obtidos nas simulações dos 16 filtros óticos, baseados em filmes finos, como os resultados dos ensaios laboratoriais dos 8 filtros óticos experimentais. Além disso, será realizada uma análise e discussão destes resultados. Finalmente, serão apresentados exemplos da influência dos filtros óticos no espectro de reflectância dos parasitas da malária, discutindo o potencial dos mesmos para esta aplicação.

## 5.1 SIMULAÇÕES DOS 16 FILTROS ÓTICOS BASEADOS EM FILMES FINOS

De seguida, apresentam-se os principais resultados obtidos nas simulações dos 16 filtros óticos para os três diferentes grupos de índices de refração utilizados, descritos no capítulo anterior. O desempenho dos 16 filtros óticos, obtido das simulações no *TFCalc*, pode ser analisado através dos seus espectros de transmitância ótica. Cada gráfico resultante (figuras 18, 19 e 20) apresenta os picos de máxima transmitância ótica nos comprimentos de onda seleccionados (secção 2.2.2) e para os quais os filtros foram desenhados, com um valor de FWHM específico.

A figura 18 representa os espectros de transmitância ótica dos 16 filtros óticos de largura de banda estreita, quando os índices de refração de *Sopra S.A.* foram considerados para a realização das simulações.

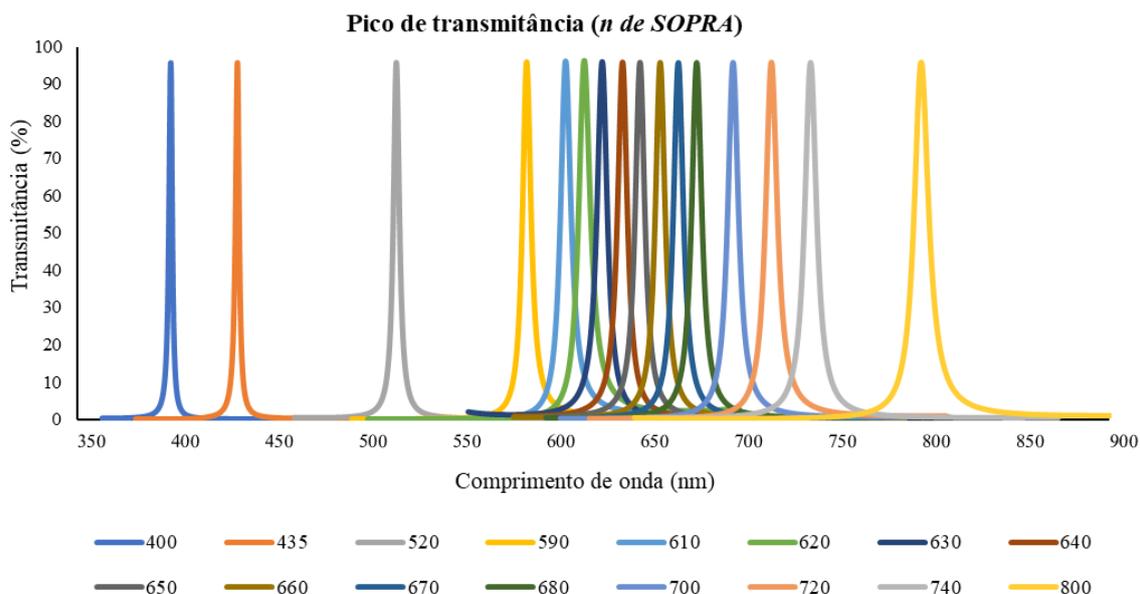


Figura 18: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para a matriz de 16 filtros óticos (representação estrutural na tabela 2), utilizando os índices de refração da base de dados Sopra S.A..

As percentagens dos picos de máxima transmitância são elevadas (valores próximos de 100%) e as FWHM são baixas (menores que 10 nm, como se pode observar na figura 21 e na tabela 9 do anexo 1), o que permite aferir que estas simulações apresentam resultados considerados como ideais para o desempenho dos filtros óticos pretendidos. No entanto, uma vez que se baseiam em valores de índices de refração ideais, que não têm em conta os desvios de fabricação nem o efeito das espessuras das camadas, os espectros resultantes não refletem a realidade na sua totalidade, isto é, não são uma aproximação real do comportamento que os filtros apresentarão aquando do seu fabrico.

A figura 19 representa os espectros de transmitância ótica dos 16 filtros óticos, quando é considerada a base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup> para os índices de refração utilizados nas simulações. Comparativamente com os resultados anteriores (figura 18), os espectros dos filtros óticos nestas simulações apresentam uma ligeira diminuição na percentagem do pico de máxima transmitância ótica (entre 90% a 100%) e uma FWHM significativamente mais elevada, sendo em todos os casos superior a 10 nm, como se observa na figura 21 (ver também anexo 1). Apesar do desempenho dos filtros óticos simulados não corresponder ao ideal (segundo a abordagem teórica do capítulo 3), estes resultados são os que mais se aproximam da realidade e são os que melhor descrevem o comportamento dos materiais, pelo que serão fundamentais numa fase de microfabricação.

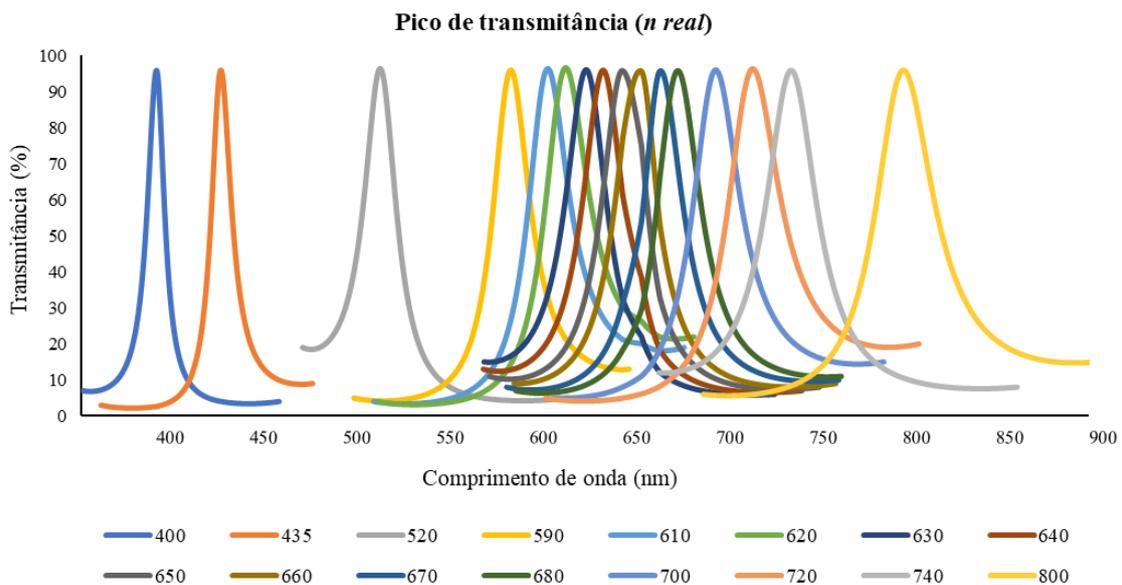


Figura 19: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para a matriz de 16 filtros óticos (representação estrutural na tabela 4), utilizando os índices de refração da base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup>.

A figura 20 ilustra os espectros de transmitância ótica dos 16 filtros óticos, quando são considerados os índices de refração dos materiais dos filmes finos, calculados a partir das espessuras das suas camadas. Este gráfico, quando comparado com o da figura 19, apresenta melhores resultados ao nível da FWHM, como se observa na figura 21 (e no anexo 1), uma vez que os seus valores são menores e mais próximos do valor ideal de referência (10 nm). Relativamente aos picos de máxima transmitância ótica, os seus intervalos de valores são semelhantes, mantendo-se entre os 90% e os 100%.

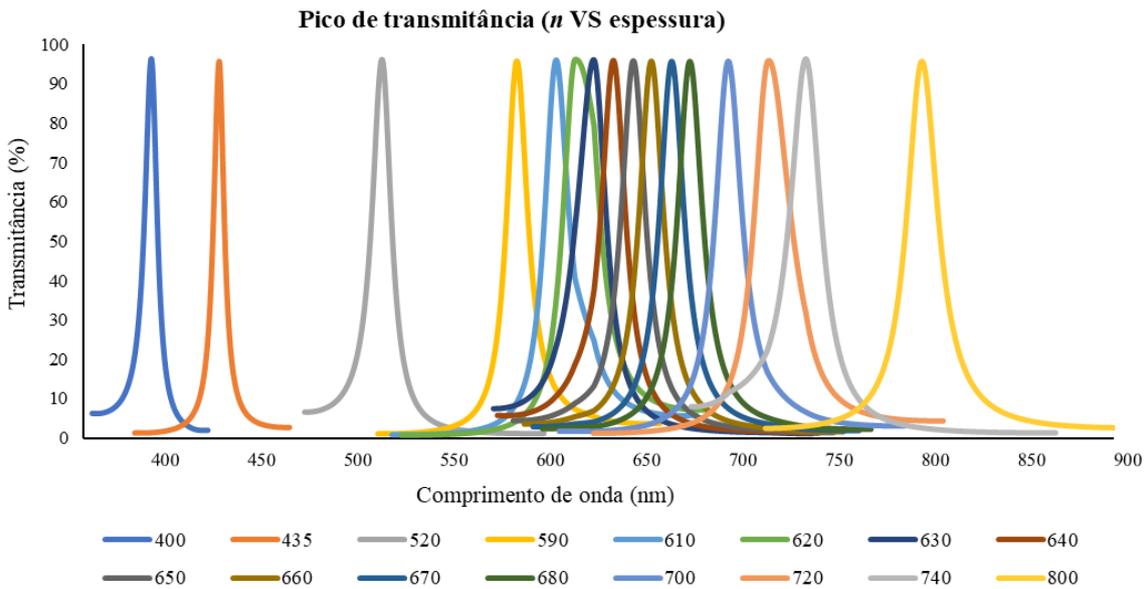


Figura 20: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda, para a matriz de 16 filtros óticos (representação estrutural na tabela 6), utilizando os índices de refração do grupo de investigação Pimenta et al<sup>B2</sup>.

No geral, para as diferentes simulações apresentadas, o desempenho dos filtros, compostos por 10 multicamadas de SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> e uma camada central de SiO<sub>2</sub> (a cavidade de ressonância), demonstra que esta configuração é uma opção adequada para o desenho de filtros óticos baseados em filmes finos com largura de banda estreita.

Os resultados obtidos para os três conjuntos de índices de refração permitiram concluir que cada filtro passa-banda, desenhado para uma banda espectral específica, é capaz de alcançar uma transmitância elevada próxima ou superior a 90% e uma FWHM próxima de 10 nm. Estes últimos resultados, relativos à FWHM, são particularmente observados quando são utilizados os índices de refração considerados ideais e os dependentes da espessura da camada, como se pode concluir pela análise da figura 21.

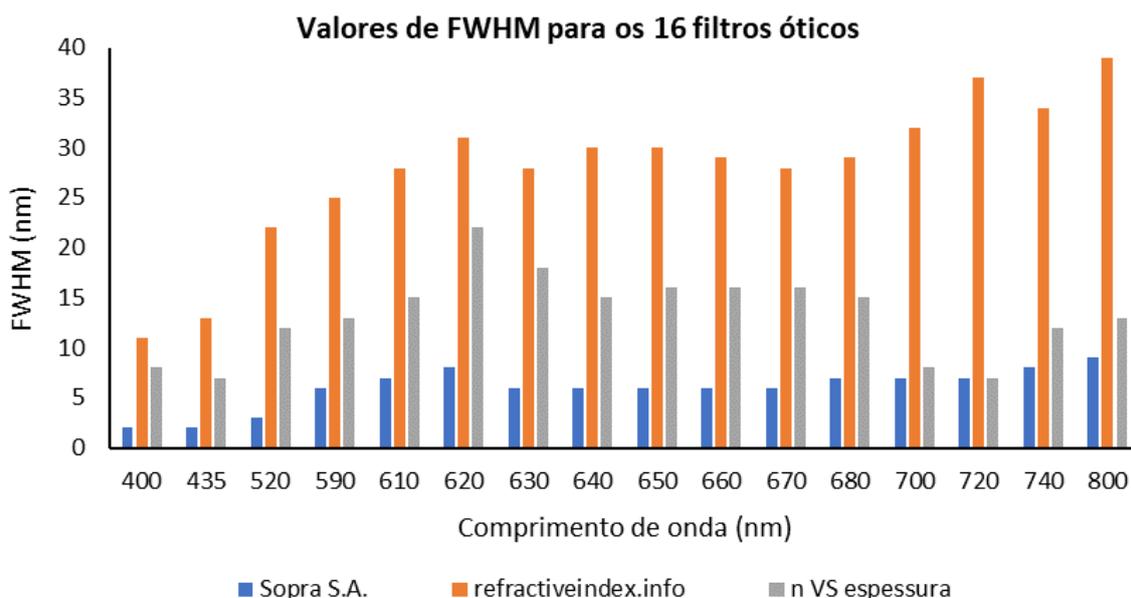


Figura 21: FWHM (nm) dos 16 filtros óticos, para cada um dos conjuntos de índices de refração simulados.

Adicionalmente, a partir das simulações, verificou-se que uma pequena variação nos índices de refração dos materiais pode conduzir a uma mudança significativa no comportamento dos filtros óticos de filmes finos, verificando-se, ainda, que uma modificação nas espessuras das camadas desses filmes pode dificultar a obtenção de um pico de máxima transmitância ótica na banda espectral desejada. Salienta-se que, embora as figuras anteriores apresentem picos de transmitância focados apenas nas regiões de interesse, a simulação dos filtros no *TFCalc* gera regiões de transmitância elevadas noutras zonas do espectro ótico, como se pode observar nas figuras presentes no anexo 2. Esta limitação da resposta espectral produzida, implica a necessidade de, na prática, adicionar filtros óticos passa-alto e passa-baixo a cada filtro de modo a limpar o espectro e limitar a região de transmitância da luz. É, assim, fundamental ter em consideração estas características durante o processo de fabrico.

### 5.1.1 EXEMPLOS DA INFLUÊNCIA DOS FILTROS ÓTICOS SIMULADOS NO ESPECTRO DE REFLECTÂNCIA DE AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO PARASITA DA MALÁRIA

Pretendeu-se verificar se os 16 filtros óticos, previamente simulados, apresentam potencial para a deteção e distinção de diferentes concentrações do parasita da malária, obtidos a partir de espectros de reflectância ótica (previamente apresentados na secção

2.2.2). Neste sentido, os espectros de transmitância ótica, obtidos para cada um dos 16 filtros óticos simulados, considerando a base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup> (figura 19), foram multiplicados pelos espectros de reflectância ótica normalizada (figura 2) de amostras com glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados com o parasita da malária, em diferentes níveis de parasitemia, quer no estadio inicial (anéis) quer no estadio avançado (trofozoitos) da doença. A figura 22 representa o espectro resultante da multiplicação mencionada, para diferentes amostras.

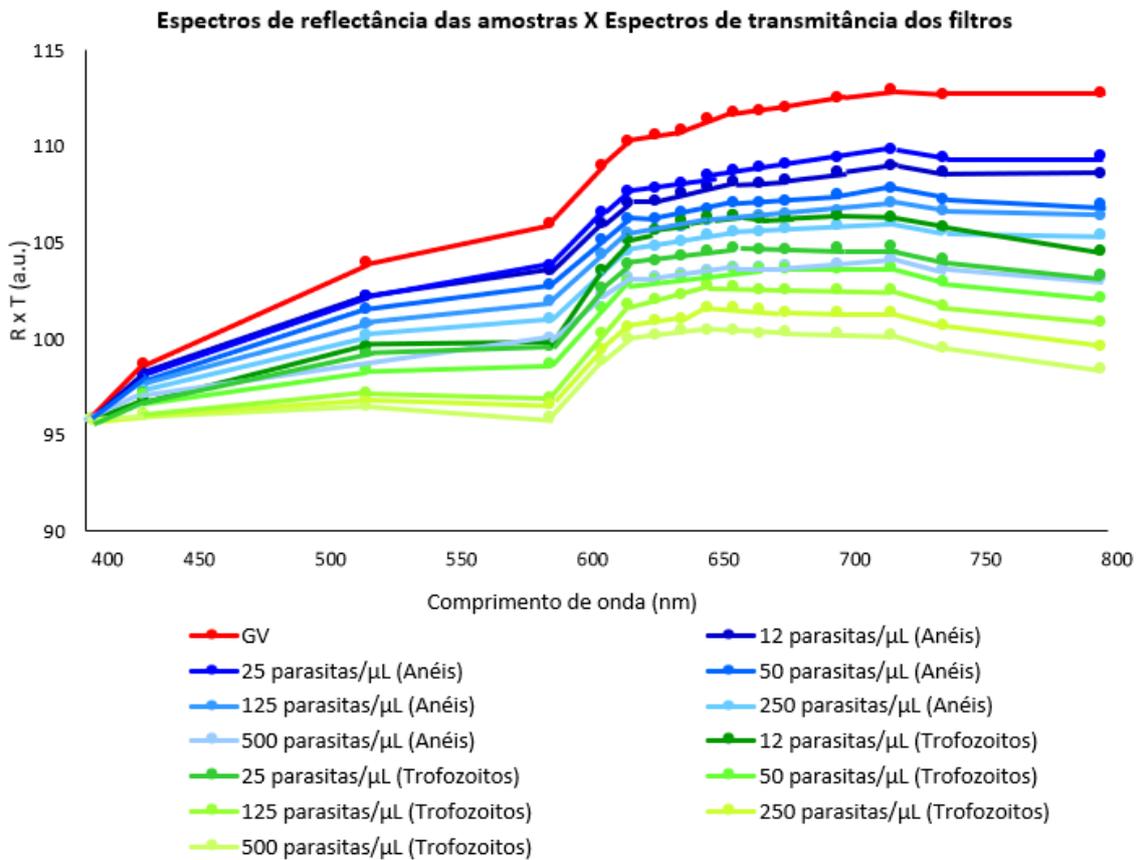


Figura 22: Espectro representativo da multiplicação dos espectros de transmitância ótica dos 16 filtros óticos simulados pelos espectros de reflectância ótica normalizada de glóbulos vermelhos saudáveis (GV) e GV com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/μL de glóbulos) de *P. falciparum*, nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença.

Os espectros resultantes são distinguíveis entre si, apresentando pequenas variações nas amplitudes dos picos, resultantes do efeito dos espectros de reflectância para as várias amostras (saudáveis e com parasitemia). A figura 23 apresenta os espectros resultantes da superposição dos espectros de transmitância de todos os 16 filtros óticos simulados (a partir da base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup>) em cada comprimento de onda (obtidos pela soma da área sob a curva de cada filtro), multiplicados pelos espectros de reflectância de GV e de GV infetados com o parasita da malária (figura 2).

Assim, o gráfico apresenta o efeito cumulativo da influência dos 16 filtros óticos, em cada comprimento de onda do espectro.

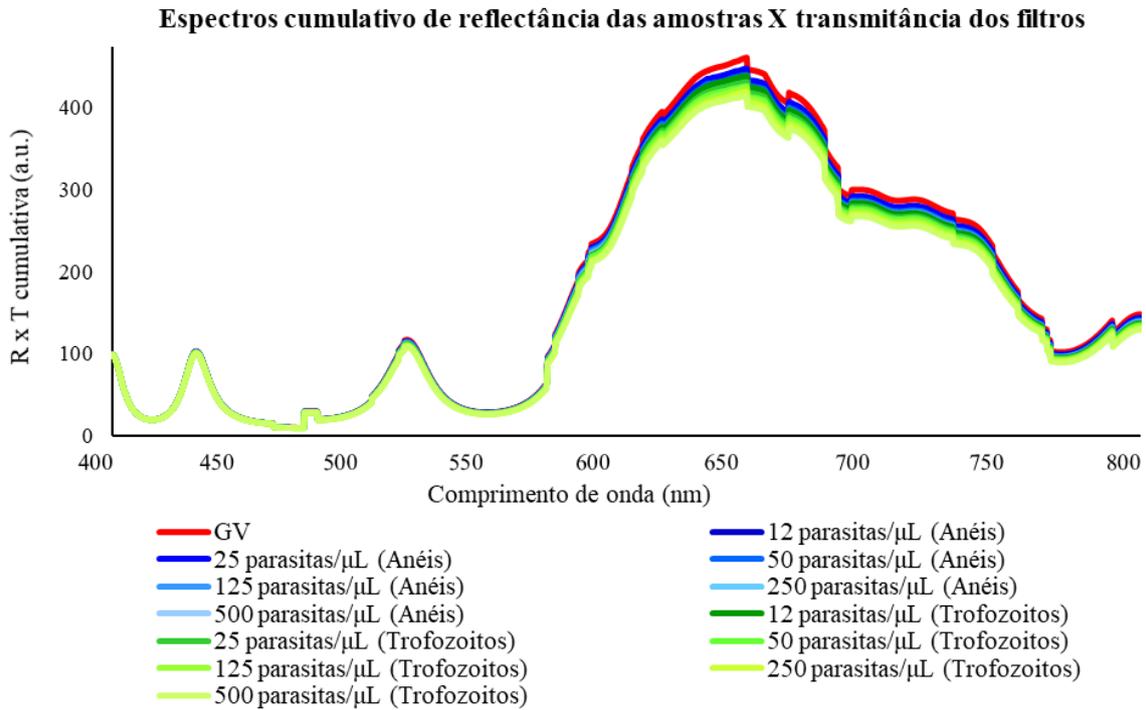


Figura 23: Espectro do efeito cumulativo resultante da superposição dos espectros de transmitância de todos os filtros óticos simulados em cada comprimento de onda (obtidos pela área sob a curva de cada filtro), multiplicado pelo espectro de reflectância normalizada de GV saudáveis e de GV infetados com o parasita da malária com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/μL de glóbulos vermelhos) de *P. falciparum*, nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença.

A título de exemplo, enquanto que em 435 nm apenas um filtro permite que a luz seja transmitida (o filtro de 435 nm), em 620 nm, todos os filtros óticos entre os 590 nm e os 640 nm permitem que alguma luz seja transmitida (existe sobreposição nos espectros de transmitância de cada um dos filtros, como se observou na figura 19), aumentando a quantidade total de luz a ser recebida pelo fotodíodo. Da mesma forma, o elevado número de filtros óticos apresentados na faixa entre 570 nm e 750 nm desencadeia um aumento na amplitude total do espectro nessa mesma região. Os resultados mostram que, entre os 400 nm e os 550 nm, não se observam diferenças significativas entre os GV saudáveis e os GV infetados com malária. Porém, nos comprimentos de onda entre 600 nm e 650 nm, há um elevado aumento na amplitude dos espectros obtidos, e o declive das curvas entre 550 nm e 650 nm é maior à medida que a parasitemia diminui. Assim, em particular nesta região do espectro, é possível visualizar e distinguir as curvas espectrais de GV saudáveis e infetados. A curva vermelha (saudável) é notoriamente mais elevada, seguindo-se as curvas relativas aos parasitas em estadio inicial da doença

(anéis, a azul) e, por fim, as curvas relativas aos parasitas em estadios avançados da doença (trofozoitos, a verde).

Conclui-se que, a partir destes resultados, é possível inferir que, na sua generalidade, o sistema projetado tem a capacidade de distinguir entre amostras saudáveis e infetadas com o parasita da malária, evidenciando o seu potencial como ferramenta de diagnóstico.

O anexo 3 apresenta os espectros individuais resultantes da multiplicação entre os espectros de reflectância, de GV e GV com diferentes níveis de parasitémia, e os espectros de transmitância de cada um dos 16 filtros óticos.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO EXPERIMENTAL DOS FILTROS ÓTICOS

De seguida serão apresentados os resultados obtidos na caracterização experimental da transmitância ótica dos 8 filtros óticos abordados na secção 4.3. Inicialmente, serão discutidos os resultados quando é utilizada uma fonte de luz branca e, posteriormente, quando é utilizada uma placa PCB constituída por 13 LEDs, com o intuito de analisar o potencial do sistema para miniaturização e portabilidade. Finalmente, serão apresentados exemplos da influência dos 8 filtros óticos nos espectros de reflectância de amostras com diferentes concentrações do parasita da malária.

### 5.2.1 RESULTADOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO FONTE DE LUZ BRANCA

O *setup* apresentado na secção 4.3.2 foi utilizado para caracterizar a resposta espectral da transmitância ótica dos 8 filtros óticos nos comprimentos de onda de interesse, tendo sido utilizada uma fonte de luz branca para o efeito. A figura 24 apresenta o espectro da luz branca incidente, ou seja, representa a quantidade de luz, gerada pela fonte, que incide nos filtros óticos, em função do comprimento de onda.

A partir da figura 24, verifica-se que nos comprimentos de onda iniciais, entre 350 nm e 500 nm, a quantidade de luz incidente é menor, tendendo a aumentar à medida que o comprimento de onda aumenta.

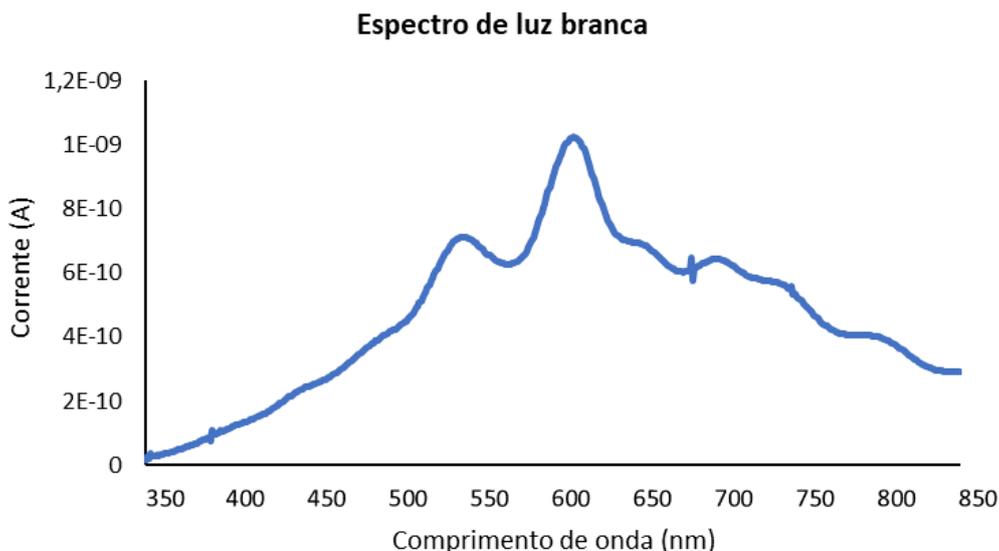


Figura 24: Espectro de luz branca, medido em corrente (A), correspondente à luz incidente nos filtros óticos, gerada pela fonte de luz de 200 W Quartz Tungsten Halogen (modelo 66881, Oriel Newport), e medida por um fotodiodo comercial.

A figura 25 apresenta os espectros de transmitância ótica medidos experimentalmente para cada um dos filtros óticos, com picos de transmitância centrados nos comprimentos de onda especificados na secção 4.3.1.

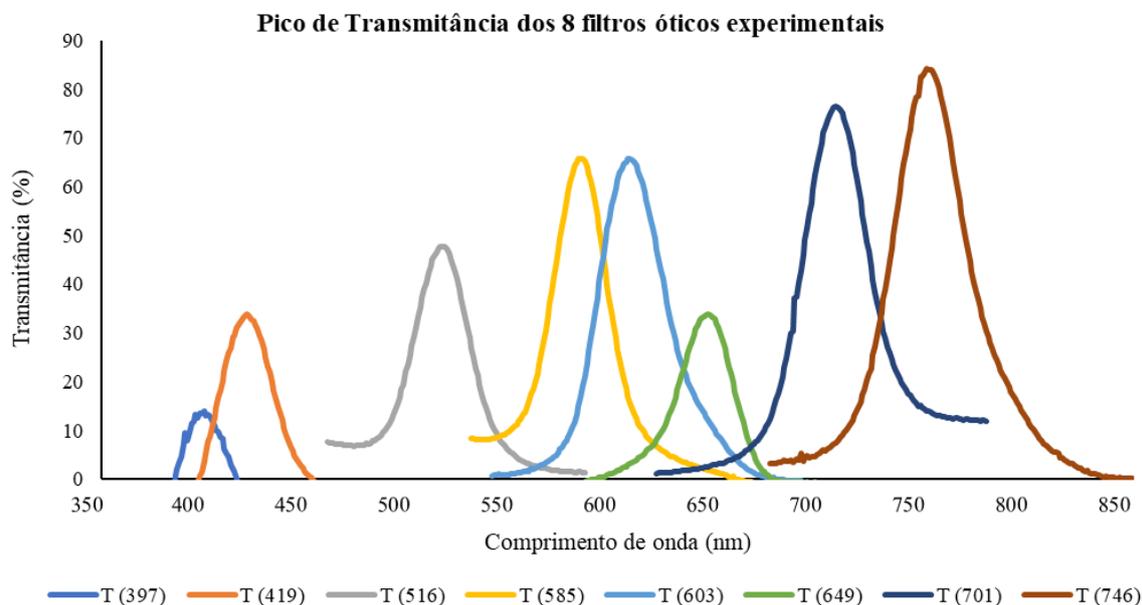


Figura 25: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para os 8 filtros óticos existentes no laboratório do CMEMS, quando é utilizada uma fonte de luz branca comercial.

Na figura 25 observa-se uma menor capacidade de transmitância ótica nos filtros óticos centrados nos comprimentos de onda de 397 nm, 419 nm e 649 nm. Esta transmitância tende a aumentar ligeiramente nos filtros óticos centrados nos comprimentos de onda

de 516 nm, 585 nm e 603. Nos comprimentos de onda de 701 nm e 746 nm, a transmitância ótica já é consideravelmente elevada. De uma forma geral, verifica-se que os filtros óticos experimentalmente testados e centrados em comprimentos de onda próximos da região ultravioleta apresentam menor transmitância, o que evidencia a maior complexidade de fabrico de filtros óticos nestas regiões. Importa ainda realçar que, embora a figura anterior apresente os picos de transmitância focados apenas nas regiões de interesse, os filtros óticos caracterizados experimentalmente apresentaram regiões de transmitância elevadas noutras zonas do espectro ótico, como se pode observar no anexo 4, o que implica a necessidade de adicionar filtros óticos passa-alto e passa-baixo a cada filtro de modo a limitar a região de transmitância da luz. Os espectros de transmitância destes diferentes filtros óticos comerciais utilizados encontram-se no anexo 5. Relativamente à FWHM, apresentada na figura 28 e no anexo 6, verifica-se que, para cada um dos 8 filtros óticos, a FWHM é muito superior a 10 nm, valor tomado como ideal.

### 5.2.2 RESULTADOS EXPERIMENTAIS UTILIZANDO PLACA COM LEDs

Assim como na secção anterior (secção 5.2.1), nesta secção serão apresentados os resultados experimentais da caracterização da transmitância ótica dos 8 filtros óticos nos comprimentos de onda de interesse, utilizando como fonte de luz a placa PCB constituída por um conjunto de 13 LEDs, que emitem luz em diferentes gamas espectrais. A figura 26 apresenta o espectro da luz incidente nos filtros óticos, isto é, ou seja, a quantidade de luz emitida pela placa de LEDs, em função do comprimento de onda. Nestes testes experimentais, todos os LEDs foram atuados por controlo PWM a 50% de *duty cycle*.

Desta forma, visualiza-se, a partir do gráfico da figura 26, que a quantidade de luz emitida pelos LEDs é elevada na gama do visível, entre os comprimentos de onda de 450 nm e 650 nm. No entanto, nas extremidades do espectro, ou seja, nos 400 nm e nos 800 nm, a quantidade de luz incidente nos filtros é muito reduzida.

### Espectro de luz do conjunto de 13 LEDs

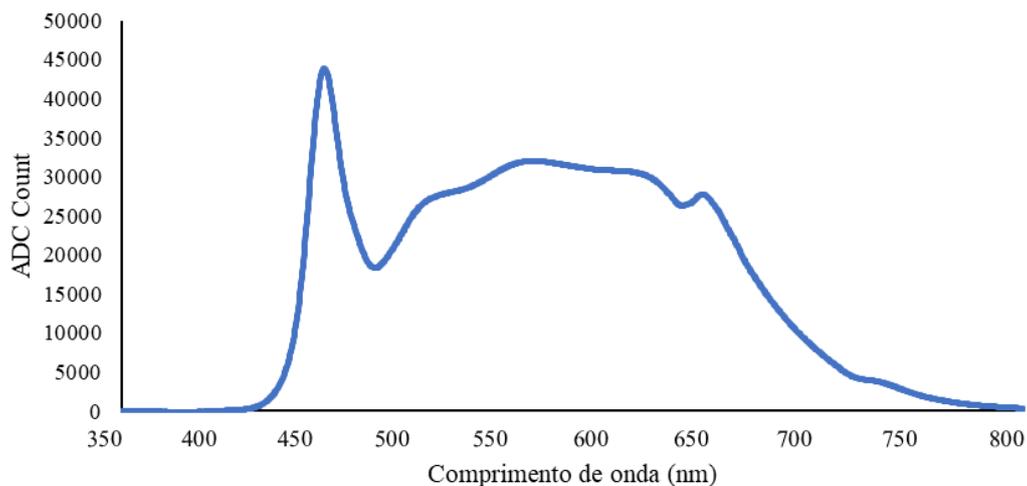


Figura 26: Espectro de luz incidente nos filtros óticos, medida pela contagem de fótons no espectrofotómetro AvaSpec-ULS2048XL EVO (Avantus), gerada por uma placa PBC constituída por 13 LEDs (2 emissores na zona dos 405 nm, 2 emissores na zona dos 800 nm e 9 emissores na zona do visível) e controlada por uma onda PWM com duty cycle a 50%.

A diferença significativa verificada na resposta espectral a 400 nm e a 800 nm ocorre devido ao número reduzido de LEDs nos comprimentos de onda referidos, existentes na placa, e à menor potência ótica destes mesmos LEDs, quando comparada com a potência dos LEDs na gama do visível. Esta proporção poderá, no futuro, ser ajustada, tanto pelo número de LEDs para cada gama, assim como pelo ajuste do *duty cycle* a utilizar para cada um dos LEDs, no controlo por PWM. Perante o espectro da figura 26, era espectável que o filtro ótico centrado nos 397 nm não apresentasse uma quantidade significativa de luz transmitida, o que se verificou experimentalmente. Desta forma, a figura 27 corresponde ao espectro de transmitância ótica, medido para 7 filtros óticos, evidenciando os picos de máxima transmitância de cada um.

Assim, partir da figura 27 consegue-se aferir que os filtros óticos centrados nos comprimentos de onda 516 nm, 585 nm e 701 nm, medidos no *setup* experimental, compreendendo a placa de iluminação por LEDs, apresentam uma menor transmitância ótica que os restantes filtros óticos, sendo que nenhum dos filtros atinge valores consideravelmente elevados. Salienta-se que, mais uma vez, foram utilizados os mesmos conjuntos de filtros passa-alto e passa-baixo para retirar o ruído nas regiões espectrais de não interesse.

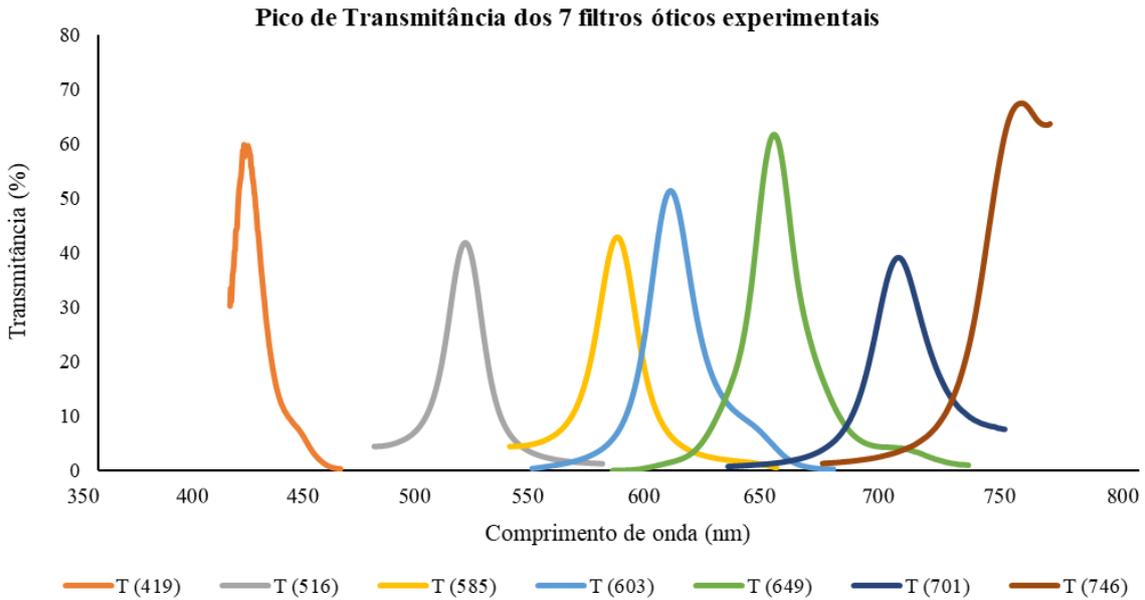


Figura 27: Transmitância ótica (%) vs comprimento de onda (nm), para os 7 filtros óticos existentes no laboratório do CMEMS, quando é utilizada uma placa PCB constituída por 13 LEDs (2 emissores na zona dos 405 nm, 2 emissores na zona dos 800 nm e 9 emissores na zona do visível) e controlada por uma onda PWM com duty cycle a 50%.

Relativamente à FWHM, como se pode verificar na figura 28 e no anexo 6, os valores são significativamente menores que os obtidos nos resultados da secção anterior (com a luz branca), no entanto ainda se encontram afastados do valor tido como ideal (que seria menor ou igual a 10 nm).

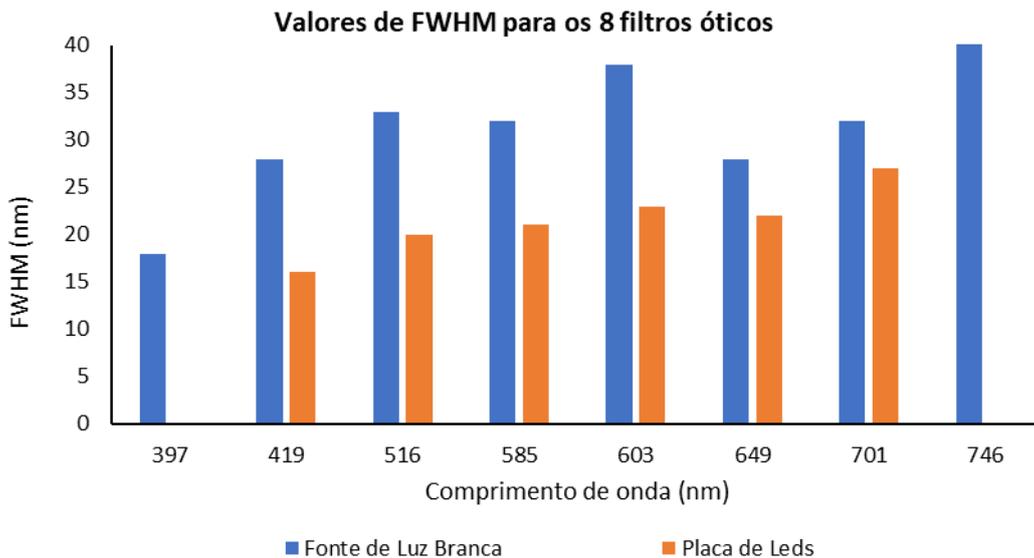
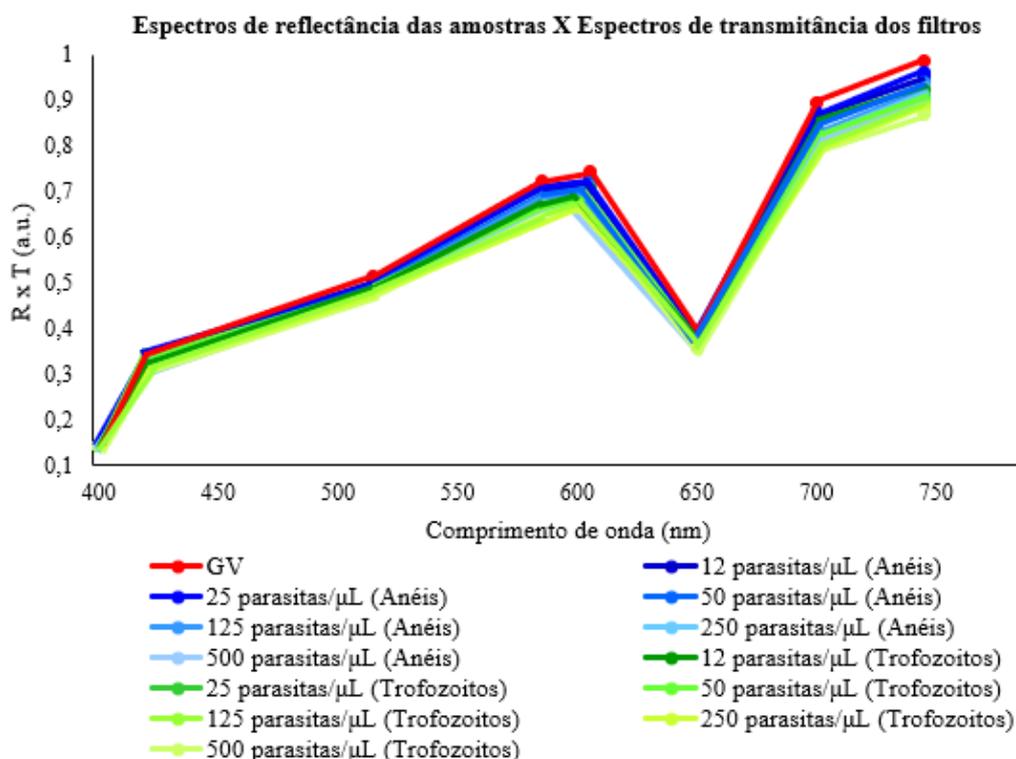


Figura 28: FWHM (nm) dos 8 filtros óticos medida no conjunto dos ensaios experimentais, quando é utilizada a fonte de luz branca e a placa de LEDs.

### 5.2.3 EXEMPLOS DA INFLUÊNCIA DOS 8 FILTROS ÓTICOS CARACTERIZADOS EXPERIMENTALMENTE NO ESPECTRO DE REFLECTÂNCIA DE AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO PARASITA DA MALÁRIA

Assim como realizado na secção 5.1.1, verificou-se se os resultados obtidos para os 8 filtros óticos, quando utilizada a fonte de luz branca, e os 7 filtros óticos, quando utilizada a placa de LEDs, possibilitariam a deteção de diferentes concentrações do parasita da malária a partir dos espectros de reflectância ótica (figura 2, secção 2.2.2). Deste modo, os espectros de transmitância ótica, obtidos para cada um dos 8 filtros óticos e para cada um dos 7 filtros óticos, respetivamente, foram multiplicados pelos espectros de reflectância ótica normalizada de GV saudáveis e GV infetados com o parasita da malária, em diferentes níveis de parasitémia, quer no estadio inicial (anéis), quer no estadio avançado (trofozoitos) da doença. As figuras 29 (a) e (b) representam os espectros resultantes da multiplicação mencionada, quando é utilizada a fonte de luz branca e a placa de LEDs, respetivamente.

(a)



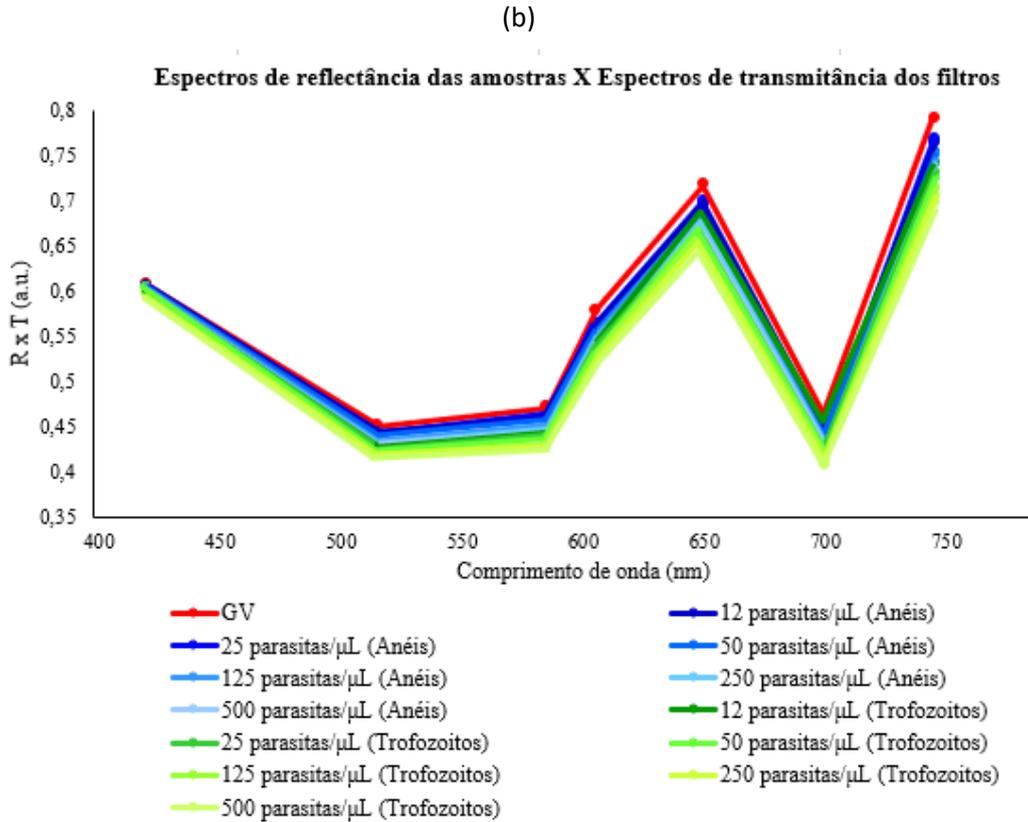


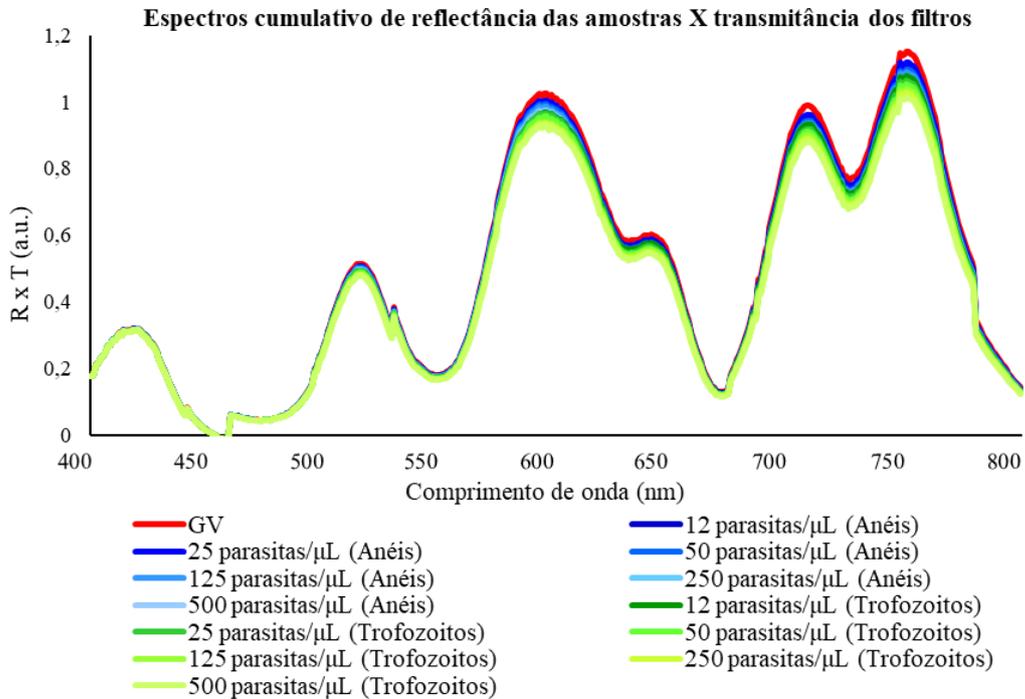
Figura 29: Espectro representativo da multiplicação dos espectros de transmitância ótica dos filtros óticos medidos experimentalmente pelos espectros de reflectância ótica de glóbulos vermelhos saudáveis (GV) e GV com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos) de *P. falciparum*, nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença: (a) com a fonte de luz branca; (b) com a placa PCB constituída por 13 LEDs.

Os gráficos da figura 29 permitem distinguir as linhas correspondentes à presença de GV (linha a vermelho) e das várias parasitémias, pelo menos ao nível do estado inicial (linhas nos tons de azul) ou avançado (linhas nos tons de verde) da doença. No entanto, não se consegue distinguir com facilidade as diferentes concentrações dos parasitas. Observa-se, ainda, que o padrão obtido pelos filtros óticos, assim como a influência de cada um deles, é altamente dependente da fonte de luz utilizada na montagem experimental.

A figura 30 apresenta os espectros resultantes da superposição dos espectros de transmitância de todos os filtros óticos caracterizados experimentalmente (8 com a fonte de luz branca e 7 com a placa PCB com os 13 LEDs) em cada comprimento de onda (obtidos pela soma da área sob a curva de cada filtro), multiplicados pelos espectros de reflectância normalizada de GV e de GV infetados com o parasita da malária (figura 2). Assim, os gráficos apresentam, para ambas as fontes de luz utilizadas, o efeito

cumulativo da influência de todos os filtros óticos, em cada comprimento de onda do espectro.

(a)



(b)

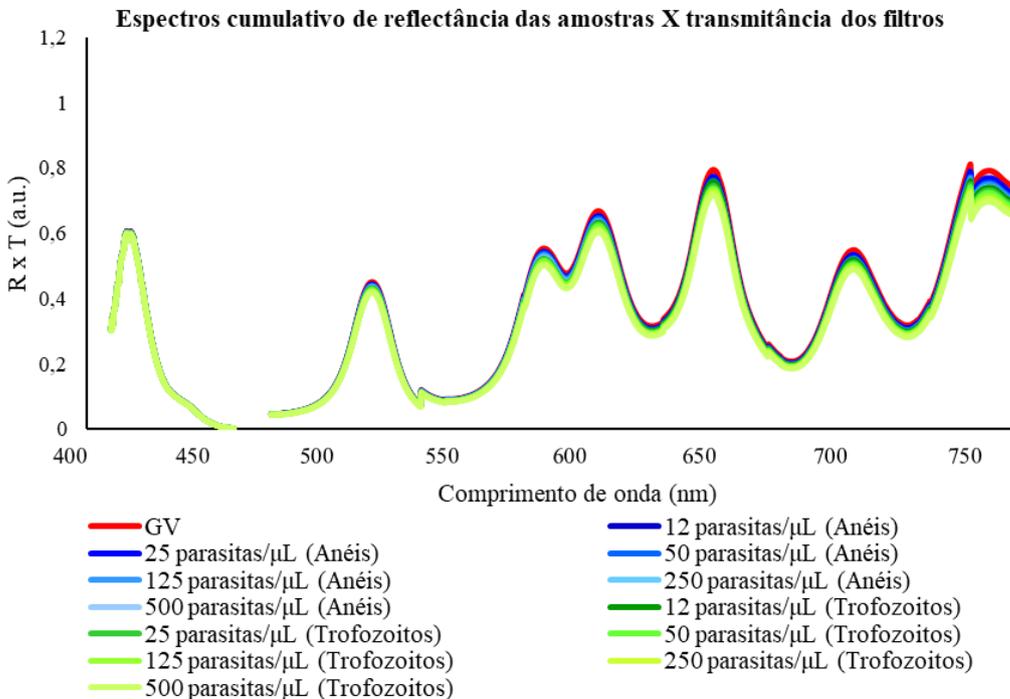
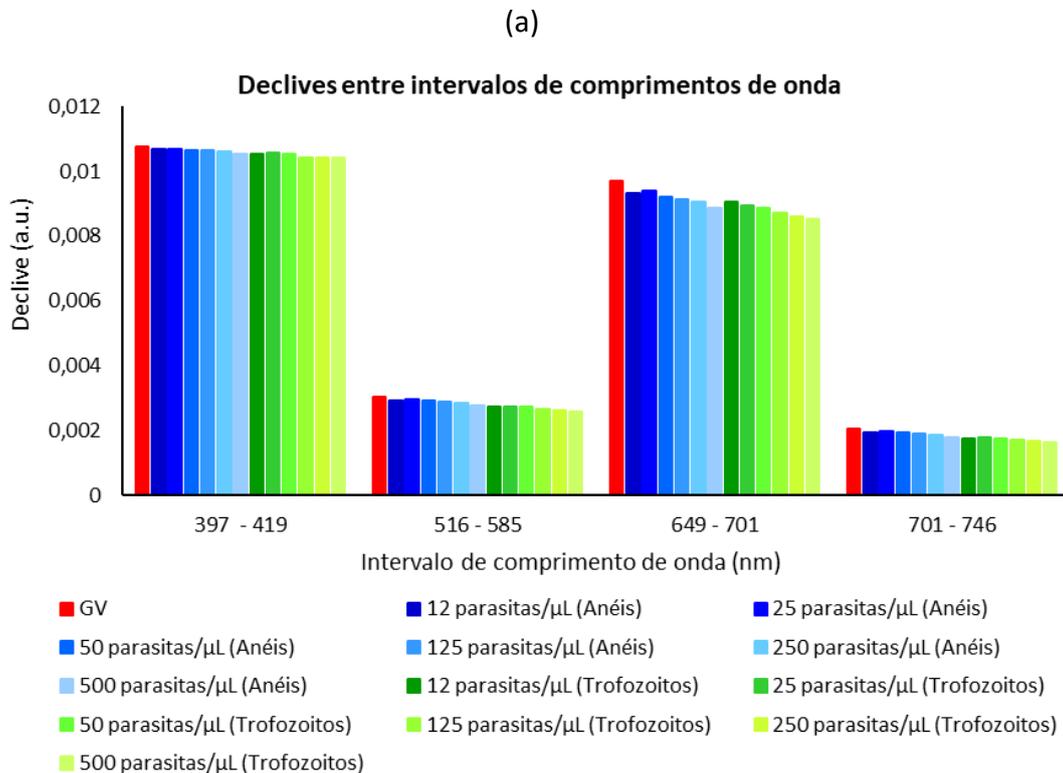


Figura 30: Espectro do efeito cumulativo resultante da superposição dos espectros de transmitância de todos os filtros óticos caracterizados experimentalmente, em cada comprimento de onda (obtidos pela área sob a curva de cada filtro), multiplicado pelo espectro de reflectância de GV e de GV infetados com o parasita da malária com diferentes níveis de parasitemia (12,5 a 50 parasitas/μL de glóbulos vermelhos) de *P. falciparum*, nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença: (a) fonte de luz branca; (b) fonte de luz com LEDs.

Os resultados de ambos os gráficos mostram que, entre 400 nm e 500 nm, não há diferença significativas entre as curvas relativas a GV saudáveis e GV infetados com malária. Nos comprimentos de onda entre 550 nm e 800 nm, começa a ser visível a distinção entre as curvas espectrais de GV saudáveis (vermelho) e GV infetados na fase inicial (azul) e avançada (verde) da doença, apesar desta diferenciação ser reduzida.

De forma a clarificar os resultados apresentados nas figuras anteriores (29 e 30), avaliar a possibilidade de desenvolver algoritmos de deteção e diagnóstico, com base nos dados apresentados, e analisar o seu potencial para diagnóstico de malária, procedeu-se ao cálculo dos declives das retas entre alguns intervalos de comprimentos de onda, presentes nos dois gráficos da figura 29. Estes comprimentos de onda, diferentes para cada um dos casos, foram escolhidos através da observação dos gráficos acima referidos, tentando compreender intervalos nos quais as variações nos espectros fossem mais significativas entre as diferentes amostras.

A figura 31 apresenta dois gráficos onde se apresentam os resultados desta abordagem: (a) corresponde aos declives das retas retirados do gráfico resultante quando é utilizada a fonte de luz branca (figura 29 (a)) e (b) contém os declives das retas do gráfico obtido quando a fonte de luz é a placa de LEDs (figura 30 (b)).



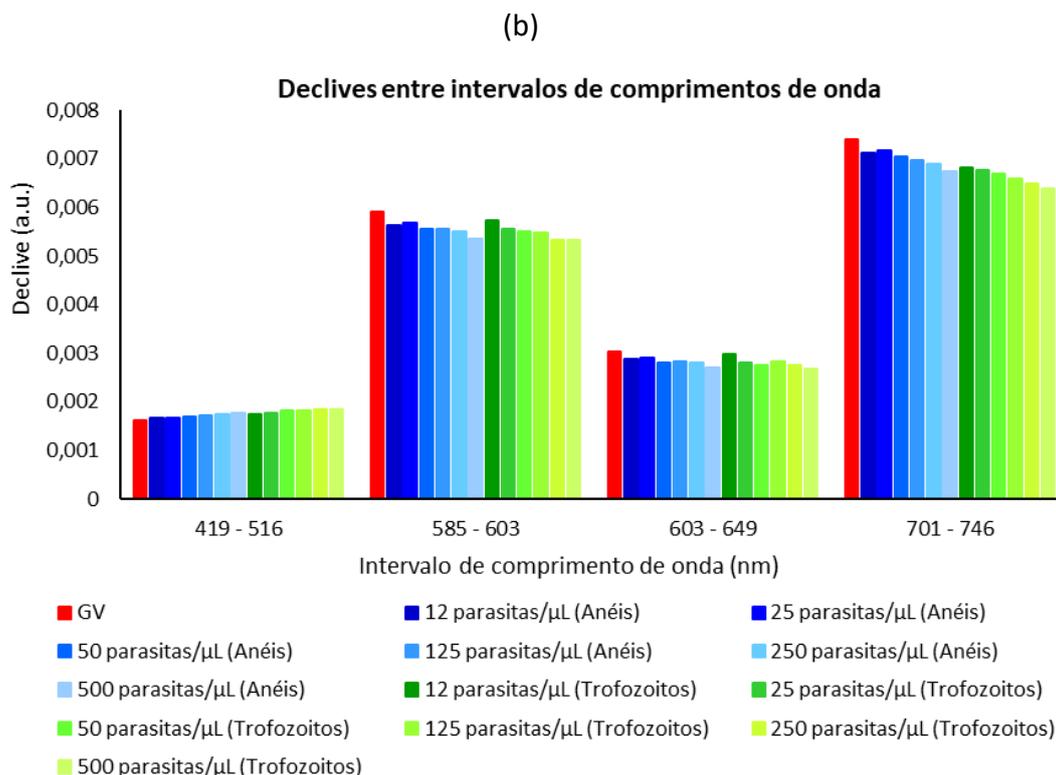


Figura 31: Gráfico de barras representativo dos declives das retas entre intervalos de comprimentos de onda obtidos a partir da figura 29, quando é utilizada: (a) a fonte de luz branca; (b) a placa de LEDs.

Na figura 31 (a) verifica-se uma grande discrepância nos valores dos declives entre intervalos de comprimentos de onda, sendo que o primeiros e o terceiro intervalos apresentam valores mais elevados em comparação com o segundo e o último intervalos. Além disso, é possível visualizar-se uma variação nos declives em função das amostras, averiguando-se, em todos os casos, uma diminuição dos declives à medida que aumenta a concentração do parasita da malária nas amostras de GV. É de notar que esta variação é mais acentuada no intervalo de comprimentos de onda de 649 nm – 701 nm, onde se distinguem com maior facilidade as diferentes parasitémias.

Uma análise semelhante pode ser realizada para o gráfico da figura 31 (b), em que se observa que o primeiro e o terceiro intervalos surgem com valores mais baixos, para os seus declives, relativamente aos valores do segundo e quarto intervalos. Neste caso, a diferenciação entre as várias concentrações de parasitas é mais visível, havendo, nos três últimos intervalos de comprimentos de onda, uma diminuição gradual dos valores dos declives em função do aumento da parasitémia. Por outro lado, no intervalo de 419 nm – 516 nm, a situação oposta é verificada, ocorrendo um aumento do declive com o aumento das concentrações do parasita.

Ao comparar os resultados obtidos nos dois gráficos averigua-se que, apesar das limitações encontradas na utilização da placa de LEDs previamente referidas, ambas as fontes de luz, com maior ou menor detalhe, permitem efetuar uma diferenciação das amostras de GV saudáveis e infetados, mostrando o potencial deste método para ser integrado num algoritmo de decisão para a deteção e diagnóstico de malária, baseados em declives nos espectros de reflectância. No entanto, é importante referir que um algoritmo de deteção deverá compreender, não só 4 intervalos entre comprimentos de onda, mas sim o máximo de informação possível entre os diversos comprimentos de onda disponíveis, de modo elevar, o mais possível, a sensibilidade e especificidade do algoritmo. Outros algoritmos poderiam ser considerados, nomeadamente com base na área sob a curva dos espectros.

Os resultados obtidos permitem prever que, a partir de um número reduzido de filtros óticos, seja possível reconstruir parcialmente os espectros de reflectância de amostras saudáveis e infetadas com malária em diferentes parasitémias, apresentando elevado potencial para aplicação no dispositivo proposto. Nesta fase, recorde-se que a eficiência da deteção foi limitada pela baixa intensidade da luz emitida pela placa PCB com LEDs, o que poderá ser um foco de trabalho futuro a desenvolver neste trabalho.

# **6 CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO**

Neste último capítulo, descrevem-se as considerações finais e as principais conclusões a reter de todo o trabalho realizado e apresentado nos capítulos anteriores. Além disso, são abordadas e propostas algumas etapas a serem consideradas como trabalho futuro, a realizar no âmbito da continuação do tema desta dissertação.

## 6.1 CONCLUSÃO

A presente dissertação integrou o projeto de investigação MalariaChip, pretendendo implementar um dispositivo ótico de reflectância, para diagnóstico de malária, com um limite de deteção até 12,5 parasitas/ $\mu\text{L}$  de glóbulos vermelhos, comparável com os melhores métodos de diagnóstico utilizados em campo.

No trabalho realizado nesta dissertação, foi proposto o desenho, simulação e otimização de 16 filtros óticos passa-banda com largura de banda estreita e elevada seletividade num conjunto de comprimentos de onda específicos: 400, 435, 520, 590, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 700, 720, 740 e 800 nm. Cada um dos filtros óticos foi constituído por um conjunto de multicamadas alternadas de filmes finos de  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ , compatíveis com CMOS, capazes de serem depositados no topo de uma matriz de 16 fotodíodos de silício. Os filtros óticos de filmes finos são altamente sensíveis às propriedades e espessura dos materiais que os constituem, pelo que estas variáveis foram controladas, de modo a obter cada filtro ótico centrado no comprimento de onda pretendido. Para cada filtro ótico, estudou-se a sua resposta espectral, para diferentes índices de refração.

As simulações realizadas para os filtros óticos, permitiram avaliar três tipos diferentes de índices de refração para  $\text{SiO}_2$  e  $\text{TiO}_2$ . Inicialmente, foram utilizados índices de refração da base de dados de *Sopra S.A.*, considerados como ideais para os materiais selecionados, tendo sido obtidas transmitâncias próximas de 100% e valores de FWHM menores que 10 nm. De seguida, procedeu-se ao desenho e simulação de filtros óticos utilizando os índices de refração considerados próximo dos seus valores reais de fabrico, adquiridos na base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup>, tendo sido obtidos picos de máxima transmitância entre 90% e 100%, ligeiramente inferiores ao caso anterior, e FWHM superiores a 10 nm. Por fim, realizaram-se simulações utilizando índices de refração medidos em função da espessura projetada para cada camada, tendo sido adquiridas

transmitâncias óticas superiores a 90% e FWHM próximo de 10 nm. Finalmente, no sentido de verificar se os 16 filtros óticos, do segundo caso em estudo, viabilizariam a detecção de diferentes concentrações do parasita da malária, procedeu-se à combinação dos seus espectros de transmitância com os espectros de reflectância de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados com níveis de parasitemia distintos. Com os resultados alcançados, concluiu-se que o sistema teria capacidade para distinguir entre amostras saudáveis e infetadas em diferentes estadios da doença, evidenciando o seu potencial como ferramenta de diagnóstico.

Na impossibilidade de realizar o fabrico dos 16 filtros óticos simulados, e com o objetivo de confirmar as configurações e simulações efetuadas, procedeu-se à caracterização experimental da transmitância ótica de 8 filtros óticos passa-banda baseados em filmes finos, já existentes no laboratório do CMEMS, centrados em comprimentos de onda com valores próximos dos selecionados (397, 419, 516, 585, 603, 649, 701 e 746 nm). Para o efeito, foram medidas as respostas espectrais da sua transmitância ótica, em duas montagens experimentais diferentes, utilizando uma fonte de luz branca e uma placa constituída por 13 LEDs. A transmitância resultante é significativamente menor do que seria expectável e os valores de FWHM muito superiores a 10 nm. Uma vez mais, os espectros de transmitância resultantes dos ensaios experimentais foram combinados com os espectros de reflectância de amostras com diferente parasitemia, e os resultados comprovaram a distinção entre glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados com a doença, quer num estadio inicial, quer num estadio avançado. Assim, a capacidade de reconstruir parcialmente os espectros de reflectância originais foi verificada experimentalmente, a partir de um conjunto reduzido de filtros óticos baseados em filmes finos, na mesma gama espectral dos filtros simulados, tendo sido possível distinguir entre diferentes parasitémias, até um limite de detecção de 12,5 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos.

Em suma, apesar de alguns desvios nos resultados simulados para as diferentes experiências dos filtros óticos (principalmente nos valores FWHM), o seu desempenho foi avaliado com sucesso, uma vez que foi possível obter alta transmitância ótica para cada um dos comprimentos de onda selecionados, tendo sido também possível distinguir os espectros óticos das diferentes amostras de GV.

## 6.2 TRABALHO FUTURO

No seguimento do trabalho realizado na presente dissertação, para que o dispositivo a ser desenvolvido para o diagnóstico de malária seja bem sucedido, existe um conjunto de etapas a executar, desde o fabrico e caracterização experimental dos 16 filtros óticos desenhados e simulados, a implementação de um microsistema CMOS contendo uma matriz de 16 fotodíodos, a deposição dos filtros óticos sobre a matriz de fotodíodos e integração de todo o sistema de iluminação e controlo num mesmo sistema miniaturizado.

Será ainda necessário ultrapassar as limitações do presente trabalho, nomeadamente:

- 1) Melhoria do protótipo da placa PCB de iluminação por LEDs, de modo a garantir uma iluminação em todo o espectro ótico de interesse. Esta melhoria poderá ser conseguida por alteração do número e tipo de LEDs a utilizar para cada região do espectro, ou ajuste no *duty cycle* no controlo por PWM.
- 2) Ensaios experimentais de reflectância, considerando os filtros óticos posicionados sobre um fotodíodo. No presente trabalho, foram considerados conjuntos de ensaios experimentais distintos (transmitância dos filtros óticos e reflectância das amostras), pelo que, no seguimento desta análise, será importante averiguar experimentalmente se os filtros óticos mantêm a capacidade de seleccionar a luz para os comprimentos de onda de interesse, continuando a permitir distinguir as amostras quando se mede a sua reflectância. Foram efetuados, no decorrer do trabalho, alguns ensaios preliminares desta montagem experimental. No entanto, os resultados obtidos foram inconsistentes, tendo sido observada alguma reflectância dos filtros óticos (não expectável) pelo que será importante ultrapassar esta limitação.

Uma vez ultrapassadas as limitações descritas, o fabrico dos 16 filtros óticos estudados consistirá no passo seguinte do desenvolvimento. Neste sentido, os filtros óticos simulados poderão ser depositados por técnicas de PVD (do inglês *Physical Vapor Deposition*)<sup>104</sup>, como por exemplo sistemas de pulverização catódica<sup>105</sup> ou sistemas de deposição por feixe de iões (IBD)<sup>100</sup>. No primeiro caso, ocorre deposição física de vapores através do bombardeamento do alvo com um feixe de iões para extrair

moléculas da sua superfície e depositá-las no substrato<sup>105</sup>. A segunda técnica consiste no processo de aplicar materiais a um alvo através da incidência de um feixe de partículas carregadas de iões, permitindo que outros iões sejam acelerados, focados ou desviados usando altas tensões ou campos magnéticos<sup>106</sup>. Esta técnica inclui uma fonte integrada de iões com *sputtering* para a realização da pré-limpeza e a limpeza *in-situ*, o *etching* e uma deposição controlada<sup>100</sup>. Todos estes processos deverão ser cuidadosamente monitorizados e controlados, com o intuito de obter camadas uniformes e com espessura o mais próximo possível da desejada. A caracterização final dos filtros óticos, ao nível da sua estrutura, morfologia e qualidade das interfaces, poderá ser realizada através de imagens SEM (do inglês *Scanning Electron Microscope*)<sup>82</sup>. A etapa que se seguirá, e que está atualmente sob desenvolvimento por outros investigadores do grupo de investigação do projeto, consiste no fabrico de uma matriz de 16 fotodíodos (4x4) utilizando a tecnologia CMOS<sup>81</sup>. No mesmo microchip, será integrada a eletrónica de leitura, e por cima da matriz de fotodíodos serão depositados os respetivos filtros óticos. Finalmente, a miniaturização do sistema vai permitir a criação de um dispositivo de deteção automática com LEDs específicos, desencadeando novas perspetivas nos métodos de diagnóstico de malária e alcançando limites de deteção inferiores aos comercialmente existentes.

# REFERÊNCIAS

1. Costa MS, Baptista V, Minas G, Veiga MI, Catarino SO. Effect of the materials' properties in the design of high transmittance and low FWHM SiO<sub>2</sub> / TiO<sub>2</sub> thin film optical filters for integration in a malaria diagnostics device. In: *Proceedings of Biodevices 2021.* ; 2021.
2. Pham NM, Karlen W, Beck HP, Delamarche E. Malaria and the "last" parasite: How can technology help? *Malaria Journal.* 2018;17(1):1-16. doi:10.1186/s12936-018-2408-0
3. Karnad DR, Nor MBM, Richards GA, Baker T, Amin P. Intensive care in severe malaria: Report from the task force on tropical diseases by the World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine. *Journal of Critical Care.* 2018;43:356-360. doi:10.1016/j.jcrc.2017.11.007
4. Mer M, Dünser MW, Giera R, Dondorp AM. Severe malaria. Current concepts and practical overview: What every intensivist should know. *Intensive Care Medicine.* 2020;46(5):907-918. doi:10.1007/s00134-020-06019-0
5. World Health Organization. *WHO, World Malaria Report 2020.* Geneva, Switzerland; 2020.
6. Silva I. *Study and Spectrophotometric Characterization of Malaria Biomarkers.* Mestrado em Micro e Nanotecnologias, Universidade do Minho, Braga; 2016.
7. Gitta B, Kilian N. Diagnosis of Malaria Parasites Plasmodium spp. in Endemic Areas: Current Strategies for an Ancient Disease. *BioEssays.* 2020;42(1):1-12. doi:10.1002/bies.201900138
8. Ives J. Malaria's characteristic cycle of fever and chills is a result of parasite's own influence. 2020. <https://www.news-medical.net/news/20200515/Malarias-characteristic-cycle-of-fever-and-chills-is-a-result-of-parasites-own-influence.aspx>.
9. Kochar DK, Tanwar GS, Khatri PC, et al. Clinical features of children hospitalized with malaria - A study from Bikaner, Northwest India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2010;83(5):981-989. doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0633
10. White NJ. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: A randomised trial. *Lancet.* 2005;366(9487):717-725. doi:10.1016/S0140-6736(05)67176-0
11. Luo Z, Sullivan SA, Carlton JM. The biology of plasmodium vivax explored through genomics. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2015;1342(1):53-61. doi:10.1111/nyas.12708

12. Krampa FD, Aniweh Y, Kanyong P, Awandare GA. Recent advances in the development of biosensors for malaria diagnosis. *Sensors (Switzerland)*. 2020;20(3). doi:10.3390/s20030799
13. Kasetsirikul S, Buranapong J, Srituravanich W, Kaewthamasorn M, Pimpin A. The development of malaria diagnostic techniques: A review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. *Malaria Journal*. 2016;15(1). doi:10.1186/s12936-016-1400-9
14. Catarino SO, Silva I, Lima R, Minas G. Spectrophotometric characterization of hemozoin as a malaria biomarker. (SPIE) S of PIE, ed. *Proceedings of SPIE*. 2017;10453. doi:10.1117/12.2270995
15. Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*. 1997;51:97-123. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.97
16. Olivier M, Van Den Ham K, Shio MT, Kassa FA, Fougeray S. Malarial pigment hemozoin and the innate inflammatory response. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(FEB):1-11. doi:10.3389/fimmu.2014.00025
17. Marks M, Gupta-Wright A, Doherty JF, Singer M, Walker D. Managing malaria in the intensive care unit. *British Journal of Anaesthesia*. 2014;113(6):910-921. doi:10.1093/bja/aeu157
18. Koepfli C, Nguitragool W, Hofmann NE, et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Scientific Reports*. 2016;6(1):1-7. doi:10.1038/srep39183
19. Health I, Malaria RB. Severe malaria. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2014;19 Suppl 1:7-131. doi:10.1111/tmi.12313\_2
20. Organization WH, Diseases. UBSP for R and T in T. *Microscopy for the Detection, Identification and Quantification of Malaria Parasites on Stained Thick and Thin Blood Films in Research Settings*.; 2015.
21. Cunningham J, Jones S, Gatton ML, et al. A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008-2018): Performance, procurement and policy. *Malaria Journal*. 2019;18(1). doi:10.1186/s12936-019-3028-z
22. Lee PC, Chong ETJ, Anderios F, Lim Y AL, Chew CH, Chua KH. Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using PlasmoNex™ multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR. *Malaria Journal*. 2015;14(1):1-7. doi:10.1186/s12936-015-0542-5
23. World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria*. 3rd editio. Geneva, Switzerland: Global Malaria Programme; 2015. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01179.x
24. Carlsson AM, Ngasala BE, Dahlström S, et al. *Plasmodium falciparum* population dynamics during the early phase of anti-malarial drug treatment in Tanzanian children with acute uncomplicated malaria. *Malaria Journal*. 2011;10:1-12.

doi:10.1186/1475-2875-10-380

25. World Health Organization. *Parasitological Confirmation of Malaria Diagnosis: Report of a WHO Technical Consultation, 6–8 October 2009.*; 2009.
26. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*. 2003;7(4):315-323. doi:10.1186/cc2183
27. Orish VN, Ansong JY, Onyeabor OS, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Iriemenam NC. Overdiagnosis and overtreatment of malaria in children in a secondary healthcare centre in Sekondi-Takoradi, Ghana. *Tropical Doctor*. 2016. doi:10.1177/0049475515622861
28. Echeverry DF, Deason NA, Davidson J, et al. Human malaria diagnosis using a single-step direct-PCR based on the Plasmodium cytochrome oxidase III gene. *Malaria Journal*. 2016;15(1):1-12. doi:10.1186/s12936-016-1185-x
29. English M, Puntl J, Mwangil I, Mchugh K, Marsh K. Clinical Overlap between Malaria and Severe Pneumonia in African children in hospital. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*. 1996;90:658-662. papers2://publication/uuid/98B6168A-9707-43E0-B37D-7671603F0501.
30. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: Detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(12):833-840. doi:10.1038/nrmicro3364
31. Varo R, Balanza N, Mayor A, Bassat Q. Diagnosis of clinical malaria in endemic settings. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020;0(0). doi:10.1080/14787210.2020.1807940
32. World Health Organization. *Basic Malaria Microscopy*. Second. Geneva, Switzerland; 1992. doi:10.1016/0169-4758(92)90107-d
33. Mukadi P, Gillet P, Lukuka A, 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. *Bulletin of the World Health Organization*. 2013;91(6):441-448. doi:10.2471/BLT.12.112706
34. Norgan AP, Arguello HE, Sloan LM, Fernholz EC, Pritt BS. A method for reducing the sloughing of thick blood films for malaria diagnosis. *Malaria Journal*. 2013;12(1):1-5. doi:10.1186/1475-2875-12-231
35. Bejon P, Andrews L, Hunt-Cooke A, Sanderson F, Gilbert SC, Hill AVS. Thick blood film examination for Plasmodium falciparum malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malaria Journal*. 2006;5:5-8. doi:10.1186/1475-2875-5-104
36. Eshel Y, Houry-Yafin A, Benkuzari H, et al. Evaluation of the parasight platform for malaria diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017;55(3):768-775. doi:10.1128/JCM.02155-16
37. Maguire JD, Lederman ER, Barcus MJ, et al. Production and validation of durable, high quality standardized malaria microscopy slides for teaching, testing and

- quality assurance during an era of declining diagnostic proficiency. *Malaria Journal*. 2006;5:1-8. doi:10.1186/1475-2875-5-92
38. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77(SUPPL. 6):119-127. doi:10.4269/ajtmh.2007.77.119
  39. Mouatcho JC, Dean Goldring JP. Malaria rapid diagnostic tests: Challenges and prospects. *Journal of Medical Microbiology*. 2013;62(PART10):1491-1505. doi:10.1099/jmm.0.052506-0
  40. Abdul-Ghani R, Al-Mekhlafi AM, Karanis P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: Would it come to clinical reality as a point-of-care test? *Acta Tropica*. 2012;122(3):233-240. doi:10.1016/j.actatropica.2012.02.004
  41. Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. Detection of a substantial number of sub-microscopic Plasmodium falciparum infections by polymerase chain reaction: A potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malaria Journal*. 2013;12(1):1-10. doi:10.1186/1475-2875-12-352
  42. Berzosa P, De Lucio A, Romay-Barja M, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. *Malaria Journal*. 2018;17(1):1-12. doi:10.1186/s12936-018-2481-4
  43. Selvarajah D, Naing C, Htet NH, Mak JW. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for diagnosis of uncomplicated malaria in endemic areas: A meta-analysis of diagnostic test accuracy. *Malaria Journal*. 2020;19(1):1-10. doi:10.1186/s12936-020-03283-9
  44. Smits HL, Gussenhoven GC, Terpstra W, Schukink RAF, Van Gemen B, Van Gool T. Detection, identification and semi-quantification of malaria parasites by NASBA amplification of small subunit ribosomal RNA sequences. *Journal of Microbiological Methods*. 1997;28(1):65-75. doi:10.1016/S0167-7012(96)00966-9
  45. Beurskens M, Mens P, Schallig H, et al. Quantitative determination of Plasmodium vivax gametocytes by real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification in clinical samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;81(2):366-369. doi:10.4269/ajtmh.2009.81.366
  46. Mens PF, Schoone GJ, Kager PA, Schallig HDFH. Detection and identification of human Plasmodium species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Malaria Journal*. 2006;5:1-6. doi:10.1186/1475-2875-5-80
  47. Reboud J, Xu G, Alice G, et al. Paper-based microfluidics for DNA diagnostics of malaria in low resource underserved rural communities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116:4834-4842. doi:10.1073/pnas.1812296116

48. Robinson JP, Rajwa B, Patsekina V, Davisson VJ. Computational analysis of high-throughput flow cytometry data. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012;(June). doi:10.1517/17460441.2012.693475
49. Peng WK, Kong TF, Ng CS, et al. Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis. *Nature Medicine*. 2014;20(9):1069-1073. doi:10.1038/nm.3622
50. Fescenko I, Laraoui A, Smits J, et al. Diamond Magnetic Microscopy of Malarial Hemozoin Nanocrystals. *Physical Review Applied*. 2019;11(3):1. doi:10.1103/PhysRevApplied.11.034029
51. Cai C, Carey KA, Nedosekin DA, et al. In vivo photoacoustic flow cytometry for early malaria diagnosis. *Cytometry Part A*. 2016;89(6):531-542. doi:10.1002/cyto.a.22854
52. Rebelo M, Grenho R, Orban A, Häscheid T. Transdermal diagnosis of malaria using vapor nanobubbles. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(2):343-344. doi:10.3201/eid2202.151203
53. McBirney SE, Chen D, Scholtz A, Ameri H, Armani AM. Rapid Diagnostic for Point-of-Care Malaria Screening. *ACS Sensors*. 2018;3(7):1264-1270. doi:10.1021/acssensors.8b00269
54. Catarino SO, Felix P, Sousa PJ, Pinto V, Veiga MI, Minas G. A portable device for optical detection and quantification of hemozoin in diluted blood samples. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*. 2020;67(2):365-371. doi:10.1109/TBME.2019.2913454
55. Silva I, Lima R, Minas G, Catarino SO. Hemozoin and hemoglobin characterization by optical absorption towards a miniaturized spectrophotometric malaria diagnostic system. *ENBENG 2017 - 5th Portuguese Meeting on Bioengineering, Proceedings*. 2017:3-6. doi:10.1109/ENBENG.2017.7889466
56. Minas G. *Microssistema Laboratorial Para Análise de Fluidos Biológicos*. PhD em Eletrónica Industrial, Universidade do Minho, Braga; 2004.
57. Zijlstra WG, Buursma A. Spectrophotometry of hemoglobin: Absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. 1997;118(4):743-749. doi:10.1016/S0305-0491(97)00230-7
58. Serebrennikova YM, Patel J, Garcia-Rubio LH. Interpretation of the ultraviolet-visible spectra of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Applied Optics*. 2010;49(2):180-188. doi:10.1364/AO.49.000180
59. Klossa J, Wattelier B, Happillon T, et al. Quantitative phase imaging and Raman micro-spectroscopy applied to Malaria. *Diagnostic Pathology*. 2013;8(Suppl 1):40-43.
60. Samson EB, Goldschmidt BS, Whiteside PJD, et al. Photoacoustic spectroscopy of  $\beta$ -hematin. *Journal of Optics (United Kingdom)*. 2012;14(6). doi:10.1088/2040-8978/14/6/065302

61. Hegg MC. Malaria Diagnostic Platform, Hemozoin Detection. *Encyclopedia of Malaria*. 2014:1-10. doi:10.1007/978-1-4614-8757-9\_110-1
62. Chen K, Yuen C, Aniweh Y, Preiser P, Liu Q. Towards ultrasensitive malaria diagnosis using surface enhanced Raman spectroscopy. *Scientific Reports*. 2016;6(June 2015):1-10. doi:10.1038/srep20177
63. Saha RK, Karmakar S, Roy M. Computational Investigation on the Photoacoustics of Malaria Infected Red Blood Cells. *PLoS ONE*. 2012;7(12):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0051774
64. Palmer J. Chapter 25: The measurement of transmission, absorption, emission, and reflection. *Handbook of optics*. 1995:1-25.
65. Materion Microelectronics & Services. Reflectance in Thin Films. *Technical paper*.:399-412. [https://materion.com/~media/Files/PDFs/Advanced Materials Group/ME/TechnicalPapers/Reflectance In thin Films\\_All.pdf](https://materion.com/~media/Files/PDFs/Advanced Materials Group/ME/TechnicalPapers/Reflectance In thin Films_All.pdf).
66. Cesaria M, Caricato AP, Martino M. Realistic reflectance spectrum of thin films covering a transparent optically thick substrate. *Applied Physics Letters*. 2014;105(3). doi:10.1063/1.4890675
67. Janecek M, Moses WW. Optical reflectance measurements for commonly used reflectors. *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 2008;55(4):2432-2437. doi:10.1109/TNS.2008.2001408
68. Pimenta S, Castanheira EMS, Minas G. Optical microsystem for analysis of diffuse reflectance and fluorescence signals applied to early gastrointestinal cancer detection. *Sensors (Switzerland)*. 2015;15(2):3138-3153. doi:10.3390/s150203138
69. Baptista V, Calçada C, Silva M, et al. Hemozoin: the future in malaria diagnosis. *MAM 2020 – Molecular Approaches to Malaria, Lorne, Australia*. 2020:28178.
70. Catarino S, Baptista V, Isabel M. V, Minas G. Dispositivo automático para diagnóstico não invasivo de malária por técnicas de reflectância ótica, método de operação e seus usos, 116798 N. 2020.
71. Choudhury AKR. Colour measurement instruments. In: *Principles of Colour and Appearance Measurement*. ; 2014:221-269. doi:10.1533/9780857099242.221
72. Kalyani VL, Sharma V. Different types of Optical Filters and their Realistic Application. *Journal of Management Engineering and Information Technology*. 2016;2(33):2394-8124.
73. Minas G, Wolffenbuttel RF, Correia JH. An array of highly selective Fabry-Perot optical channels for biological fluid analysis by optical absorption using a white light source for illumination. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*. 2006;8(3):272-278. doi:10.1088/1464-4258/8/3/008
74. Li X, Jiang Y. A novel optical filter of fiber Bragg grating. *Science in China, Series E: Technological Sciences*. 2006;49(5):611-620. doi:10.1007/s11431-006-2015-0
75. Thilagavathi K. Review on RF Tunable Filters. *International Journal of Innovations*

- in Engineering and Technology*. 2017;8(2):42-50. doi:10.21172/ijiet.82.007
76. Davidhazy A. Overview of Infrared and Ultraviolet Photography. In: *School of Photographic Arts and Sciences Rochester Institute of Technology*.
  77. Technologies A. *What Is a Dichroic Filter?* <http://abrisatechnologies.com/2014/10/what-is-a-dichroic-filter/>.
  78. Minas G, Ribeiro JC, Martins JS, Wolffenbuttel RF, Correia JH. An array of Fabry-Perot optical-channels for biological fluids analysis. *Sensors and Actuators, A: Physical*. 2004;115(2-3 SPEC. ISS.):362-367. doi:10.1016/j.sna.2004.03.077
  79. Liu B, Yi F, Yang G. The application of fiber Bragg grating filter in lidar. *Optical Fibers and Passive Components*. 2004;5279:131. doi:10.1117/12.521465
  80. Piegari A, Flory F. *Optical Thin Films and Coatings.*; 2018.
  81. Minas G, Wolffenbuttel RF, Correia JH. A lab-on-a-chip for spectrophotometric analysis of biological fluids. *Lab on a Chip*. 2005;5(11):1303-1309. doi:10.1039/b506817g
  82. Pimenta S, Cardoso S, Miranda A, De Beule P, Castanheira EMS, Minas G. Design and fabrication of SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> and MgO/TiO<sub>2</sub> based high selective optical filters for diffuse reflectance and fluorescence signals extraction. *Biomedical Optics Express*. 2015;6(8):3084. doi:10.1364/boe.6.003084
  83. Ferreira DS, Mirkovic J, Wolffenbuttel RF, Correia JH, Feld MS, Minas G. Narrow-band pass filter array for integrated opto-electronic spectroscopy detectors to assess esophageal tissue. *Biomedical Optics Express*. 2011;2(6):1703. doi:10.1364/boe.2.001703
  84. Pereira JP de O. *Fabrico de Um Filtro Ótico Integrado Numa Matriz de Fotodíodos de Silício Para Aplicação Em Sondas Neurais*. Mestrado em Eletrónica Industrial e Computadores, Universidade do Minho, Braga; 2018.
  85. Bibbò L, Khan K, Liu Q, Lin M, Wang Q, Ouyang Z. Tunable narrowband antireflection optical filter with a metasurface. *Photonics Research*. 2017;5(5):500. doi:10.1364/prj.5.000500
  86. Rubio R, Sabate N, Calaza C, et al. Optical simulation of a MOEMS based tuneable Fabry-Perot interferometer. *Proceedings of IEEE Sensors*. 2004;3:1324-1327. doi:10.1109/icsens.2004.1426426
  87. Calaza C, Fonseca L, Moreno M, Marco S, Cané C, Gracia I. A surface micromachining process for the development of a medium-infrared tuneable Fabry-Perot interferometer. *Sensors and Actuators, A: Physical*. 2004;113(1):39-47. doi:10.1016/j.sna.2004.01.047
  88. MacLeod HA. Thin-Film Optical Filters. *Thin-Film Optical Filters*. 2001. doi:10.1201/9781420033236
  89. Zhu C, Palmer GM, Breslin TM, Harter J, Ramanujam N. Diagnosis of breast cancer using fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy: a Monte-Carlo-model-based approach. *Journal of Biomedical Optics*. 2008;13(3):034015.

doi:10.1117/1.2931078

90. Macleod A. Optical Thin Films. *Handbook of Thin Film Deposition: Fourth Edition*. 2018:379-416. doi:10.1016/B978-0-12-812311-9.00012-8
91. Brown JQ, Vishwanath K, Palmer GM, Ramanujam N. Advances in Quantitative UV-Visible Spectroscopy for Clinical and Pre-clinical Application in Cancer. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20:pp.119-131.
92. M. F. S. Ferreira. *Óptica e Fotónica*. Lisboa: Lidel; 2003.
93. Pimenta S. *Optical Microsystem for Spectroscopy Signals Extraction Applied to Gastrointestinal Dysplasia Detection*. PhD em Engenharia Biomédica, Universidade do Minho, Braga; 2016.
94. D. Evers, Hendriks B, Lucassen G, Ruers T. Optical spectroscopy: current advances and future applications in cancer diagnostics and therapy. *Future oncology*. 2012;8:307-320.
95. Erdogan T, Wang L, Clarke G. Optical filter and fluorescence spectroscopy system incorporation the same, US 6,809859 B2. 2004.
96. Ferreira DS dos S. *Spectroscopy Systems for the Detection of Gastrointestinal Dysplasia*. PhD em Bioengenharia, Universidade do Minho, Braga; 2011.
97. Correia JHG. *Optical Microsystems in Silicon Based on a Fabry-Perot Resonance Cavity*.; 1999.
98. Barybin A, Shapovalov V. Substrate effect on the optical reflectance and transmittance of thin-film structures. *International Journal of Optics*. 2010;2010:20-27. doi:10.1155/2010/137572
99. K. L. Chopra. *Thin Film Phenomena*. 1st ed. McGraw-Hill Book Company; 1969.
100. Pimenta S, Cardoso S, Castanheira EMS, Minas G. Advances towards a miniaturized optical system for gastrointestinal cancer detection using diffuse reflectance and fluorescence spectroscopies. *Gastrointestinal Cancers: Prevention, Detection and Treatment*. 2016;1:313.
101. Polyanskiy M. Refractive Index Database. <https://refractiveindex.info/>. Accessed May 20, 2020.
102. Software Spectra I. Software Spectra, Inc.
103. TFCalc. Thin Film Design Software for Windows. 2002;(503).
104. Mattox DM. *Handbook of Physical Vapor Deposition (PVD) Processing: Film Formation, Adhesion, Surface Preparation and Contamination Control*. Noyes Publications; 1998.
105. Carmo JP, Correia JH. *Introdução Às Microtecnologias No Silício*. LIDEL; 2020.
106. Stout DA, Durmus NG, Webster TJ. *Synthesis of Carbon Based Nanomaterials for Tissue Engineering Applications*. Woodhead Publishing Limited; 2013. doi:10.1533/9780857097231.1.119

# ANEXOS

## ANEXO 1

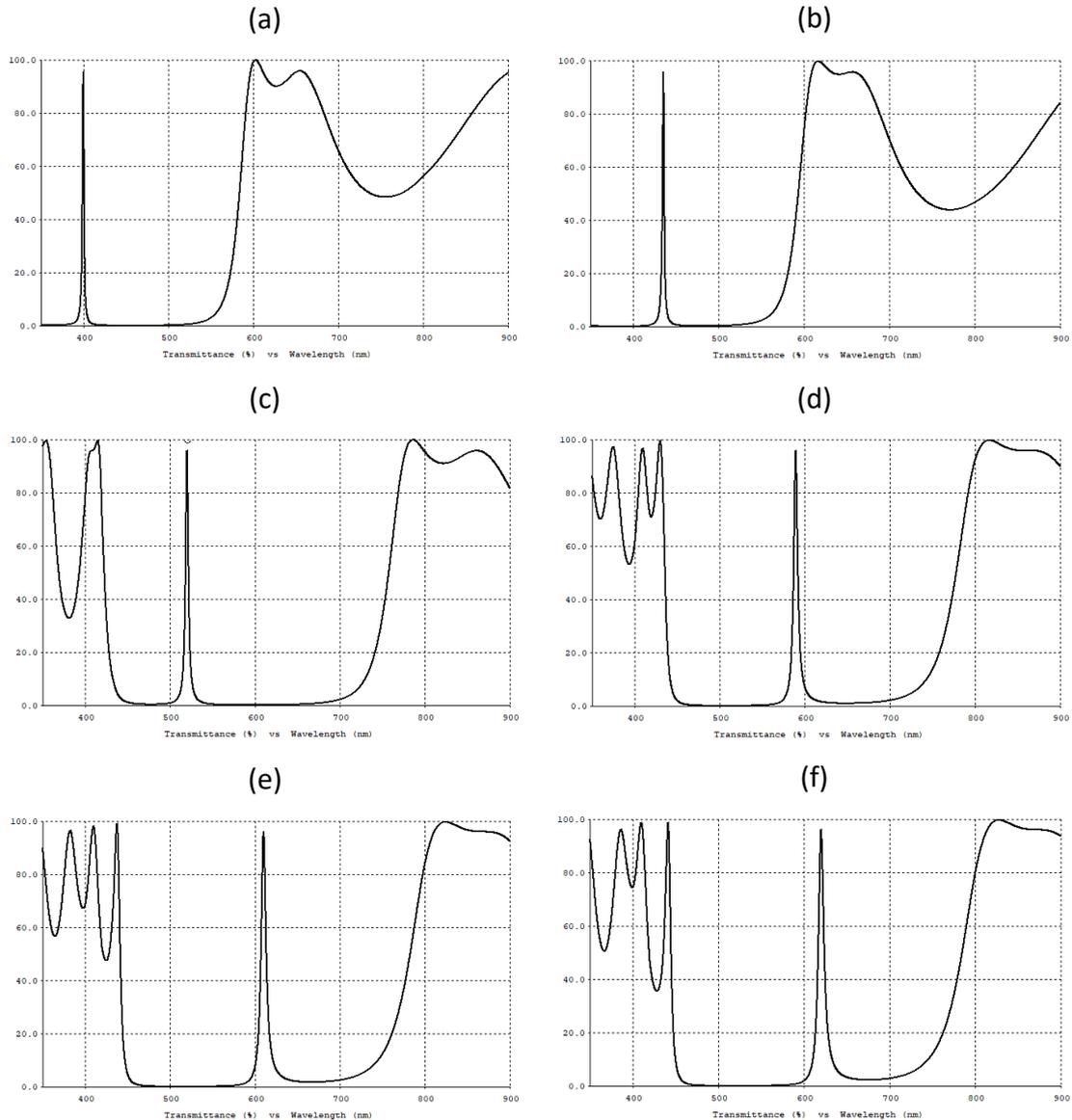
A tabela que se segue apresenta os valores de FWHM dos 16 filtros óticos simulados, quando são aplicados os índices de refração de *Sopra S.A.*, de *refractiveindex.info*<sup>101</sup> e os que são calculados com dependência da espessura das camadas.

*Tabela 9: Cálculo da FWHM dos espectros de máxima transmitância para cada um dos 16 filtros óticos simulados (representação estrutural na tabela 4), utilizando os índices de refração de Sopra S.A., de refractiveindex.info e do trabalho desenvolvido por Pimenta et al.<sup>82</sup>.*

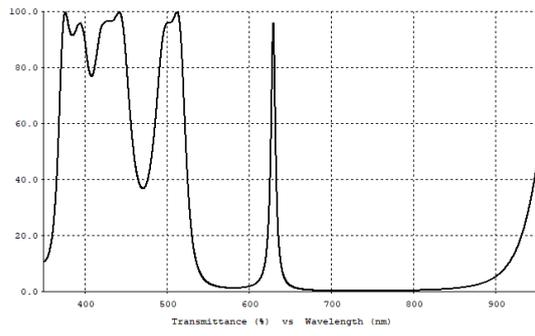
Filtro ótico (nm)	<i>Sopra S.A.</i>		<i>refractiveindex.info</i>		n VS espessura	
	Metade do valor do pico máximo (%)	FWHM (nm)	Metade do valor do pico máximo (%)	FWHM (nm)	Metade do valor do pico máximo (%)	FWHM (nm)
400	47,862	2	47,944	11	48,216	8
435	47,874	2	47,967	13	47,875	7
520	47,889	3	48,185	22	48,125	12
590	47,968	6	47,979	25	47,925	13
610	48,084	7	48,168	28	48,049	15
620	48,153	8	48,287	31	48,132	22
630	47,996	6	48,016	28	48,079	18
640	47,936	6	47,948	30	47,998	15
650	47,903	6	47,898	30	47,939	16
660	47,888	6	47,877	29	47,899	16
670	47,870	6	47,874	28	47,877	16
680	47,863	7	47,892	29	47,870	15
700	47,882	7	47,988	32	48,216	8
720	47,917	7	48,147	37	47,875	7
740	47,878	8	47,939	34	48,125	12
800	47,918	9	47,949	39	47,925	13

## ANEXO 2

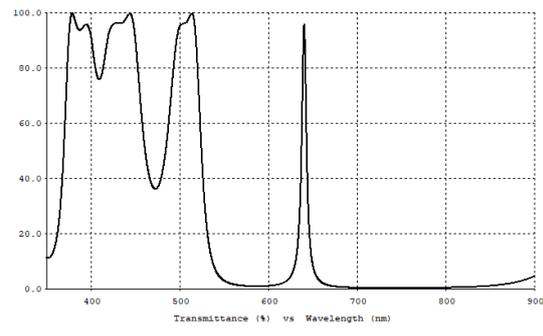
As figuras que se seguem correspondem às respostas espectrais da transmitância ótica resultante de cada um dos 16 filtros óticos após a sua simulação no *TFCalc*. As figuras 32, 33 e 34 correspondem aos gráficos com as respostas dos filtros óticos simulados considerando, respetivamente, os índices de refração da base de dados de *Sopra S.A.*, da base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup> e os índices de refração calculados a partir da espessura de cada camada de filme fino.



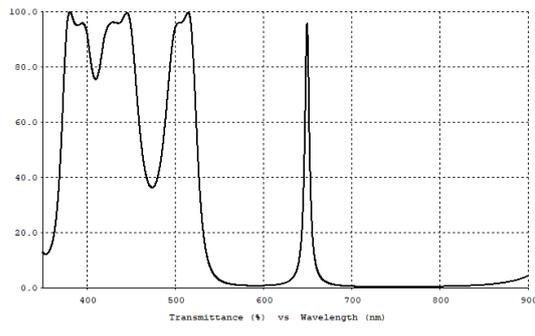
(g)



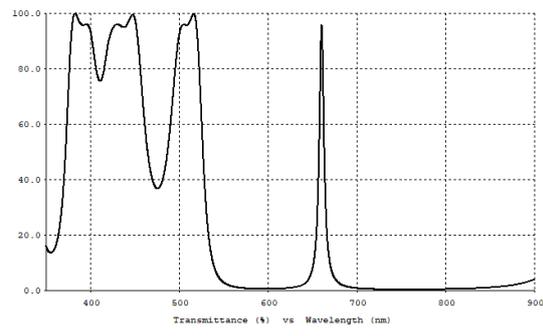
(h)



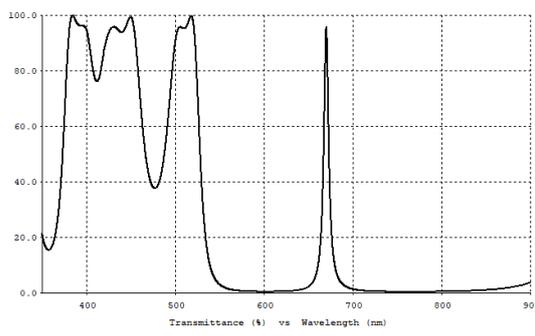
(i)



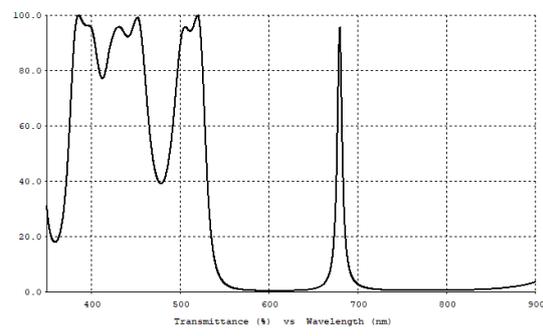
(j)



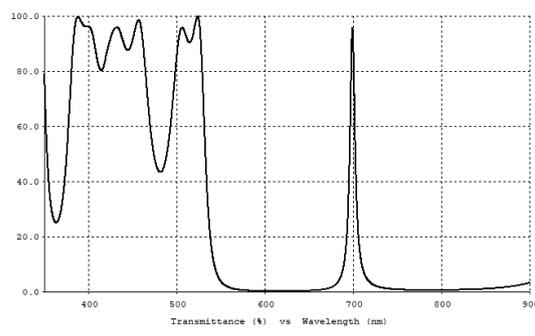
(k)



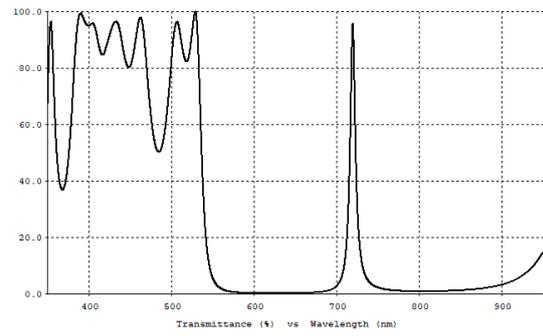
(l)



(m)



(n)



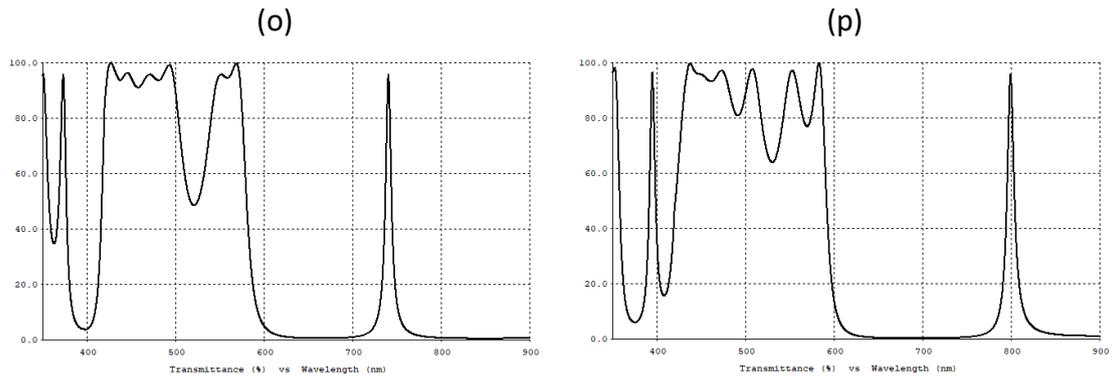
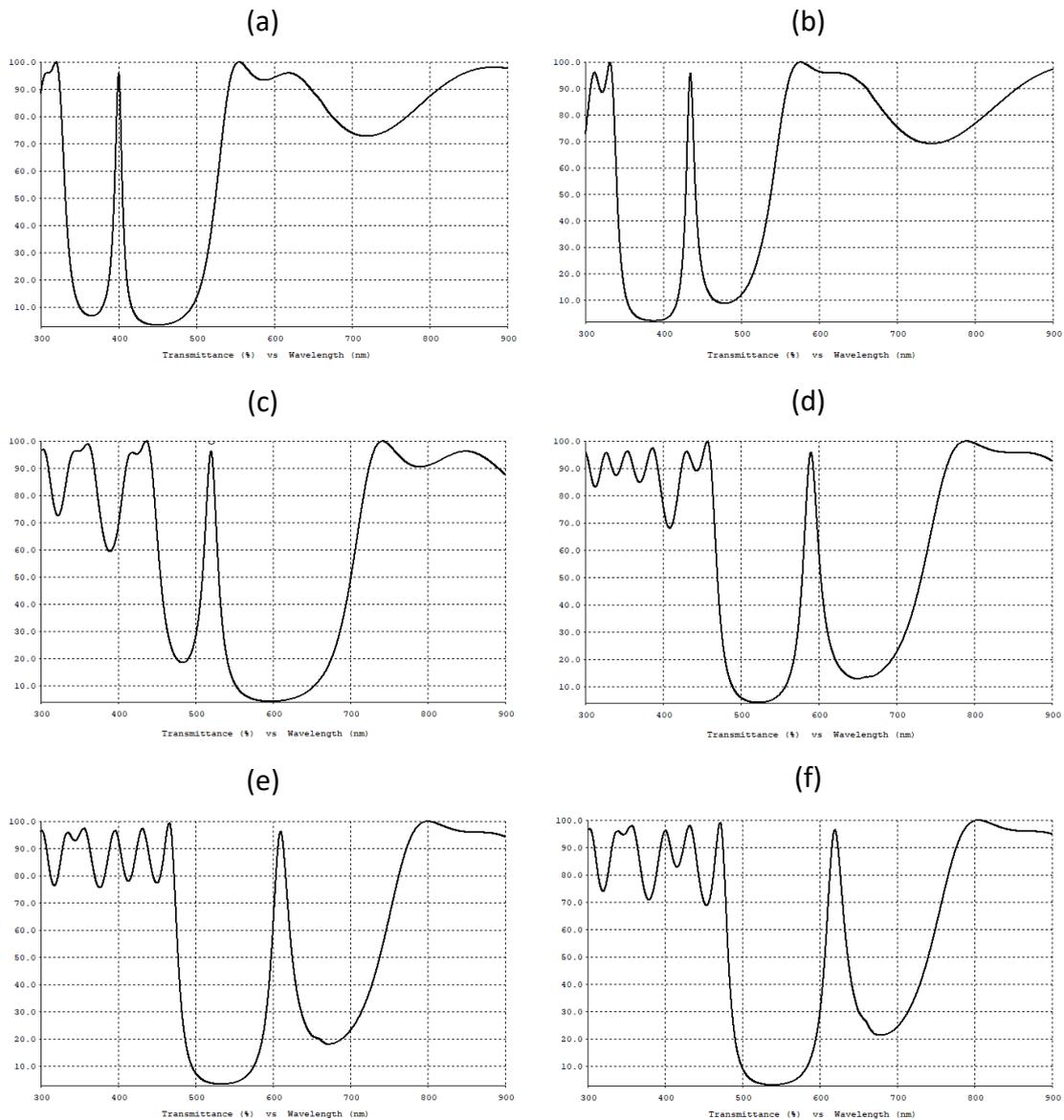
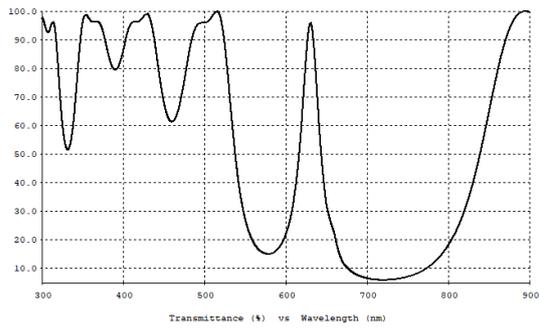


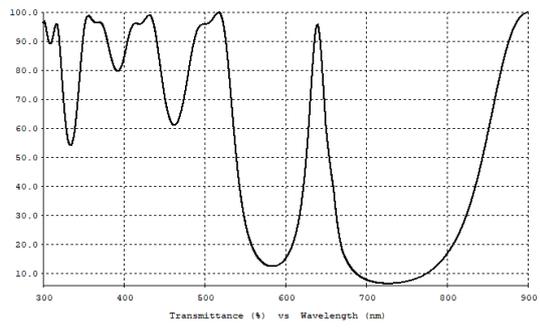
Figura 32: Resposta espectral dos 16 filtros óticos simulados, utilizando os índices de refração de Sopra S.A.. Cada filtro é centrado: (a) 400 nm; (b) 435 nm; (c) 520 nm; (d) 590 nm; (e) 610 nm; (f) 620 nm; (g) 630 nm; (h) 640 nm; (i) 650 nm; (j) 660 nm; (k) 670 nm; (l) 680 nm; (m) 700 nm; (n) 720 nm; (o) 740 nm; (p) 800 nm.



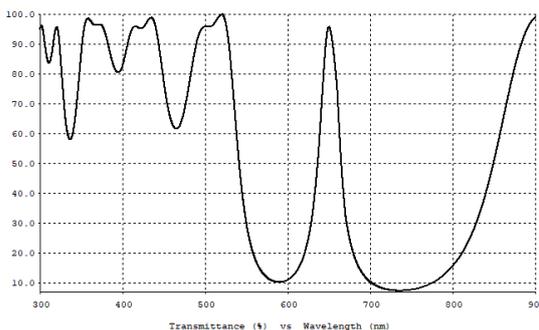
(g)



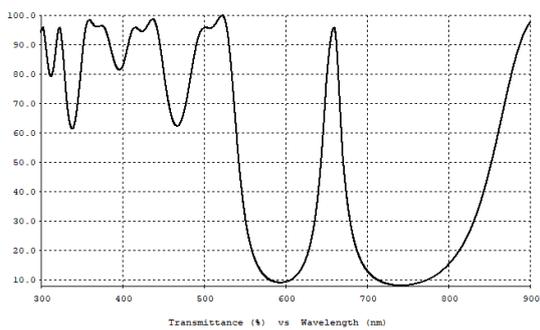
(h)



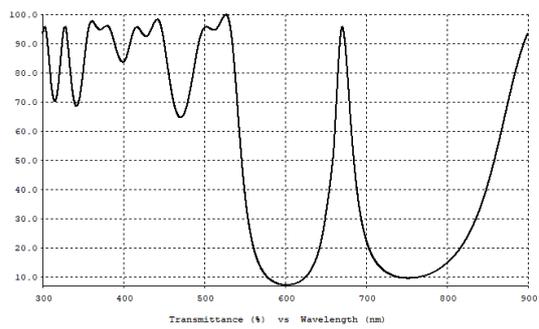
(i)



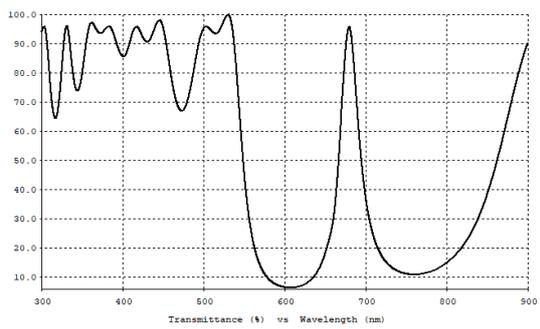
(j)



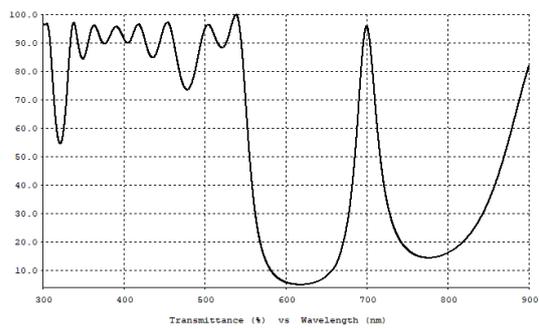
(k)



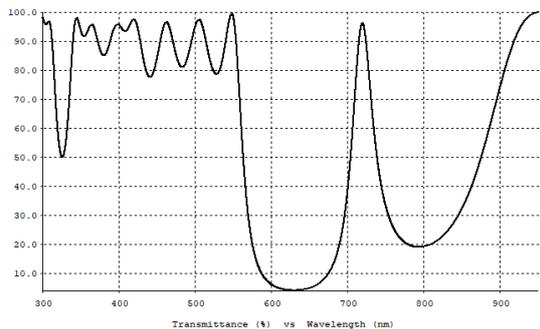
(l)



(m)



(n)



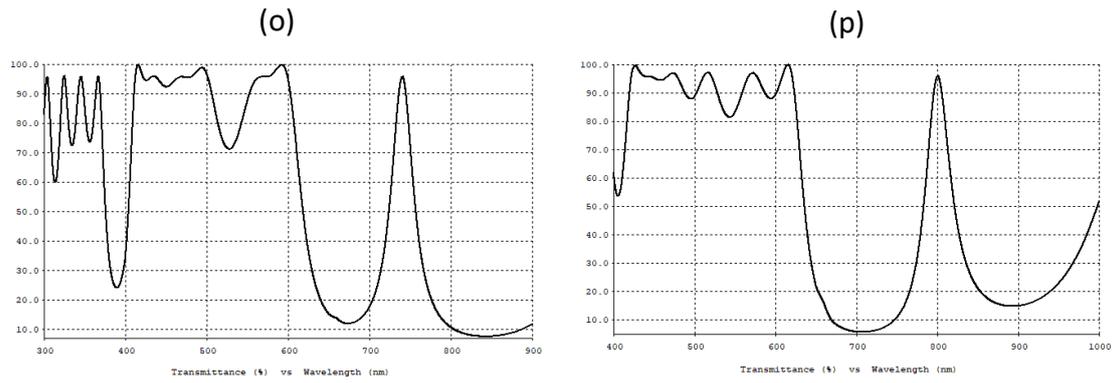
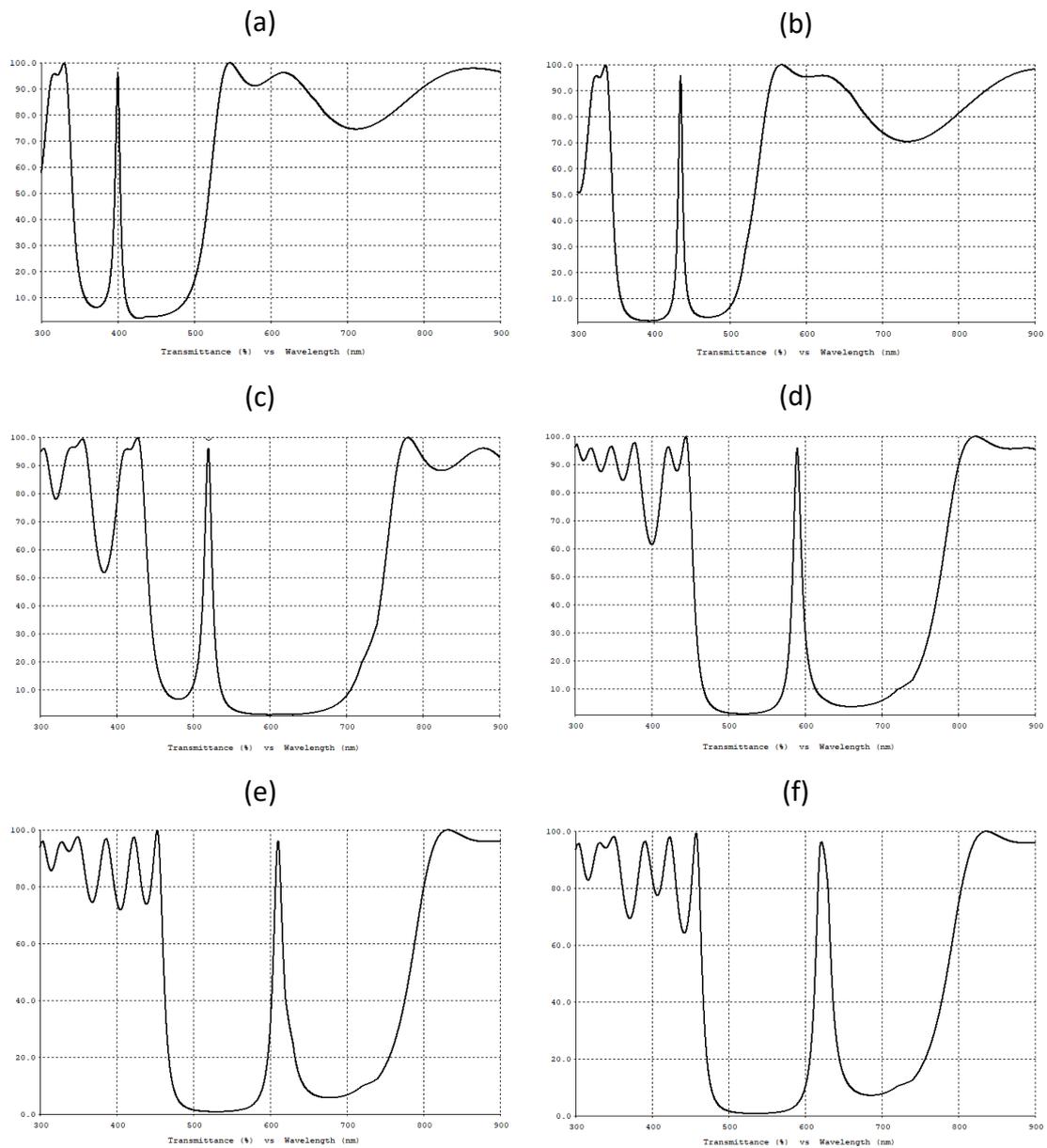
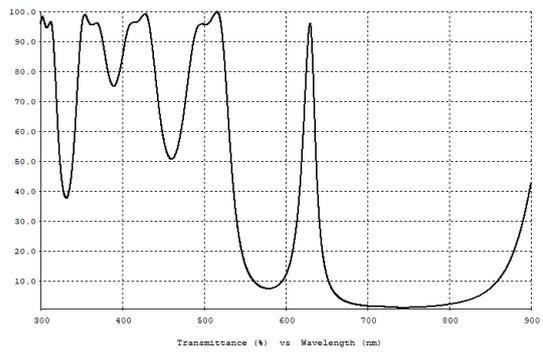


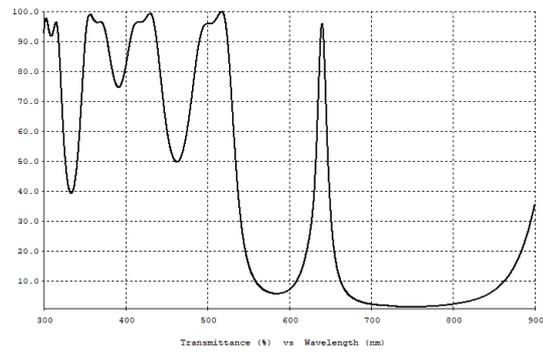
Figura 33: Resposta espectral dos 16 filtros óticos simulados, utilizando os índices de refração de [refractiveindex.info](http://refractiveindex.info)<sup>101</sup>. Cada filtro é centrado: (a) 400 nm; (b) 435 nm; (c) 520 nm; (d) 590 nm; (e) 610 nm; (f) 620 nm; (g) 630 nm; (h) 640 nm; (i) 650 nm; (j) 660 nm; (k) 670 nm; (l) 680 nm; (m) 700 nm; (n) 720 nm; (o) 740 nm; (p) 800 nm.



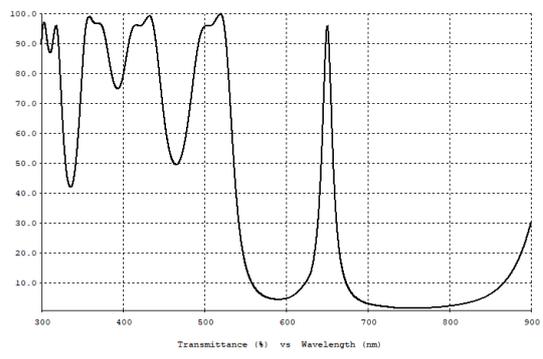
(g)



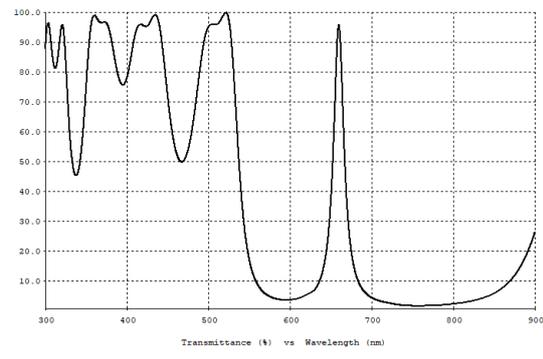
(h)



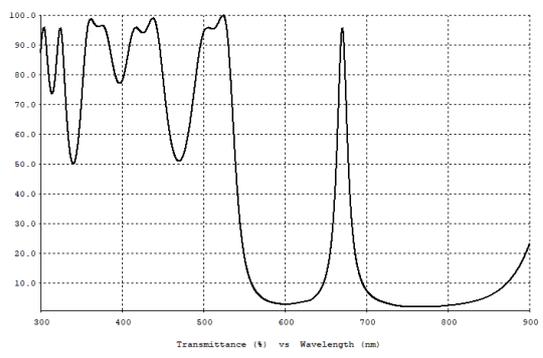
(i)



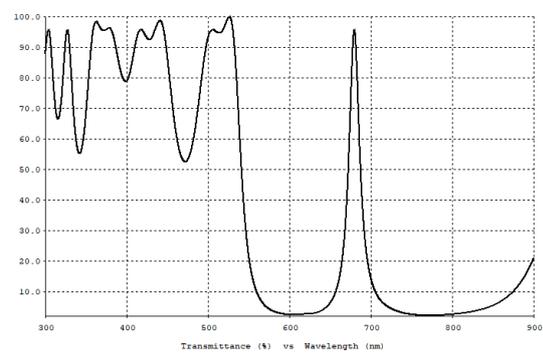
(j)



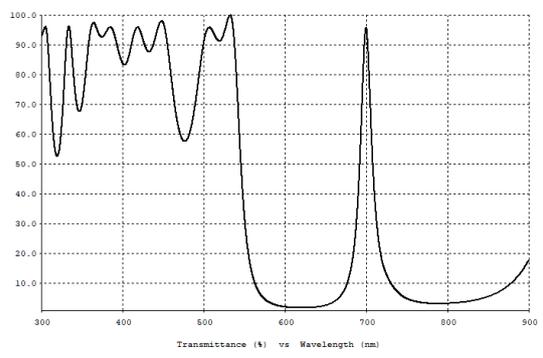
(k)



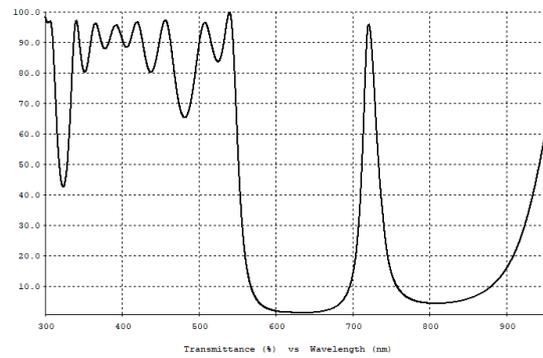
(l)



(m)



(n)



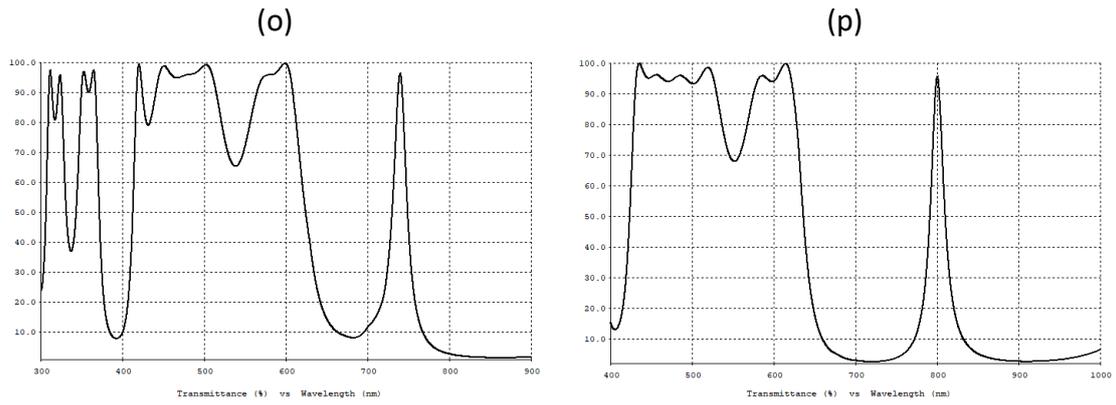
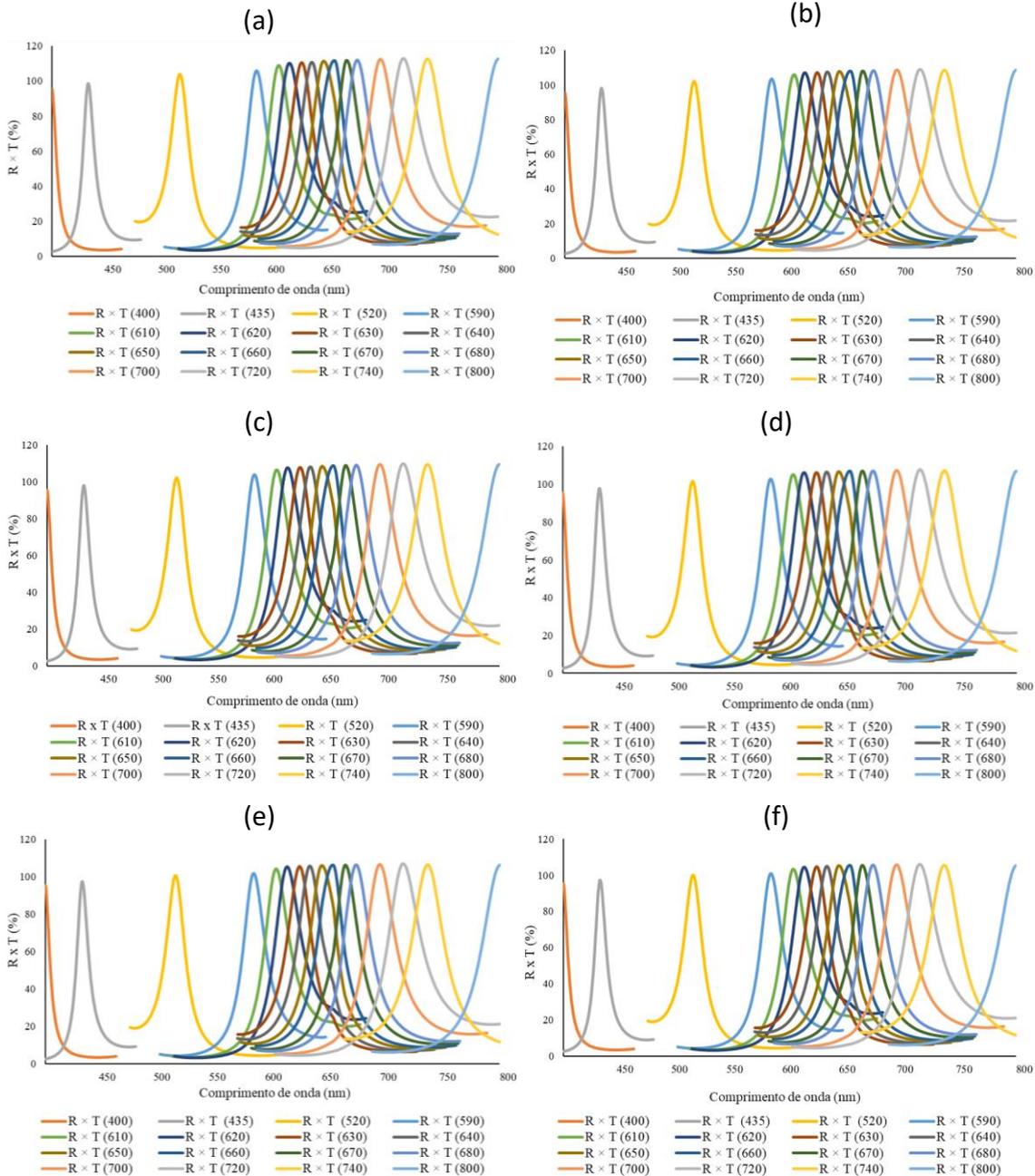


Figura 34: Resposta espectral dos 16 filtros óticos simulados, utilizando os índices de refração experimentais retirados de Pimenta et al.<sup>82</sup>. Cada filtro é centrado: (a) 400 nm; (b) 435 nm; (c) 520 nm; (d) 590 nm; (e) 610 nm; (f) 620 nm; (g) 630 nm; (h) 640 nm; (i) 650 nm; (j) 660 nm; (k) 670 nm; (l) 680 nm; (m) 700 nm; (n) 720 nm; (o) 740 nm; (p) 800 nm.

## ANEXO 3

Espectros resultantes da multiplicação dos espectros de transmitância ótica dos 16 filtros óticos simulados (indicados nas legendas) pelos espectros de refletância de GV saudáveis e GV infetados com diferentes concentrações do parasita da malária em dois estados da doença, em particular o inicial (anéis) e avançado (trofozoitos). Considerou-se, para os resultados seguintes, o conjunto de índices de refração da base de dados *refractiveindex.info*<sup>101</sup>.



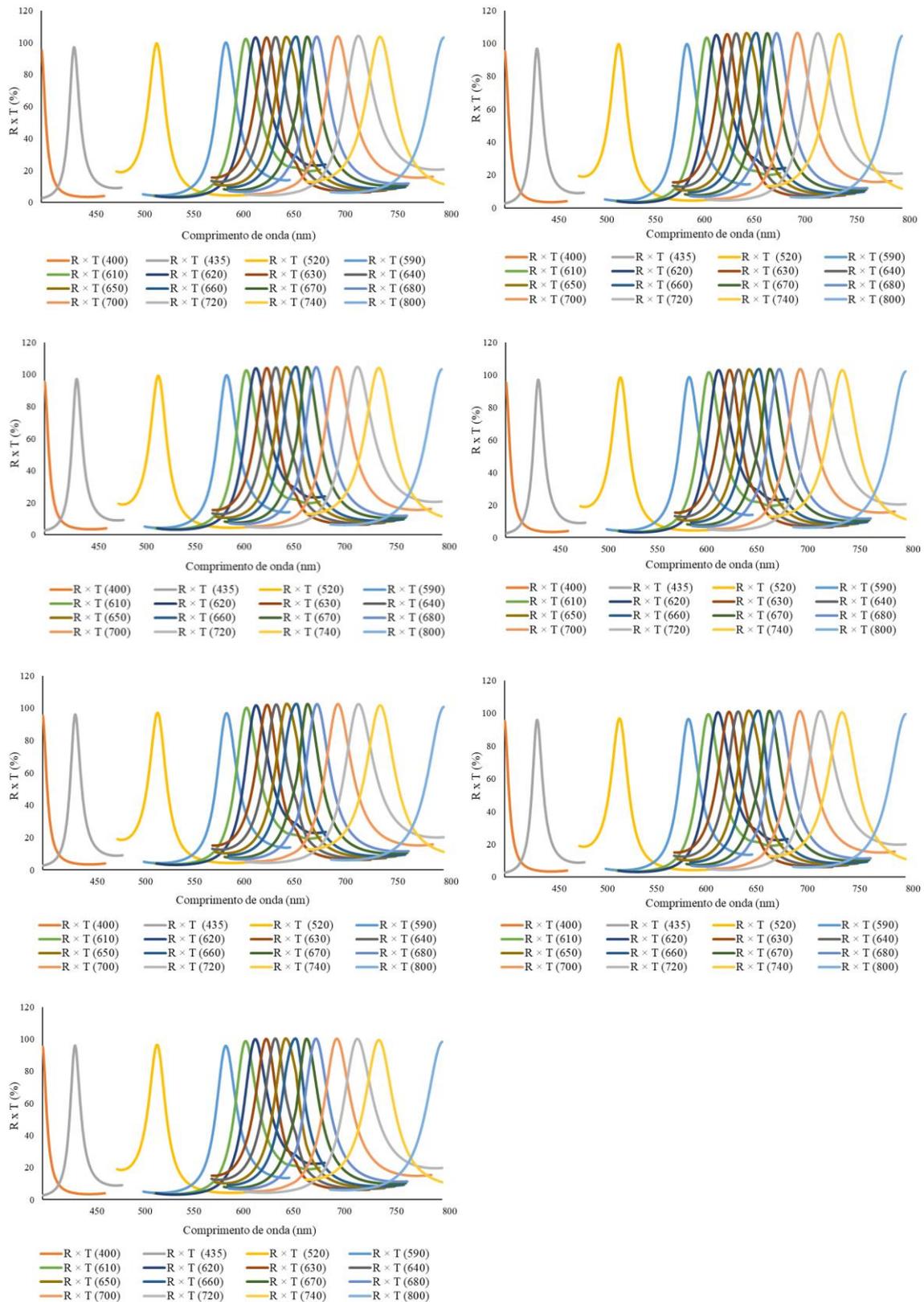


Figura 35: Resposta espectral da multiplicação dos espectros de transmitância dos 16 filtro ótico com os espectros de refletância de GV: (a) saudáveis; (b) com 12 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$  de GV; (c) com 25 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$  de GV; (d) 50 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$  de GV; (e) 125 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$  de GV; (f) 250 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$  de GV; (g) 500 parasitas (anéis)/ $\mu\text{L}$  de GV; (h) 12 parasitas (trofozoítos)/ $\mu\text{L}$  de GV; (i) 25 parasitas (trofozoítos)/ $\mu\text{L}$  de GV; (j) 50 parasitas (trofozoítos)/ $\mu\text{L}$  de GV; (k) 125 parasitas (trofozoítos)/ $\mu\text{L}$  de GV; (l) 250 parasitas (trofozoítos)/ $\mu\text{L}$  de GV; (m) 500 parasitas (trofozoítos)/ $\mu\text{L}$  de GV.

## ANEXO 4

As figuras que se seguem representam os gráficos com as respostas espectrais de transmitância ótica medida para cada um dos 8 filtros óticos experimentais, quando é utilizada a fonte de luz branca e antes de serem aplicados os filtros passa-baixo e passa-alto para retirar o ruído.

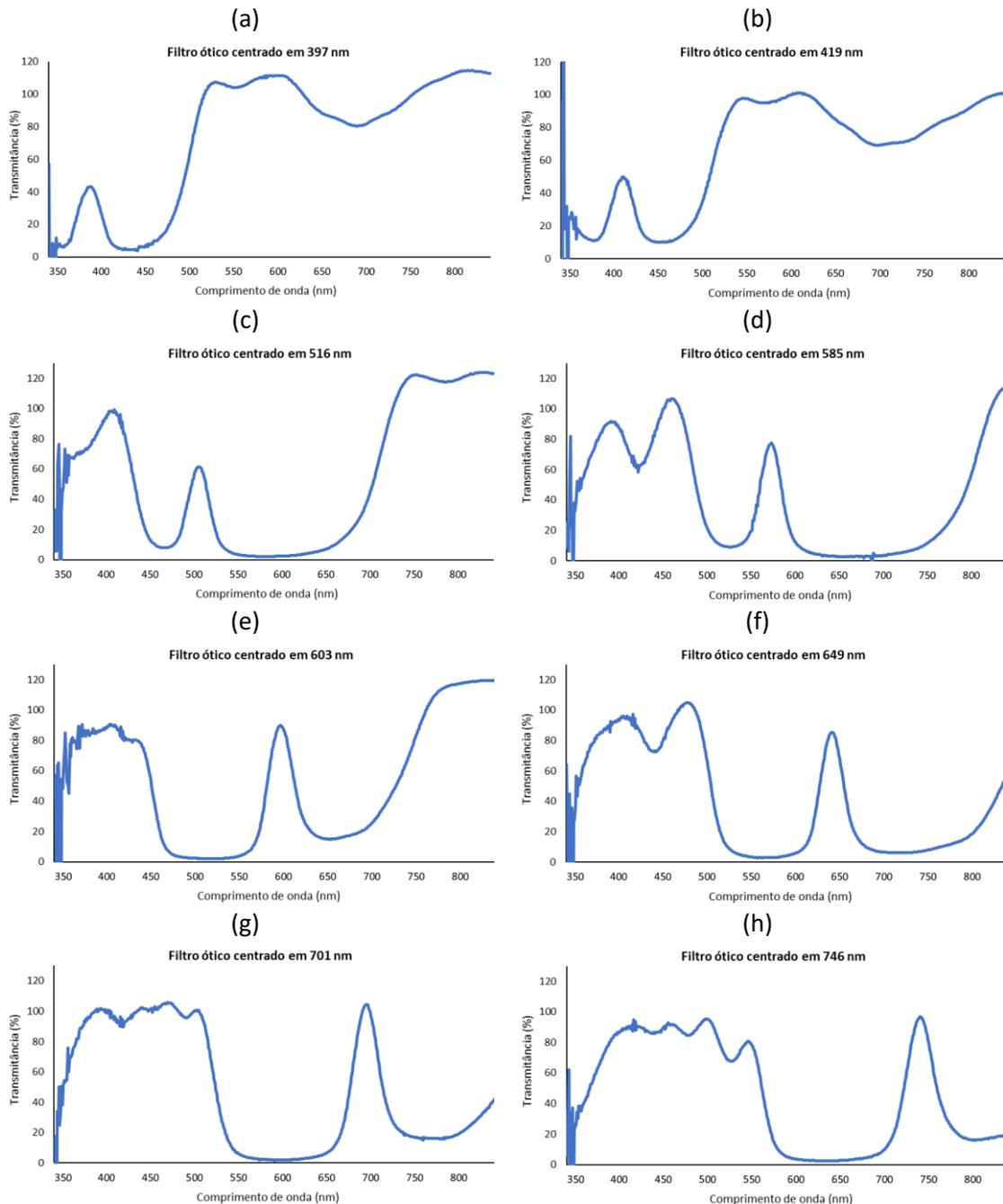
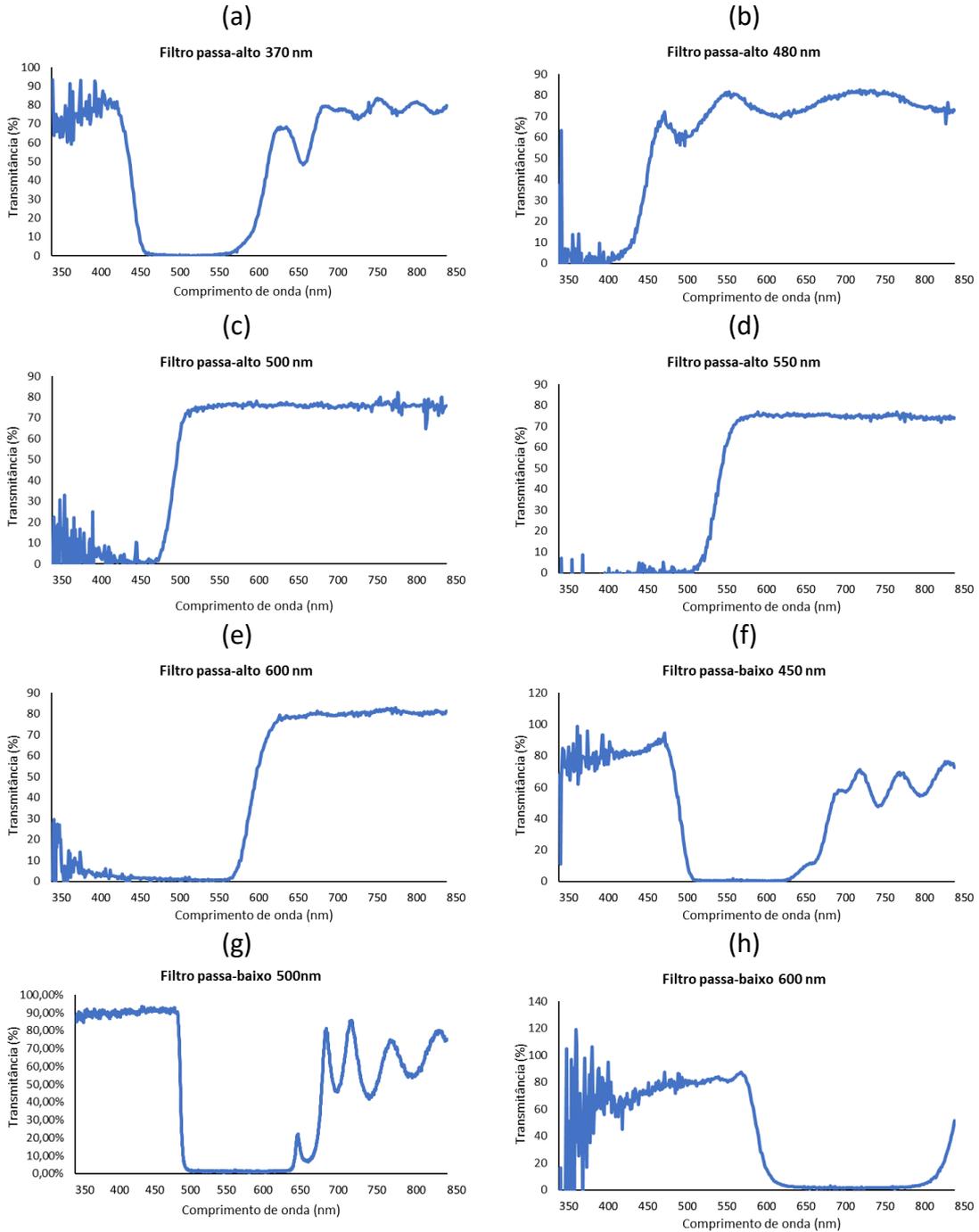


Figura 36: Resposta espectral dos filtros óticos, utilizando a fonte de luz branca. Cada filtro é centrado em: (a) 397 nm; (b) 419 nm; (c) 516 nm; (d) 585 nm; (e) 603 nm; (f) 649 nm; (g) 701 nm; (h) 746 nm.

## ANEXO 5

As figuras que se seguem representam os gráficos com as respostas espectrais de transmitância ótica medida para os filtros passa-alto e passa-baixo comerciais utilizados.



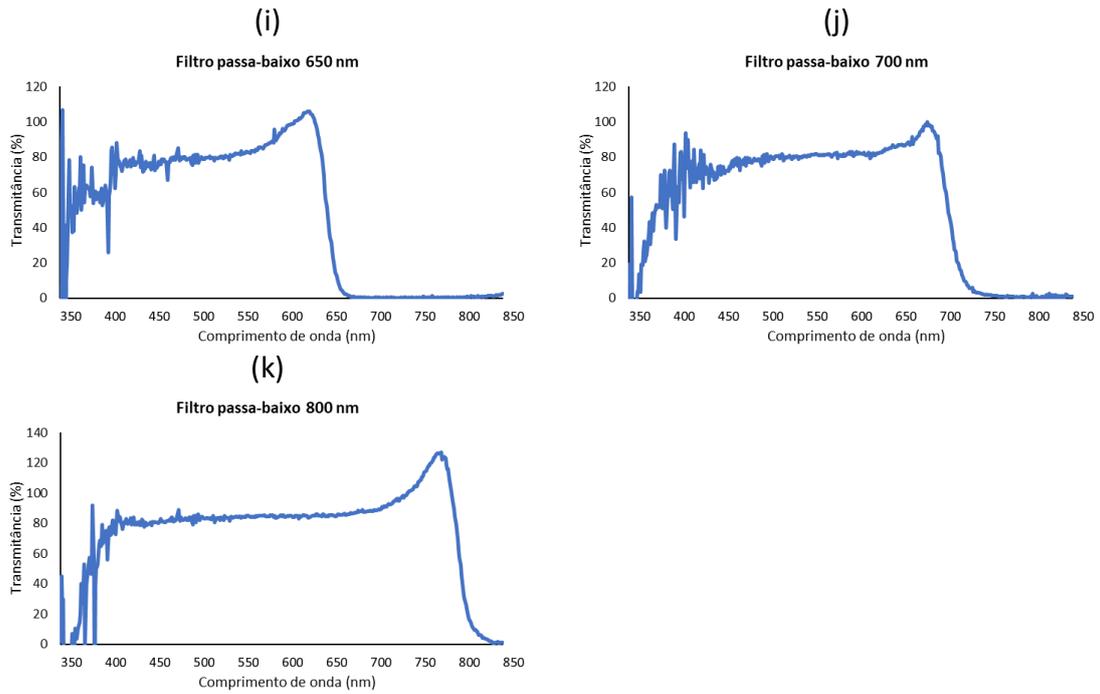


Figura 37: Resposta espectral dos filtros óticos comerciais utilizados: (a) passa-alto centrado em 370 nm; (b) passa-alto centrado em 480 nm; (c) passa-alto centrado em 500 nm; (d) passa-alto centrado em 550 nm; (e) passa-alto centrado em 600 nm; (f) passa-baixo centrado em 450 nm; (g) passa-baixo centrado em 500 nm; (h) passa-baixo centrado em 600 nm; (i) passa-baixo centrado em 650 nm; (j) passa-baixo centrado em 700 nm; (k) passa-baixo centrado em 800 nm.

## ANEXO 6

As tabelas que se seguem apresentam os valores obtidos para a FWHM em cada um dos filtros óticos representados no espectro da figura 25 e 27 (secção 5.2.1. e 5.2.2), respetivamente.

*Tabela 10: Cálculo da FWHM do espectro de máxima transmitância para cada um dos 8 filtros óticos experimentais, quando utilizada a fonte de luz branca.*

	Comprimento de onda (nm)							
<b>Filtro ótico</b>	397	419	516	585	603	649	701	746
<b>Metade do valor do pico máximo (a.u.)</b>	0,07	0,169	0,239	0,329	0,329	0,169	0,382	0,421
<b>FWHM (nm)</b>	18	28	33	32	38	28	32	41

*Tabela 11: Cálculo da FWHM do espectro de máxima transmitância para cada um dos 8 filtros óticos experimentais, quando utilizada a placa de 13 LEDs como fonte de luz.*

	Comprimento de onda (nm)							
<b>Filtro ótico</b>	397	419	516	585	603	649	701	746
<b>Metade do valor do pico máximo (a.u.)</b>	NA	0,299	0,209	0,214	0,257	0,308	0,196	0,337
<b>FWHM (nm)</b>	NA	16	20	21	23	22	27	NA