



Duarte Nuno Araújo Lima

**Sistema Miniaturizado para a Detecção de Hemozoína por Reflectância Ótica**

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia







**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Duarte Nuno Araújo Lima

## **Sistema Miniaturizado para a Detecção de Hemozoína por Reflectância Ótica**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Integrado em Engenharia Eletrónica Industrial e Computadores

Trabalho efetuado sob a orientação da

Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas

Doutora Susana Oliveira Catarino

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

**Nome:** Duarte Nuno Araújo Lima

**Título da dissertação:** Sistema miniaturizado para deteção de hemozoína por refletância ótica

**Orientadores:** Professora Doutora Graça Maria Henrique Minas e Doutora Susana Oliveira Catarino

**Ano de conclusão:** 2022

**Designação do mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Electrónica Industrial e Computadores

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositoriUM 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 agradecer à minha orientadora, Doutora Susana Catarino, pela orientação proporcionada ao longo do trabalho, pelo incentivo e pela disponibilidade para me auxiliar a nível prático e teórico bem como pelo acompanhamento constante, pelas sugestões e discussões, fundamentais para a elaboração deste trabalho.

Agradeço também à Professora Doutora Graça Minas pela ajuda e acompanhamento durante o desenvolvimento de todo o trabalho, que se revelaram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Carlos, Júlio e Hugo, o meu agradecimento por toda a ajuda dada no trabalho laboratorial.

Aos amigos agradeço, essencialmente, a amizade e o apoio ao longo do percurso académico bem como as dicas sempre que alguma dúvida surgiu.

Por último agradeço à minha família por todo o apoio e incentivo que sempre mostraram em todas as minhas decisões.

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

NORTE-01-0145-FEDER-028178



## Declaração de Integridade

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

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

Universidade do Minho,

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

## RESUMO

A malária é uma doença infecciosa que é transmitida para humanos através da picada de um mosquito, maioritariamente em regiões tropicais, e que ainda mata mais de 400 mil pessoas por ano. O diagnóstico da malária é tipicamente baseado em testes de diagnóstico rápido e em microscopia. No entanto, estes métodos implicam a necessidade de amostras de sangue do paciente e não permitem detetar baixa parasitemia, no caso de indivíduos assintomáticos. Deste modo, é necessário desenvolver novos métodos de diagnóstico precisos, portáteis, de baixo custo, independentes do utilizador, idealmente não invasivos e que permitam a deteção do parasita na fase inicial da doença.

Assim, a presente dissertação integra um projeto de investigação que tem como principal objetivo desenvolver um método de deteção de malária através da identificação de hemozoína, de modo não invasivo, diretamente na pele do paciente, e baseado em reflectância ótica. Neste trabalho, propõe-se o desenvolvimento de um sistema ótico em placa de circuito impresso, composto por uma placa da emissão, com díodos emissores de luz atuados por *Pulse Width Modulation*, com espectro de emissão entre 400 e 800 nm, e um sistema de deteção, composto por fotodíodos e um amplificador *lock-in*. No trabalho é também apresentada a aquisição de sinal por parte de um microcontrolador para análise dos resultados, assim como uma proposta de encapsulamento para todo o sistema.

O sistema desenvolvido foi testado em duas configurações espectrofotométricas, uma de absorbância ótica e outra de reflectância, reconstruindo o espectro ótico de amostras de hemozoína sintética, com base em 8 comprimentos de onda específicos (397, 419, 516, 585, 603, 649, 701 e 746 nm). Os resultados mostram que o sistema é capaz de emitir luz com boa intensidade, com um consumo de potência máximo estimado de 468 mW. Observou-se ainda que o sistema de absorbância ótica foi capaz de distinguir os espectros óticos de hemozoína sintética até uma concentração mínima de 1 µg/mL. O sistema de reflectância, apesar de apresentar limitações, também foi capaz de detetar variações na reflexão total da luz em função da concentração de hemozoína. Os resultados mostram que existe potencial para o uso da espectrofotometria, de absorbância e de reflectância, para a deteção de hemozoína e para a integração num dispositivo inovador e não invasivo para diagnóstico de malária.

Palavras-chave: absorbância, díodos emissores de luz, hemozoína, malária, reflectância

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease, transmitted to humans through the bite of a mosquito, mostly in tropical regions, and still kills more than 400.000 people every year. Malaria diagnosis is typically based on rapid diagnostic tests and microscopy. However, these methods require blood samples from the patient and cannot detect low parasitemia in asymptomatic individuals. Thus, it is necessary to develop new accurate, portable, low-cost, user-independent, ideally non-invasive diagnostic methods that allow the detection of the parasite at low parasitemia.

Thus, this dissertation is part of a research project whose main goal is to develop a method for malaria detection through the identification of hemozoin, in a non-invasive way, directly on the patient's skin, and based on optical reflectance. In this work, it is proposed the development of an optical system in a printed circuit board, composed of an emission board, with light emitting diodes actuated by Pulse Width Modulation, with an emission spectrum between 400 and 800 nm, and a detection system, comprised by photodiodes and a lock-in amplifier. The work also presents the signal acquisition, by a microcontroller, to analyze the results, as well as a proposal of encapsulation for the whole system.

The developed system was tested in two spectrophotometric configurations, one of optical absorbance and the other of reflectance, reconstructing the optical spectrum of synthetic hemozoin samples, based on 8 specific wavelengths (397, 419, 516, 585, 603, 649, 701 and 746 nm). The results show that the system can emit light with good intensity, with an estimated maximum power consumption of 468 mW. It was also observed that the optical absorbance system was able to distinguish the optical spectra of synthetic hemozoin up to a minimum concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The reflectance system, despite presenting limitations, also allowed to detect variations of the total light reflection for different hemozoin concentrations. The obtained results show that there is potential for the use of both absorbance and reflectance spectrophotometry for the detection of hemozoin and integration into an innovative, non-invasive device for malaria diagnosis.

Keywords: absorbance, hemozoin, light emitting diodes, malaria, reflectance



# ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xv
1. Introdução.....	16
1.1 Enquadramento.....	16
1.2 Motivação.....	19
1.3 Objetivos.....	20
1.4 Estrutura da Dissertação.....	21
2. Estado da Arte.....	22
2.1 Diagnóstico Convencional de Malária.....	22
2.1.1 Diagnóstico Clínico.....	23
2.1.2 Microscopia Ótica.....	23
2.1.3 Diagnóstico por Microscopia de Fluorescência.....	23
2.1.4 Diagnóstico Molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	24
2.1.5 Testes de Diagnóstico Rápido (RDT).....	24
2.2 Diagnóstico Baseado em Quantificação de Hemozoína.....	25
2.2.1 Métodos Magnéticos.....	25
2.2.2 Métodos Fotoacústicos.....	26
2.2.3 Métodos de Absorbância Ótica.....	26
2.2.4 Reflectância Ótica.....	28
2.3 Microdispositivos Baseados em Espectrofotometria.....	29
2.3.1 Microdispositivos em Análises Clínicas.....	31
2.3.2 Microdispositivos em Tipagem Sanguínea.....	32
2.3.3 Microdispositivos em Diagnóstico de Cancro.....	33
3. Métodos e Implementação.....	36

3.1	Sistema de Iluminação .....	36
3.1.1	Placa de Emissão de Luz 1 .....	37
3.1.2	Placa de Emissão de Luz 2 .....	39
3.1.3	Placa de Emissão de Luz 3 .....	41
3.2	Sistema de Aquisição e Tratamento de Sinal.....	43
3.2.1	Fotodíodo .....	43
3.2.2	Circuito de Transimpedância.....	45
3.2.3	Amplificador <i>Lock-In</i> .....	46
3.2.4	Desenho das PCB de aquisição e tratamento de sinal e do encapsulamento do protótipo 62	
3.3	Montagens experimentais utilizadas para a caracterização dos circuitos de emissão ótica ..	67
3.3.1	<i>Setup</i> Espectrofotométrico .....	67
3.3.2	<i>Powermeter</i> para medição da densidade ótica .....	68
4.	Resultados.....	69
4.1	Caracterização Experimental das Placas de Emissão Ótica.....	69
4.1.1	Caracterização Experimental da Placa de Emissão de Luz 1 .....	69
4.1.2	Caracterização Experimental da Placa de Emissão de Luz 2 .....	71
4.1.3	Caracterização Experimental da Placa de Emissão de Luz 3 .....	74
4.2	Caracterização Experimental do Sistema em Absorbância Ótica .....	76
4.3	Caracterização Experimental do Sistema em Reflectância Ótica .....	81
5.	Conclusões e Trabalhos Futuros.....	84
5.1	Conclusões .....	84
5.2	Trabalhos futuros .....	85
	Bibliografia .....	87
	Anexo I – <i>Datasheet</i> dos Componentes eletrónicos.....	91
	Anexo II – Código implementado em arduino para a alimentação dos LEDs.....	94

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo da malária. Adaptado de [3], créditos da imagem <i>Genome Research Limited</i> . ....	17
Figura 2 - Distribuição dos casos de malária pelos países onde existem casos da infecção [4], <i>COPYRIGHT World Health Organization, 2021 - License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO</i> .....	18
Figura 3 - Distribuição mundial da incidência da malária por cada 1000 habitantes [5], <i>COPYRIGHT World Health Organization, 2021 - License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO</i> .....	18
Figura 4 – Desenho CAD do protótipo desenvolvido para diagnóstico de malária por métodos magnéticos, adaptado de [13], com a permissão <i>Copyright 2021 da American Chemical Society</i> .....	25
Figura 5 - Protótipo experimental desenvolvido e diagrama de blocos do método fotoacústico para a detecção de hemozoína. Partilhado de [15], com autorização da PCM através de uma licença <i>Creative Commons</i> . ....	26
Figura 6 - Desenho CAD do protótipo desenvolvido para o método de absorbância. Adaptado de Catarino et al. [14], <i>Copyright © 2020, IEEE</i> . ....	27
Figura 7 - Espectros de reflectância contínuos de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados, cultivados in vitro, com diferentes parasitemias (12,5 a 50 parasitas/ $\mu$ L de glóbulos vermelhos) de <i>P. falciparum</i> , nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoitos) da doença. Reproduzido de [20], com autorização da MDPI através de uma licença <i>Creative Commons CC BY</i> .....	29
Figura 8 - Estrutura básica de um sistema espectrofotométrico. Adaptado de [21], com autorização da <i>The LibreTexts</i> através de uma licença <i>CC BY-NC-SA 3.0</i> . ....	30
Figura 9 - Sistema miniaturizado implementado por Pimenta <i>et al.</i> Reproduzido de [34], com autorização da MDPI através de uma licença <i>Creative Commons CC BY</i> .....	34
Figura 10 – Sistema desenvolvido por Lee et al. para o estudo de prova de conceito para a detecção do cancro pancreático. Partilhado de [36], com a autorização da Science através de uma licença <i>Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC)</i> . ....	35
Figura 11 - Esquemático do circuito utilizado para a alimentação dos emissores de luz. ....	37
Figura 12 - Esquemático do posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 1. ....	38
Figura 13 – a) Layout da PCB desenhada com auxílio do programa PADS para a Placa de Emissão 1. b) Fotografia da placa desenvolvida.....	39
Figura 14 - Esquemático do posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 2. ....	40

Figura 15 – a) Esquemático da Placa de Emissão 2 implementada, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de iluminação desenvolvida. ....	41
Figura 16 - Esquemático do posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 3. ....	42
Figura 17 - a) Esquemático da Placa de Emissão 3 implementada, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de iluminação desenvolvida e alimentada pelo Arduino. ....	42
Figura 18 – Sensibilidade espectral relativa (%) do fotodiodo BPW 34 BS da OSRAM [38]. ....	44
Figura 19 – Corrente de saída ( $\mu\text{A}$ ) do fotodiodo BPW 34 BS da OSRAM em função do <i>duty cycle</i> (%) aplicado na placa de iluminação, para cada um dos LEDs da placa de emissão. ....	44
Figura 20 - Esquemático do circuito de transimpedância dimensionado. ....	46
Figura 21 – Esquemático do amplificador <i>lock-in</i> implementado. ....	47
Figura 22 – Esquemático do filtro passa banda de 2ª ordem dimensionado. ....	48
Figura 23 – Fator de qualidade do filtro passa alto [39]. ....	48
Figura 24 - Circuito do filtro passa alto dimensionado, implementado no programa de simulação NI Multisim 14.0. ....	49
Figura 25 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa alto de 2ª ordem. ....	50
Figura 26 - Fator de qualidade do filtro passa baixo [39]. ....	50
Figura 27 - Circuito implementado no programa NI Multisim 14.0 para a realização da simulação do filtro passa baixo de 2ª ordem. ....	51
Figura 28 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa baixo de 2ª ordem. ....	52
Figura 29 - Circuito implementado no programa NI Multisim 14.0 para a realização da simulação do filtro passa banda. ....	52
Figura 30 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa banda. ....	53
Figura 31 - Diagrama de blocos do multiplicador AD633JN. ....	53
Figura 32 - Circuito utilizado para simulação do integrado AD633JN. ....	54
Figura 33 - Simulação do multiplicador AD633JN para duas entradas iguais constituídas por duas ondas sinusoidais com uma amplitude de 10 V de pico e com uma frequência de 490 Hz. ....	55
Figura 34 - Simulação do multiplicador para duas entradas com frequências diferentes. ....	55
Figura 35 - Teste experimental do circuito multiplicador com duas entradas iguais de 500 Hz de frequência e 3 V de amplitude. ....	56

Figura 36 - Esquemático do filtro passa baixo dimensionado. ....	57
Figura 37 - Circuito implementa no programa NI Multisim 14.0 para a realização da simulação do filtro passa baixo de 2ª ordem. ....	57
Figura 38 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa baixo de 2ª ordem. ....	58
Figura 39 - Esquemático do amplificador inversor dimensionado. ....	58
Figura 40 - Circuito implementado no NI Multisim 14.0 para a simulação do amplificador inversor. ...	59
Figura 41 - Simulação do amplificador inversor no NI Multisim 14.0.....	59
Figura 42 - Circuito realizado em NI Multisim 14.0 para o teste do amplificador <i>lock-in</i> dimensionado. ....	60
Figura 43 – Simulação do amplificador <i>lock-in</i> para uma onda de entrada de 490 Hz e 0,1 V, e ruído de 4000 Hz e 0,05 V. a) Entrada, saída do 1º amplificador inversor e saída do filtro passa banda. b) Onda de referência, onda de saída do multiplicador e onda de saída do filtro passa banda. d) Saída do multiplicador, saída do filtro passa baixo de 2ª ordem e saída do 2º amplificador inversor, correspondente à saída do amplificador <i>lock-in</i> . ....	61
Figura 44 – Simulação do amplificador <i>lock-in</i> para uma onda de entrada de 490 Hz e 0,1 V, e com uma componente adicionada de 10 Hz e 0,05 V. a) Entrada do amplificador <i>lock in</i> (escala de tempo alargada para visualização da oscilação de baixa frequência). b) Entrada, saída do 1º amplificador inversor e saída do filtro passa banda. c) Onda de referência, onda de saída do multiplicador e onda de saída do filtro passa banda. d) Saída do multiplicador, saída do filtro passa baixo de 2ª ordem e saída do 2º amplificador inversor, correspondente à saída do amplificador <i>lock-in</i> . ....	62
Figura 45 - a) Esquemático da PCB do circuito de aquisição e tratamento de sinal implementado, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de aquisição e tratamento de sinal desenvolvida, com dimensão total de 10 cm x 8,3 cm. ....	63
Figura 46 – Proposta de encapsulamento para os testes a realizar para a absorbância com a Placa de Emissão 3 e a placa de aquisição e tratamento de sinal. ....	63
Figura 47 – Fotografias do sistema desenvolvido para a caracterização do sistema na configuração experimental de absorbância ótica. ....	64
Figura 48 - a) Esquemático da PCB do circuito de aquisição e tratamento de sinal implementado, e integrado com o sistema de iluminação, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de aquisição e tratamento de sinal desenvolvida com o sistema de iluminação incorporado (visível no topo da placa), com dimensão total de 10,2 cm x 12,2 cm. ....	65

Figura 49 – Proposta de encapsulamento desenhada em CAD para a PCB que contém o sistema de iluminação e o sistema de aquisição e tratamento de sinal integrados. ....	66
Figura 50 - Fotografias do sistema desenvolvido para a caracterização do sistema em reflectância ótica. ....	66
Figura 51 - Setup experimental utilizado para a medição do espectro de emissão da placa de iluminação. ....	67
Figura 52 - Fotografia do <i>setup</i> experimental utilizado para a medição da densidade de potência ótica (W/cm <sup>2</sup> ). ....	68
Figura 53 -a) Espectro de emissão da Placa de Emissão 1, em que os LEDs de 405 nm, e de 800 nm se encontram atuados com um <i>duty cycle</i> de 99%, e os LEDs visíveis são atuados a 50%. b) Espectro de emissão de toda a placa de iluminação 1, com os LEDs da zona do visível a serem atuados com 1% de <i>duty cycle</i> , os LEDs de 405 nm atuados com 99% de <i>duty cycle</i> e os LEDs de 800 nm atuados com 99% de <i>duty cycle</i> . ....	70
Figura 54 – Curva dos valores médios de densidade ótica (mW/cm <sup>2</sup> ) medidos no <i>powermeter</i> , para os diferentes LEDs da Placa de Emissão 1. ....	71
Figura 55 – a) Espectro de emissão da Placa de Emissão 2, em que os LEDs de 400 nm, de 810 nm e os LEDs visíveis se encontram atuados com um <i>duty cycle</i> de 99%. b) Espectro de emissão de toda a placa de iluminação 2, com os LEDs da zona do visível a serem atuados com 99% de <i>duty cycle</i> , os LEDs de 400 nm atuados com 1% de <i>duty cycle</i> e os LEDs de 810 nm atuados com 3% de <i>duty cycle</i> . ....	72
Figura 56 – Curva dos valores médios de densidade ótica (mW/cm <sup>2</sup> ) medidos no <i>powermeter</i> , para os diferentes LEDs da Placa de Emissão 2. ....	73
Figura 57 - a) Espectro de emissão da Placa de Emissão 3, em que os LEDs de 400 nm, de 810 nm e os LEDs visíveis se encontram atuados com um <i>duty cycle</i> de 90%. b) Espectro de emissão de toda a placa de iluminação 3, com os LEDs da zona do visível a serem atuados com 21% de <i>duty cycle</i> , os LEDs de 400 nm atuados com 15% de <i>duty cycle</i> e os LEDs de 810 nm atuados com 30% de <i>duty cycle</i> . ..	74
Figura 58 - Curva dos valores médios de densidade ótica (mW/cm <sup>2</sup> ) medidos no <i>powermeter</i> , para os diferentes LEDs da Placa de Emissão 3. ....	75
Figura 59 – Fotografia das amostras de hemozoína sintéticas usadas para a realização dos testes na caracterização experimental do sistema (com concentrações entre 0 e 50 µg/mL), em cuvetes de 1 cm de caminho ótico, para os testes nas montagens experimentais para as configurações em absorvância e em reflectância ótica. ....	77

Figura 60 – Fotografia dos 8 filtros (para os comprimentos de onda de 397 nm, 419 nm, 516 nm, 585 nm, 603 nm, 649 nm, 701 nm e 746 nm), utilizados na caracterização experimental do sistema em absorvância e reflectância ótica, partilhado de [20], com autorização da MDPI através de uma licença <i>Creative Commons CC BY</i> . .....	77
Figura 61 - Transmitância dos 8 filtros, baseados em filmes finos, utilizados nas caracterizações experimentais do sistema, partilhado de [20], com autorização da MDPI através de uma licença <i>Creative Commons CC BY</i> . .....	78
Figura 62 – Medição da transmitância (u.a.) total da amostra em função da concentração de hemozoína, entre os 400 e os 800 nm do espectro ótico. ....	79
Figura 63 – Transmitância (u.a.) das amostras de hemozoína, em função da concentração, para os 8 comprimentos de onda considerados. ....	80
Figura 64 – Variação da transmitância (u.a.) das amostras de hemozoína, em função da concentração, para cada um dos 8 filtros óticos utilizados. ....	80
Figura 65 - Medição da reflectância (u.a.) total da amostra em função da concentração de hemozoína, entre os 400 e os 800 nm do espectro ótico. ....	82
Figura 66 – Espectro de reflectância das amostras de hemozoína sintética com concentrações de 1 µg/ml e 10 µg/ml. ....	83

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Dimensionamento dos circuitos de emissão dos LEDs na Placa de Emissão 1.....	38
Tabela 2 - Dimensionamento dos circuitos de emissão dos LEDs na Placa de Emissão 2.....	40
Tabela 3 – Tensões de saída do amplificador lock-in, nas quais se basearam os cálculos da absorbância ótica.....	78
Tabela 4 - Tensões de saída do amplificador lock-in, nas quais se basearam os cálculos da reflectância ótica.....	81
Tabela 5 - Datasheets dos LEDs utilizados em todas as placas de iluminação.....	91



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

<b>AC</b>	Corrente Alternada
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AO</b>	<i>Acridina Orange</i>
<b>BCP</b>	<i>Benzothiocarboxypurine</i>
<b>CAD</b>	Desenho Assistido por Computador
<b>CMEMS</b>	Unidade de Investigação em Microssistemas Eletromecânicos da Universidade do Minho
<b>CMOS</b>	<i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>Hz</b>	Hemozoína
<b>ICVS</b>	Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde
<b>LED</b>	Díodos Emissores de Luz (do inglês <i>Light Emitting Diodes</i> )
<b>NI</b>	<i>National Instruments</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PCB</b>	Placa de circuito impresso (do inglês <i>Printed Circuit Board</i> )
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PWM</b>	Modulação por largura de pulso (do inglês <i>Pulse Width Modulation</i> )
<b>RDT</b>	Testes de Diagnóstico Rápido (do inglês <i>Rapid Diagnostic Tests</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta

# 1. INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta o enquadramento, objetivos e motivação do trabalho apresentado na presente dissertação, assim como descreve sucintamente a estrutura do documento.

## 1.1 Enquadramento

A malária é uma doença infecciosa fatal transmitida para os humanos, maioritariamente em regiões tropicais, através de mosquitos, sendo estes também os únicos organismos capazes de efetuar a transmissão de infeção entre indivíduos. Este facto foi demonstrado em 1897 por Ronald Ross [1]. Os mosquitos infetados transportam um organismo unicelular, o parasita *Plasmodium*, que passa para a corrente sanguínea humana durante a mordida do mosquito. Existem mais de 100 espécies de *Plasmodium* [1]. Os sintomas da malária incluem febre, dores de cabeça, arrepios, vômitos, dores musculares e fadiga, o que dificulta o diagnóstico, uma vez que podem levar a diagnósticos errados de outras doenças [1].

O parasita da malária sobrevive replicando-se em mosquitos ou humanos num método cíclico de transferência contínua entre as duas espécies. A infeção da malária inicia-se quando um mosquito infetado com o parasita da malária morde um humano e injeta o parasita em forma de esporozoítos no hospedeiro humano. Numa primeira fase, os esporozoítos invadem as células do fígado onde se dividem e crescem até atingir a fase de merozoítos. O parasita, nesta fase, entra na rede sanguínea e invade os glóbulos vermelhos. Este momento em que o parasita passa para a corrente sanguínea inicia o período de doença, onde o paciente infetado começa a ter sintomas. Nos glóbulos vermelhos, os parasitas consomem a maior parte do conteúdo destes, incluindo a hemoglobina (Hb), que é necessária ao seu metabolismo, e passam por uma reprodução assexuada onde se tornam esquizontes maduros. Estes colapsam os glóbulos vermelhos, soltando merozoítos novamente na corrente sanguínea que, por sua vez, invadem mais glóbulos vermelhos, continuando o processo de invasão e rotura dos glóbulos vermelhos. Alguns dos merozoítos saem do ciclo de reprodução assexuada para se desenvolver em gametócitos, a forma sexuada do parasita, na corrente sanguínea. Estes são captados pelos mosquitos que picam um ser humano infetado e, dentro do mosquito, os gametócitos desenvolvem-se para zigotos e por fim para esporozoítos, que são novamente injetados no ser humano e reiniciam o ciclo [2]. Na

figura 1 é possível observar o ciclo de vida do parasita da malária de uma forma resumida e esquematizada.

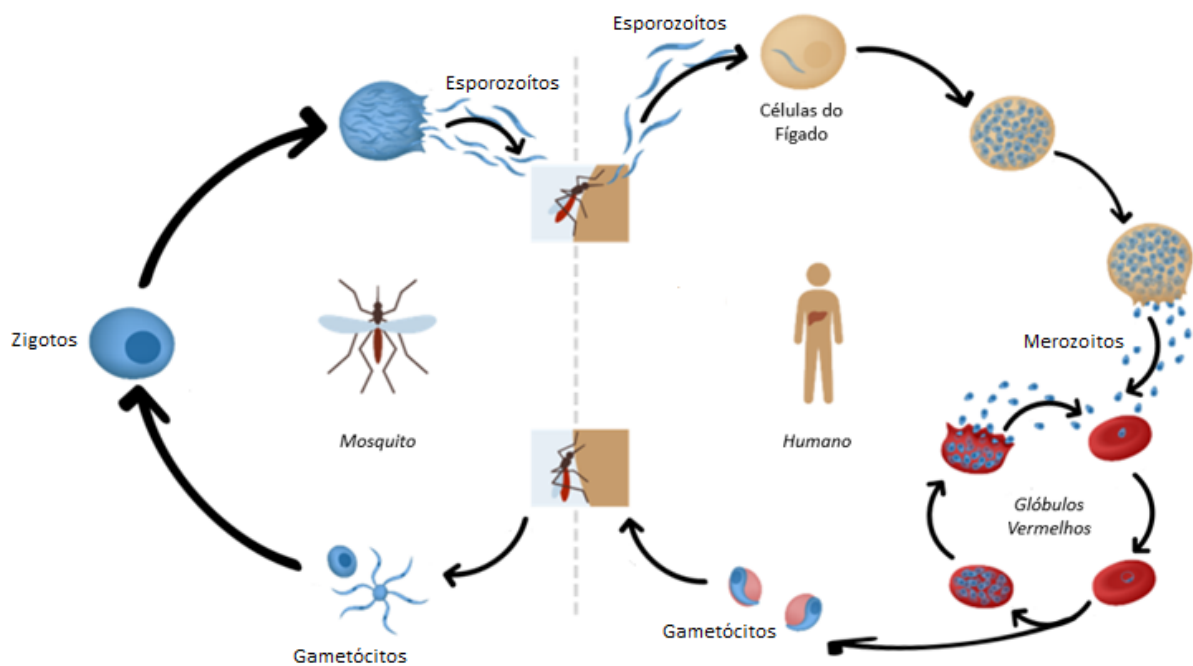


Figura 1 - Ciclo da malária. Adaptado de [3], créditos da imagem *Genome Research Limited*.

Particularmente, quando o parasita *Plasmodium* está presente nos glóbulos vermelhos, origina um conjunto de alterações bioquímicas e morfológicas no interior destas células. A degradação da Hb, como já foi referido, constitui uma das alterações ocorrentes do metabolismo do parasita durante o seu desenvolvimento intracelular. O produto resultante da digestão da Hb é a toxina heme, que será armazenada pelo parasita na sua forma metabolicamente cristalizada, denominada de hemozoína (Hz), uma vez que este não é capaz de a digerir. Esta molécula ferrosa, com propriedades óticas muito específicas, e diferentes das propriedades óticas da hemoglobina, pode servir, por isso, como marcador único para o diagnóstico de malária.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2019 existiram cerca de 229 milhões de casos de malária, espalhados por 87 países, sendo que 95% dos casos de malária se concentram em apenas 29 países, como é possível observar na figura abaixo (figura 2).

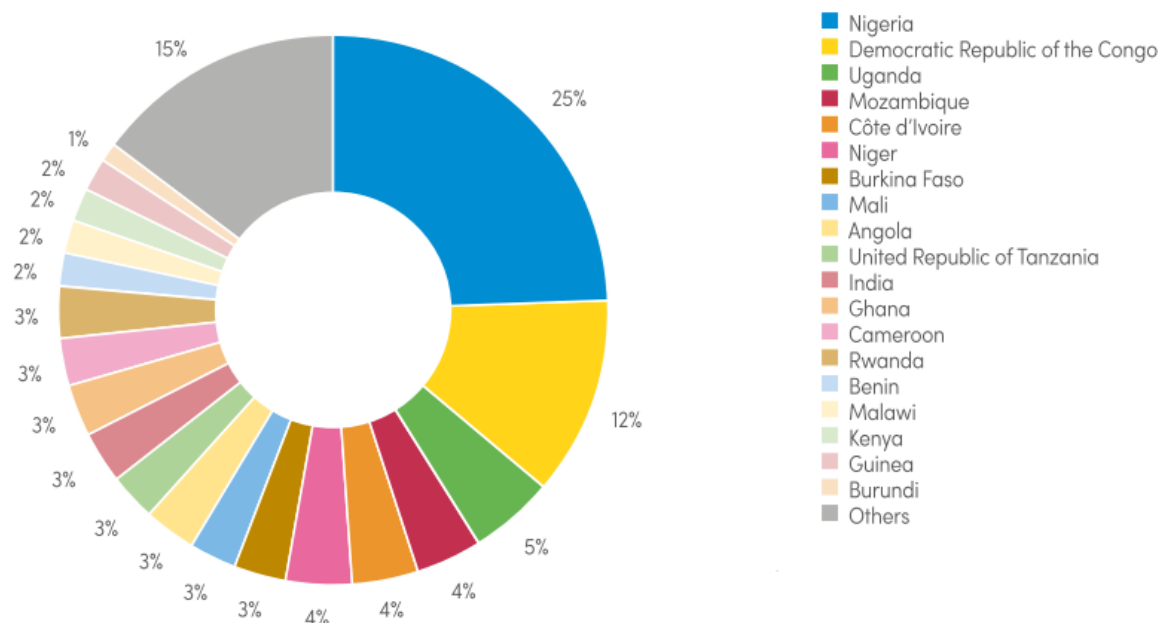


Figura 2 - Distribuição dos casos de malária pelos países onde existem casos da infecção [4], *COPYRIGHT World Health Organization, 2021 - License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*

Em 2019, o número de óbitos causados pela infecção da malária foi de 409 000, sendo que, desse número, 67% (274 030 mortes) ocorreu em crianças com menos de 5 anos. Cerca de 95% das mortes obtidas devido à malária ocorreu em 32 países, estando as maiores percentagens situadas da Nigéria (23%), República Democrática do Congo (11%), Tanzânia (5%), e Burkina Faso, Moçambique e Nigéria com 4% [4].

A figura 3 esquematiza a distribuição mundial da malária, apresentando o número de casos por 1000 habitantes. Observa-se que as regiões mais afetadas pela doença são África, a região sudoeste da Ásia e o Pacífico Ocidental [5].

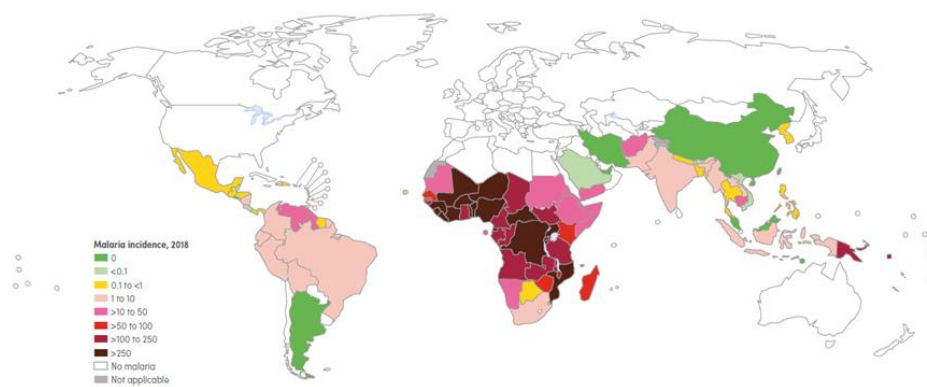


Figura 3 - Distribuição mundial da incidência da malária por cada 1000 habitantes [5], *COPYRIGHT World Health Organization, 2021 - License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.*

A infecção da malária pode ser tratada e prevenida, sendo que uma em cada seis pessoas que vive numa área de alto risco consegue sobreviver à doença. O diagnóstico da malária na sua fase inicial é vital para a prevenção da propagação da doença, pois permite que seja aplicada, atempadamente, medicação antimalárica aos pacientes, de modo a reduzir a mortalidade desta doença.

A mobilidade humana e o turismo também espalharam a malária em todo o mundo, especialmente em locais onde a mesma já tinha sido extinta. Apesar das diversas medidas de controlo e prevenção que são aplicadas, o recente nível elevado de mortalidade que continua a dever-se à malária é atribuído à resistência que o parasita desenvolveu contra os medicamentos e inseticidas existentes. A aprovação por parte da União Europeia da vacina da malária (Mosquirix), em 2015, foi um grande passo para a extinção da infecção da malária [1].

## 1.2 Motivação

Como previamente referido, a malária é uma doença infecciosa que ainda mata quase meio milhão de pessoas por ano. Apesar de existirem atualmente no mercado e sob investigação diversos métodos disponíveis para diagnóstico de malária, como a microscopia ótica, o diagnóstico molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) e vários testes de diagnóstico rápidos (RDT), 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. Deste modo, torna-se urgente o desenvolvimento de novos métodos e 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.

Para este projeto, que se enquadra no projeto de investigação financiado MalariaChip, referência NORTE-01-0145-FEDER-028178, foi proposto o desenvolvimento da eletrónica de iluminação e leitura para um protótipo de um sensor ótico não invasivo, baseado em sinais de espectrofotometria de reflectância ótica, para quantificar a presença de hemozoína, medida diretamente na pele do paciente, de modo a que seja possível diagnosticar malária sem necessidade de recolha de amostras sanguíneas do paciente. O dispositivo, ao ser não invasivo e automático, permitirá levar os testes de diagnóstico a zonas remotas onde, normalmente por falta de condições, é impossível chegarem. De modo a implementar o dispositivo ótico de reflectância, com um limite de deteção que se espera que atinja até 12,5 parasitas/ $\mu$ l de glóbulos vermelhos, comparável com os melhores métodos de diagnóstico no mercado, o sistema ótico deverá incluir díodos emissores de luz (LEDs, do inglês *light emitting diodes*)

para a emissão de luz, uma matriz de fotodíodos para a aquisição da luz refletida, e circuitos para o acondicionamento e processamento dos sinais obtidos. O dispositivo incluirá ainda (não é parte deste projeto), um conjunto de filtros óticos (um filtro para cada um dos fotodíodos da matriz), projetados para selecionar e filtrar a luz em diferentes comprimentos de onda, ajudando a reconstruir, a partir de um número limitado de pontos discretos (16, neste caso), o espectro original de cada amostra [6]. O espectro originado pela reflexão da luz na amostra será específico para a sua composição química e molecular, permitindo distinguir entre amostras saudáveis e com parasitas da malária.

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 outros trabalhos que se baseiem no mesmo princípio. Este trabalho, ao analisar e desenvolver o sistema ótico para aquisição dos sinais de reflectância, consiste num passo essencial para a concretização do objetivo principal do projeto, o que evidencia a sua originalidade.

### **1.3 Objetivos**

O principal objetivo desta dissertação é o desenvolvimento de um protótipo laboratorial de um sensor ótico, baseado em sinais de reflectância ótica, para quantificar a presença de hemozoína em sangue, para auxílio ao diagnóstico não invasivo da malária.

Para a realização do objetivo final desta dissertação será necessário o cumprimento de objetivos intermédios, sendo eles:

- Desenvolvimento e teste de um sistema de iluminação e leitura, composto por LEDs (que emitem luz branca) e fotodíodos;
- Caracterização ótica dos LEDs em termos de espectro e densidade de potência ótica;
- Desenvolvimento da eletrónica de deteção (incluindo dimensionamento de um amplificador *lock-in*), com aquisição por um microcontrolador;
- Desenho de PCBs para implementação do sistema;
- Desenho do encapsulamento do protótipo;
- Teste do protótipo com amostras sintéticas de Hz, oticamente representativas da Hz natural produzida pelos parasitas da malária.

## **1.4 Estrutura da Dissertação**

O primeiro capítulo da dissertação resume os principais objetivos do trabalho realizado, efetuando o seu enquadramento teórico e apresentando a sua motivação. É também, neste capítulo, feito um sucinto resumo sobre a malária, existindo uma breve explicação da origem e transmissão da doença. O último ponto deste capítulo descreve a organização da dissertação.

O segundo capítulo da dissertação incorpora a revisão da literatura que contém informações sobre métodos convencionais para o diagnóstico da malária e métodos baseados em quantificação de hemozoina. Neste capítulo são também descritos vários microdispositivos implementados e publicados na literatura baseados em espectrofotometria, que serviram como ponto de partida para a execução deste trabalho.

No terceiro capítulo encontram-se descritos todos os métodos experimentais para a implementação da solução proposta para o problema.

O quarto capítulo apresenta os resultados experimentais obtidos ao longo do trabalho, bem como a sua discussão.

O quinto capítulo, e último, apresenta as principais conclusões retiradas do trabalho realizado, e propõe algumas sugestões para trabalho futuro a desenvolver, de modo a resolver as limitações do presente trabalho.

## **2. ESTADO DA ARTE**

No capítulo do estado da arte são apresentados, nas primeiras secções, os principais métodos convencionais de diagnóstico da malária. Em seguida, são apresentados, para além dos métodos mais tradicionais, os métodos de diagnóstico da malária baseados na quantificação de hemozoína que se encontram reportados na literatura. Por último, são expostos vários microdispositivos baseados em espectrofotometria, para outras aplicações de diagnóstico, e que servem de ponto de partida para o trabalho desenvolvido nesta dissertação.

### **2.1 Diagnóstico Convencional de Malária**

Existem diversos protocolos estabelecidos e convenções para o diagnóstico da malária que incluem análise microscópica de esfregaços de sangue, testes de diagnóstico rápido (RDT), e técnicas de análise molecular baseadas em ácidos nucleicos (PCR). Estes métodos de diagnóstico mais convencionais, em particular a microscopia ótica, apresentam algumas desvantagens, tais como a necessidade de uma análise em múltiplos passos, o elevado custo dos equipamentos usados para as análises e a necessidade de pessoas qualificadas para a realização dos testes e manuseamento dos equipamentos. Por seu lado, os RDT, apesar de não necessitarem de técnicos especializados nem equipamentos complexos, não apresentam tanta sensibilidade na deteção como os outros métodos, não detetando baixa parasitémia, e têm custo por teste elevado.

Devido às limitações dos RDT para baixas parasitémias (e em casos de ausência de sintomas), a OMS recomenda o uso dos RDT para o diagnóstico da malária apenas para pacientes que apresentem sintomas febris [1]. Deste modo, existe uma necessidade de alternativas para testes para a deteção da malária com alta sensibilidade, rápidos, simples e de baixo custo que possam ser usados em zonas com poucos recursos e que detetem a doença numa fase inicial, antes de começarem a surgir os sintomas.

De uma forma geral, atualmente, é possível detetar a presença de malária em humanos através de diagnóstico clínico e de métodos minimamente invasivos (implicando picada do dedo), quer tendo por base a microscopia (análise de amostras de sangue ao microscópio), quer por testes rápidos de diagnóstico. Apesar de estes métodos serem os mais comumente utilizados, têm vindo também a ser estudados métodos alternativos de diagnóstico que possam ultrapassar as limitações dos métodos mais utilizados, como por exemplo testes moleculares, magnéticos, óticos ou fotoacústicos, capazes de detetar a presença de hemozoína nos glóbulos vermelhos.



### 2.1.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico da malária baseado em observação clínica dos sintomas por parte de um médico é o método preliminar de diagnóstico, sendo usado antes de outros testes para determinar uma probabilidade do paciente ter infecção da malária. Em áreas onde não existem outros recursos disponíveis, o diagnóstico clínico é o único método utilizado. O diagnóstico clínico consiste na análise do historial médico do paciente e na análise física do mesmo para que seja possível determinar a causa dos sintomas apresentados. Uma das maiores dificuldades para o diagnóstico da malária usando este método é o facto dos sintomas apresentados pelos pacientes não serem específicos, podendo o diagnóstico ser facilmente confundido com uma gripe ou infecção bacteriana, entre outras doenças, o que leva à utilização desnecessária de medicação antimalárica [2].

### 2.1.2 Microscopia Ótica

Este método consiste em retirar uma amostra de sangue ao paciente e enviar para um laboratório de modo a analisar a mesma num microscópio ótico. Através da observação dos glóbulos vermelhos e da presença de cristais de hemozoína, é possível a quantificação e distinção de espécies, obtendo-se posteriormente o diagnóstico [1]. A microscopia possui algumas características desejáveis, sendo elas o baixo custo e a especificidade e sensibilidade alta. Contudo, existem vários inconvenientes na utilização deste método, uma vez que é lento, exige deslocamento das amostras até um laboratório (sendo difícil de implementar nas regiões endémicas mais remotas), implica equipamento laboratorial e um técnico especializado, o que pode levar a uma interpretação subjetiva dos resultados. A qualidade do diagnóstico é altamente dependente da experiência do técnico que efetua o teste. Em média, por microscopia, conseguem-se detetar cerca de 50 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue. Um técnico altamente especializado pode conseguir atingir limites de deteção até 10 vezes melhores (5-10 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue).

### 2.1.3 Diagnóstico por Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência consiste num caso particular de microscopia, usada em laboratório para identificação de malária. Certas substâncias coloridas (corantes, que podem ser naturais ou sintéticos) têm uma afinidade com o núcleo ácido dos parasitas da malária, sendo que, em contacto com estes, se irão anexar aos mesmos. Quando excitados com luz ultravioleta (UV) a um determinado comprimento de onda, os núcleos dos parasitas irão brilhar. Os dois fluorocromos mais utilizados para este propósito são o *acridina orange* (AO) e o *benzothiocarboxypurine* (BCP), que são ambos excitados a

490 nm e exibem uma cor verde maçã ou amarelo fluorescente [7]. Com experiência, é possível detectar rapidamente parasitas usando métodos que envolvem fluorescência. No entanto, devido à exigência de equipamento laboratorial, este método não é usado para diagnóstico em campo, sendo usado apenas em investigação laboratorial.

#### 2.1.4 Diagnóstico Molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Um outro método de diagnóstico da malária em laboratório é baseado em análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR), consistindo na detecção de sequências ácido-nucleicas específicas do parasita de *Plasmodium*. Nas técnicas de detecção de sequências ácido-nucleicas, dois iniciadores oligonucleicos, que flanqueiam a sequência de *Plasmodium* pretendida, e TAQ polimerase são usados em sucessivos ciclos de ácido desoxirribonucleico (ADN) para gerar e multiplicar cópias da sequência alvo. A sequência desejada, que se encontra ampliada, é então detectada por sondas internas ou analisada por eletroforese em gel.

A maior vantagem de usar técnicas de sequências ácido nucleicas para a detecção da malária, é a possibilidade de detecção da infecção em pacientes com baixo nível de parasitas. A título de exemplo, infecções com um nível de 5 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue podem ser detectadas com 100% de especificidade [8]. Contudo, o elevado custo dos testes e a necessidade de equipamento e técnicos altamente especializados impedem a utilização de PCR em campo e regiões remotas, não sendo usado por isso em diagnóstico de rotina, mas apenas para fins de investigação.

#### 2.1.5 Testes de Diagnóstico Rápido (RDT)

Os testes de diagnóstico rápido são altamente recomendados para o diagnóstico da malária em ambientes com recursos reduzidos, em alternativa ou como complemento à microscopia, uma vez que é possível obter resultados rapidamente, não é necessário ter pessoas altamente qualificadas para ser usado e são de fácil interpretação e operação [1]. Estes testes, baseados em métodos imunocromatográficos, dependem da migração de líquido através da superfície de uma membrana de nitrocelulose [7]. Estes testes usam antigénios que são direcionados para algumas proteínas que resultam da presença do parasita da malária na corrente sanguínea [2]. Os RDT têm uma sensibilidade comparável com a microscopia (limites de detecção de cerca de 50-100 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue) e podem ser utilizados na maioria dos locais remotos. Porém, os RDT são caros (apesar de o dispositivo ser barato,

este é descartável, tendo por isso um custo por teste elevado) e não permitem a quantificação de parasitas, apenas a deteção qualitativa da presença dos mesmos.

## 2.2 Diagnóstico Baseado em Quantificação de Hemozoína

Além dos métodos convencionais clássicos (microscopia, RDT e PCR), nos últimos anos, muitos investigadores têm vindo ainda a explorar o potencial de Hz no diagnóstico de malária [9], focando-se nas suas propriedades magnéticas [10], superparamagnéticas [11], acústicas [12] ou óticas [13][14].

### 2.2.1 Métodos Magnéticos

Os testes magnéticos para a deteção da malária baseiam-se no facto do parasita da malária produzir hemozoína, um subproduto do seu ciclo de vida dentro da corrente sanguínea. A hemozoína, sendo um composto ferroso, possui propriedades magnéticas que podem ser usadas no diagnóstico da malária. No sistema proposto por McBirney et al. (2018) [13], para realizar o teste, é necessário retirar uma amostra de sangue do paciente e apontar um laser a 635 nm sobre a mesma, para que seja possível medir a intensidade de luz que a atravessa. Posteriormente, um íman é posicionado próximo da amostra, o que irá atrair, alinhar e direccionar as moléculas de hemozoína. Em seguida, será novamente apontado um laser sobre a amostra. A intensidade de luz que atravessa a amostra é novamente medida e se existir uma maior intensidade na segunda medição do que na primeira, é indicativa de que o paciente contém hemozoína na corrente sanguínea (a hemozoína possui um tom escuro que dificulta a passagem da luz) [13]. A figura 4 apresenta um desenho CAD (desenho assistido por computador) de um protótipo desenvolvido pelos autores.

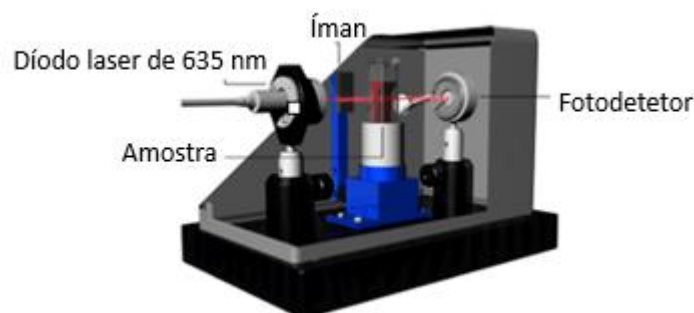


Figura 4 – Desenho CAD do protótipo desenvolvido para diagnóstico de malária por métodos magnéticos, adaptado de [13], com a permissão *Copyright 2021 da American Chemical Society*.

### 2.2.2 Métodos Fotoacústicos

Diversos autores têm vindo a desenvolver métodos fotoacústicos para diagnóstico de malária não invasivo, baseados, por exemplo, em nanobolhas de vapor. Em particular, o método aqui reportado consiste em aplicar um pulso de laser sobre a pele através de uma sonda, com uma densidade energética de  $36 \text{ mJ/cm}^2$  [15][16]. A sonda foi desenvolvida para um diagnóstico transdermal (ou seja, emite os sinais através da pele, não sendo necessário recolher amostras) e inclui uma fibra ótica, um sensor acústico adaptado que contém um amplificador e que se encontra integrado numa unidade compacta e portátil. Em resposta a cada pulso de laser, a sonda deteta um pulso acústico de nanobolhas e gera como saída um sinal elétrico. Os sinais de saída obtidos são guardados e analisados posteriormente em *software* especializado para o efeito. Um sinal de um humano saudável, não infetado com malária, foi utilizado para determinar o *threshold*, ou seja, o valor máximo de amplitude que um sinal pode ter para ser considerado como um teste negativo. Para verificar se um paciente se encontra ou não infetado com malária, a amplitude do sinal obtido na medição é comparada com o *threshold* calculado e, caso a amplitude do mesmo se encontre acima do *threshold*, o mesmo é considerado positivo [15]. Na figura 5, é possível observar, do lado esquerdo um protótipo laboratorial experimental, e do lado direito, um diagrama de blocos do método de funcionamento do protótipo.

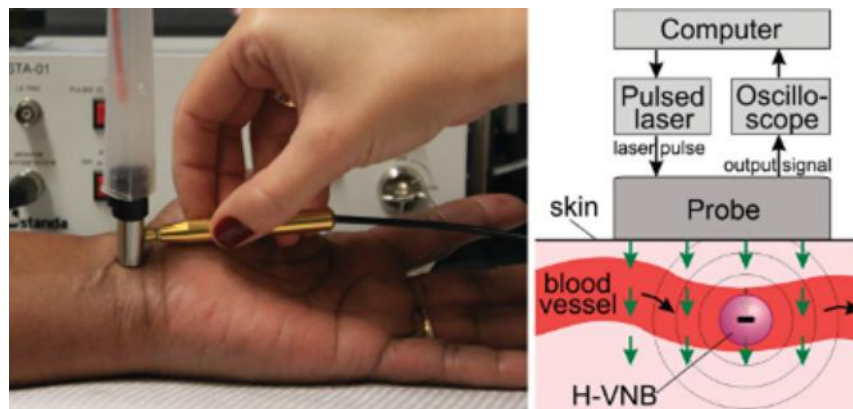


Figura 5 - Protótipo experimental desenvolvido e diagrama de blocos do método fotoacústico para a deteção de hemozoína. Partilhado de [15], com autorização da PCM através de uma licença *Creative Commons*.

### 2.2.3 Métodos de Absorbância Ótica

Além de métodos magnéticos e opto-acústicos, encontram-se também em desenvolvimento diversos métodos miniaturizados para deteção ótica de malária. Catarino *et al.* [14] descrevem um método e dispositivo para a quantificação de hemozoína através de espectrofotometria de absorção ótica. O método de deteção de hemozoína consiste na reconstrução do espectro ótico da amostra através de

6 comprimentos de onda discretos (567 nm, 591 nm, 617 nm, 623 nm, 670 nm e 721 nm) especificamente escolhidos em 6 pontos relevantes do espectro ótico visível, com base em conhecimento prévio dos espectros de absorbância da hemoglobina e hemozoína [17]. Este método consiste em retirar uma amostra de sangue, e colocar num suporte específico. Posteriormente, este suporte é colocado num dispositivo que faz incidir luz sobre a amostra através de diodos emissores de luz (LEDs) em seis comprimentos de onda específicos. Essa luz, depois de atravessar a amostra (alinhada com os LEDs), é absorvida por um conjunto de sensores (seis fotodiodos alinhados com os LEDs). A captação da luz pelo fotodiodo provoca uma alteração da corrente na saída do mesmo, alteração essa que é captada por um microcontrolador que analisa os dados obtidos e reconstrói o espectro ótico [14][17]. Aplica-se de seguida um algoritmo de deteção que quantifica a quantidade de hemozoína presente (com um limite mínimo de deteção de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hemozoína em sangue total) [14]. A figura 6 apresenta um desenho CAD do dispositivo desenvolvido. Apesar de necessitar de melhorias no limite de deteção, esta tecnologia pode ser uma alternativa aos métodos de deteção da malária mais comuns, visto ser rápido, quantitativo e ter um custo por teste baixo [14].

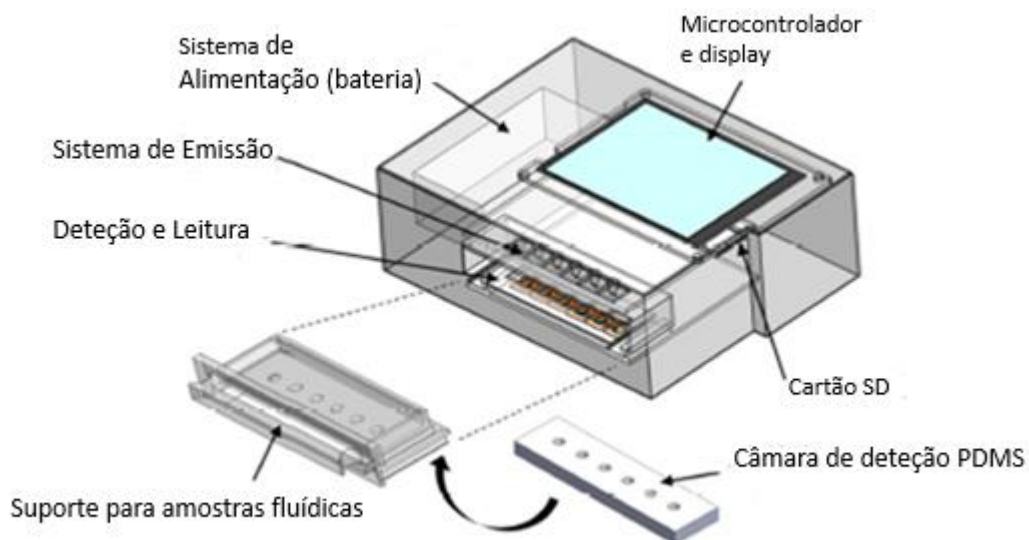


Figura 6 - Desenho CAD do protótipo desenvolvido para o método de absorbância. Adaptado de Catarino et al. [14], *Copyright © 2020, IEEE*.

De um modo geral, os métodos espectrofotométricos disponíveis para deteção de parasitas da malária têm vindo a ser baseados em espectrofotometria de absorção e de Raman [18]. No entanto, todos os trabalhos apresentados apresentam limitações, nomeadamente em relação à necessidade de amostras sanguíneas e da complexidade dos sistemas, além da dificuldade em detetar baixas

concentrações do parasita. Assim, a presente dissertação vem contribuir para um método inovador, uma vez que não se encontra reportado na literatura qualquer sistema eletrónico para quantificação de parasitas da malária por espectrofotometria de reflectância, e que não implique recolha de amostras de sangue.

#### 2.2.4 Reflectância Ótica

Grande parte dos métodos previamente referidos são invasivos, uma vez que requerem a colheita de amostras de sangue (ainda que em pequenas quantidades) e reagentes descartáveis e/ou consumíveis. Assim, refere-se de seguida uma abordagem, proposta no projeto de investigação MalariaChip, e na qual o presente trabalho de dissertação se baseia, que não envolve a recolha de amostras para diagnóstico de malária. Particularmente, em relação às propriedades óticas, têm vindo a ser desenvolvidas várias técnicas de espectroscopia ótica para o estudo das propriedades físicas e químicas da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que possam 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. Especificamente, o presente trabalho baseia-se no princípio de que a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a Hb possuem espectros óticos característicos diferentes, principalmente na faixa do visível, com picos de reflectância que se modificam consoante as concentrações de Hb e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sangue. Quando o parasita da malária está presente no organismo humano, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 Microssistemas 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por reflectância ótica [19].

A figura 7 apresenta, a título de exemplo, os espectros contínuos de reflectância ótica de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infetados com o parasita da malária, em diferentes níveis de parasitémia, e nos estados iniciais (anéis) e avançados (trofozóitos) da doença. As medições, realizadas no âmbito de outros trabalhos dentro deste projeto de investigação [6] e [19] foram realizadas no CMEMS, num *setup* espectrofotométrico composto por uma fonte de luz, fibras óticas, um suporte de amostras de cuvette e um espectrómetro AvaSpec-ULS2048XL EVO (Avantes). As amostras foram medidas numa cuvette de caminho ótico de 1 mm com 40% de hematócrito para representar a concentração real dos glóbulos vermelhos no sangue humano. As amostras de *Plasmodium falciparum* foram cultivadas no ICVS.

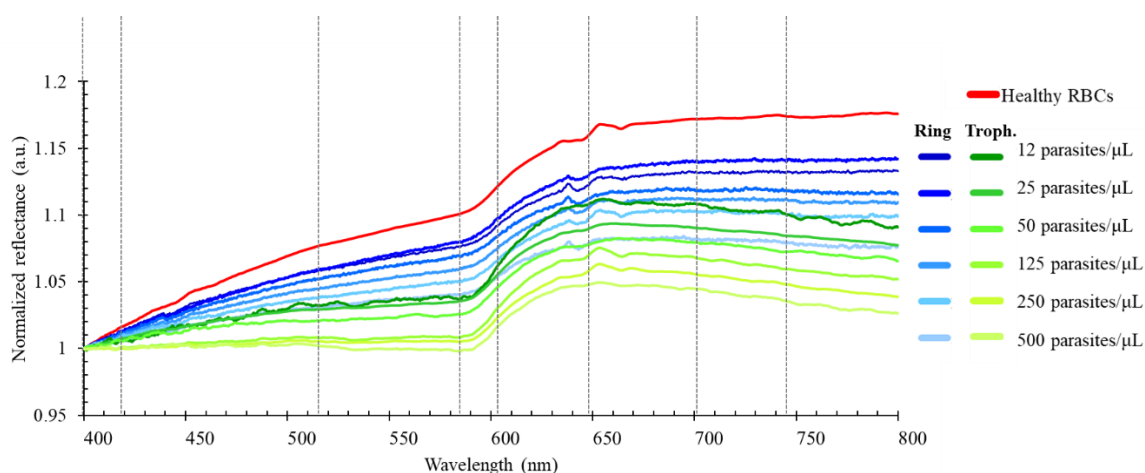


Figura 7 - Espectros de reflectância contínuos de glóbulos vermelhos saudáveis e glóbulos vermelhos infectados, cultivados in vitro, com diferentes parasitêmias (12,5 a 50 parasitas/ $\mu\text{L}$  de glóbulos vermelhos) de *P. falciparum*, nos estados inicial (anéis) e avançado (trofozoítos) da doença. Reproduzido de [20], com autorização da MDPI através de uma licença *Creative Commons CC BY*.

A partir dos espectros de reflectância apresentados, espera-se que seja possível desenvolver um dispositivo óptico inovador com base em reflectância ótica para detecção de hemozoína. Com o objetivo de reconstruir os espectros de reflectância ótica das amostras a partir de um conjunto limitado de comprimentos de onda (no caso apenas 16 pontos discretos), é necessário que o dispositivo final seja constituído por uma fonte de luz capaz de emitir e direcionar a luz para as amostras; uma série de filtros óticos passa-banda, específicos para seleccionar e filtrar a luz em comprimentos de onda seleccionados; um conjunto de 16 fotodiodos que irão receber a luz refletida e convertê-la em corrente elétrica. Este trabalho, ao analisar e desenvolver um protótipo da eletrónica de emissão e leitura para o sistema ótico para a emissão e a aquisição dos sinais de reflectância, consiste num passo essencial para a concretização do objetivo principal do projeto, evidenciando a sua originalidade.

### 2.3 Microdispositivos Baseados em Espectrofotometria

Todos os componentes e substâncias químicas absorvem, refletem e transmitem luz (radiação eletromagnética), em determinados comprimentos de onda do espectro ótico [21]. A espectrofotometria é um método utilizado para medir a quantidade de luz transmitida, absorvida ou refletida por uma substância química, realizando a medição da intensidade de luz que passa através de uma amostra dessa substância. De um modo genérico, um sistema espectrofotométrico inclui uma fonte de luz, um

monocromador (que seleciona os comprimentos de onda da luz) e um fotodetector que converte a luz recebida em corrente elétrica. A figura 8 ilustra, de uma forma simples, os componentes essenciais de um sistema espectrofotométrico.

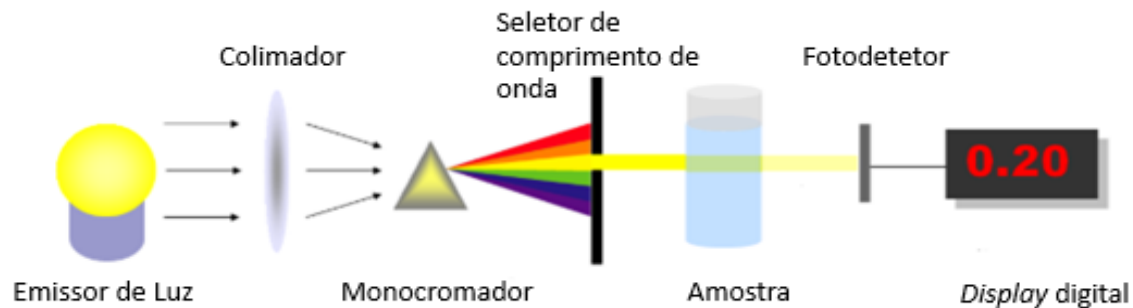


Figura 8 - Estrutura básica de um sistema espectrofotométrico. Adaptado de [21], com autorização da *The LibreTexts* através de uma licença CC BY-NC-SA 3.0 .

Para determinar a concentração de uma amostra, é usual a utilização da lei de Lambert Beer, dada por  $A = \epsilon * l * c$ , onde  $A$  é a absorvância da amostra,  $\epsilon$  a constante de absorção molar,  $l$  o comprimento da amostra que o feixe de luz tem de atravessar e  $c$  a concentração da solução [21]. A transmitância ( $T$ ) de uma amostra é a fração de luz que passa através desta. Para o cálculo da transmitância é necessário em primeiro lugar medir a intensidade de luz de referência, ou seja, a luz total que atravessa o sistema, na ausência de amostra ( $I_0$ ), e posteriormente medir a intensidade de luz que atravessa o sistema com amostra ( $I$ ). A partir destes valores, a transmitância é dada por  $T = I / I_0$ . Com o valor da transmitância calculado é possível calcular o valor da luz absorvida pela amostra, absorvância, uma vez que estes se relacionam, através da expressão  $A = -\log_{10}(T)$ . De igual modo, se usarmos este método em reflectância ( $R$ ), é necessário medir, em primeiro lugar, o valor da luz refletida de referência, ou seja, medir a luz refletida por uma amostra de sulfato de bário (material que reflete praticamente toda a luz, acima de 99%),  $I_0$ , e posteriormente é medida a luz refletida pelo sistema com uma amostra,  $I$ .

Por ser um método relativamente simples de implementar e com resultados satisfatórios (em termos de especificidade e sensibilidade), a espectrofotometria é um método muito útil e versátil para a análise quantitativa em várias áreas, como por exemplo, química, física, biologia, bioquímica, engenharia dos materiais e aplicações clínicas e industriais. Em particular, no presente trabalho, pretende-se a utilização desta técnica para diagnóstico de malária. Assim, de seguida, apresenta-se uma curta revisão da literatura de exemplos de diferentes dispositivos miniaturizados e portáteis, *point-of-care*, com base



em espectrofotometria, para diferentes aplicações na área biomédica, desde análises clínicas a sistemas de diagnóstico de diversas patologias, e que servem como ponto de partida para a implementação do sistema de reflectância ótica que se pretende implementar no presente trabalho, e que será descrito no capítulo 3.

### 2.3.1 Microdispositivos em Análises Clínicas

Existe atualmente uma necessidade crescente de testes com uma precisão bastante elevada e de tempo reduzido para análise de fluidos fisiológicos humanos [22], podendo a espectrofotometria de absorção ótica ser uma alternativa para a implementação em sistemas portáteis e miniaturizados. Num estudo realizado por Grabowska *et al.* [22][23], foi analisada a utilização da espectrofotometria de absorção para a detecção e quantificação de ácido úrico em fluidos biológicos. Foi desenvolvido, pelos autores, um micro reator com 3 entradas que permite a introdução de diferentes reagentes, que são utilizados na reação analítica. No microssistema desenvolvido, foram utilizados métodos colorimétricos e fluorescentes para a detecção de ácido úrico. As soluções preparadas, com concentrações de reagente conhecidas (padrão), foram bombeadas simultaneamente para o microssistema usando uma bomba peristáltica [22]. Para a detecção da intensidade de luz que atravessa a amostra, os autores recorreram a uma matriz de espectrómetros, da Control Development Inc., com estabilização da temperatura. As medidas espectrofluorométricas foram realizadas com a Fluoromax 3 (Jobin Yvon). Como fonte de luz, os autores utilizaram a lâmpada presente na Fluoromax 3, sendo a luz da lâmpada de xénon guiada para uma fibra ótica que posteriormente foi direcionada para a amostra. A resposta ótica foi medida nos comprimentos de onda de 660 nm a 720 nm.

Minas *et al.* [24][25] desenvolveram um microssistema para análises de fluidos biológicos através de análise espectrofotométrica, sendo o microssistema desenvolvido focado em métodos colorimétricos por absorção ótica. O *lab-on-a-chip* desenvolvido por Minas *et al.*, combina num único dispositivo o sistema microfluídico, o sistema de filtragem ótica e o sistema de detecção e leitura do sinal. O princípio de funcionamento do *lab-on-a-chip* é baseado em iluminação na parte superior, com um feixe de luz branca, que é transmitido para os microcanais que contêm as amostras para análise. A luz que atravessa a amostra é filtrada com recurso a filtros óticos de Fabry-Perot, filtros estes que são constituídos por dois espelhos paralelos com uma camada de ressonância no meio. A espessura da camada de ressonância determina o intervalo da banda espectral (comprimentos de onda) para a qual o filtro permite a passagem da luz (ou seja, comprimento de onda com elevada transmitância). A intensidade do espectro, depois de filtrada, é medida usando fotodetetores, que convertem a luz transmitida em corrente. Os fotodetetores

são fotodiodos de junção *pn*, fabricados usando a junção *n+/p-epilayer* disponível nos processos CMOS (*complementary metal oxide semiconductor*), sem ser necessário a utilização de camadas ou máscaras adicionais. Foi adicionado ao fotodetector um conversor de luz-frequência, que converte o sinal analógico em um sinal digital [24].

Pinto *et al.* [26] implementaram também um sistema miniaturizado para análises de fluidos biológicos, sendo o principal objetivo do sistema desenvolvido a detecção de cortisol na saliva. O imunossensor microfluídico desenvolvido compreende 3 subsistemas: um *die* microfluídico, o controlo de bombeamento do fluido e um sistema espectrofotométrico para a medição da absorção ótica a 450 nm, com LED e fotodiodo. Para a quantificação de cortisol por absorção ótica foi utilizado um fotodiodo de silício integrado num *chip* CMOS, com vista a miniaturização do sistema. O fotodiodo utilizado foi um fotodiodo de junção *pn*, tal como desenvolvido por Lin *et al.* [27]. O sensor desenvolvido consegue oferecer uma solução para a detecção de cortisol com uma diminuição significativa dos reagentes utilizados e uma diminuição no tempo de realização da análise em relação aos métodos convencionais de quantificação deste analito.

Farahani *et al.* [28] desenvolveram um dispositivo microfluídico integrado em um *lab-on-chip* para extração em fase sólida e detecção espectrofotométrica de morfina, codeína e papaverina em amostras de urina humana. Para a execução das medidas espectrofotométricas, existe no dispositivo uma célula de detecção em forma de *z*, com um comprimento de 200 mm. Como fonte de luz o autor recorreu a uma lâmpada de xénon e para a realização das medidas de absorbância ótica foi utilizado um espectrofotómetro miniaturizado (USB4000, Ocean Optics). De modo guiar a luz da lâmpada até à amostra e da amostra ao espectrofotómetro, os autores utilizaram duas fibras óticas ligadas em extremidades opostas do *chip*. Duas lentes de colimação foram fixadas nas duas extremidades da célula para focar a luz na direção da solução. O sistema oferece uma boa solução para a detecção de morfina, codeína e papaverina em urina com uma diminuição significada no tempo de realização da análise comparando com métodos mais convencionais.

### 2.3.2 Microdispositivos em Tipagem Sanguínea

A detecção do tipo sanguíneo é essencial para o sucesso nos procedimentos de salvamento de vidas, como as transfusões de sangue [29][30]. Atualmente, existem vários testes para determinar o tipo de sangue, de modo a identificar quais os antígenos presentes nos glóbulos vermelhos, e quais os que se encontram em falta [31]. Os testes realizados manualmente baseiam-se na visualização de aglutinação (interação antígeno-anticorpo) após a mistura das amostras de sangue com reagentes

específicos. Apesar da rapidez dos testes, os resultados são altamente subjetivos devido ao facto de dependerem do técnico que os realiza. Nesse sentido foram realizados vários estudos sobre a utilização de espectrofotometria para a deteção do tipo de sangue num ser humano, dos quais se destacam os trabalhos de Narayana *et al.* [32], Pimenta *et al.* [30] e Fernandes *et al.* [33]. O uso da espectrofotometria para a deteção de diferentes tipos de sangue é inicialmente descrito por Narayana *et al.* [32], que comprovaram que diferenciar os tipos de sangue humano é possível, misturando o sangue ou os glóbulos vermelhos com reagentes específicos (anticorpos) e medindo o espectro de densidade ótica das respetivas misturas. Os autores verificam que uma amostra aglutinada tem um espectro de densidade ótica diferente de uma amostra não aglutinada, portanto, a deteção de diferentes tipos de sangue pode ser realizada comparando o espectro de densidade ótica entre os comprimentos de onda de 600 nm a 1000 nm.

Nos estudos realizados por Pimenta *et al.* [30] e Fernandes *et al.* [33], foram desenvolvidos dispositivos miniaturizados baseados em espectrofotometria, constituídos por uma fonte de luz específica, baseada em quatro conjuntos de três LEDs, com comprimentos de onda de 410, 536 e 931 nm, e quatro fotodíodos comerciais (S2387-33R da Hamamatsu) [33]. Os autores concluíram que é possível e viável identificar diferentes tipos de sangue com um sistema baseado na medição da densidade ótica da amostra nos comprimentos de onda de 400 nm a 1000 nm, o que possibilitou o desenvolvimento de um sistema automático, de baixo custo, miniaturizado, portátil, rápido e que não necessita de um técnico especializado para a interpretação dos resultados [27,30].

### 2.3.3 Microdispositivos em Diagnóstico de Cancro

Pimenta *et al.* [34][35] desenvolveram um microssistema que combina duas técnicas óticas (reflectância difusa e fluorescência) num único dispositivo, para deteção de cancro gastrointestinal. De modo a seleccionar a gama do espectro relevante dos sinais espectrofotométricos para a deteção de displasia gastrointestinal, o microssistema contém uma matriz de filtros óticos de filmes finos depositados sobre fotodíodos de silício. No *chip* encontram-se também implementados LEDs (um LED ultravioleta e um LED de luz branca) miniaturizados, como objetivo de providenciar iluminação para as medidas de reflectância difusa e de fluorescência. Por fim, os autores implementaram eletrónica para a aquisição e tratamento de sinal e um sistema para a transmissão dos dados para um computador para posterior análise. Na figura 9 encontra-se representado o esquemático do sistema miniaturizado implementado, com um corte transversal na zona de iluminação e deteção.

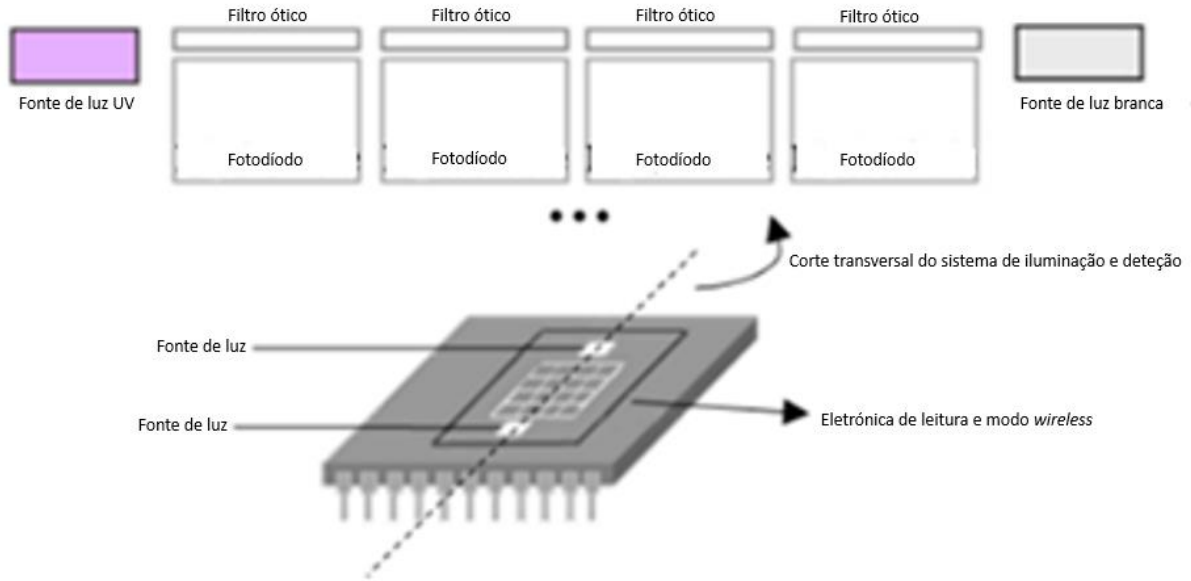


Figura 9 - Sistema miniaturizado implementado por Pimenta *et al.* Reproduzido de [34], com autorização da MDPI através de uma licença *Creative Commons CC BY*.

Lee *et al.* [36] desenvolveram um sensor miniaturizado optoelectrónico para auxiliar na avaliação *in situ*, em tempo real e objetiva dos tecidos pancreáticos humanos durante EUS-FNA (biópsia aspirativa por agulha fina guiada por ultrassom endoscópico). O microssistema criado foi colocado dentro de uma agulha de 19 *gauge*, sistema este constituído por um fotodetector (T1090P, Vishay), que contém uma alta detecção radiante e uma elevada sensibilidade na zona de interesse, e dois LEDs que emitem luz em dois comprimentos de onda discretos, sendo eles 460 e 650 nm, tendo sido escolhidos dois LEDs comerciais (460DA3547, Cree, para o comprimento de onda de 460 nm e C4L12T5, Chip4Light para o comprimento de onda de 650 nm) para o fabrico do microssistema. Na figura 10 pode-se observar uma fotografia do sensor ótico miniaturizado desenvolvido, compatível com uma agulha de 19 *gauge*, que foi desenvolvida com sucesso para um estudo de prova de conceito para detecção de cancro do pâncreas. A  $\mu$ PCB representada na figura (figura 10), está posteriormente ligada a uma outra PCB onde são realizadas as conexões elétricas para o controlo do sistema.

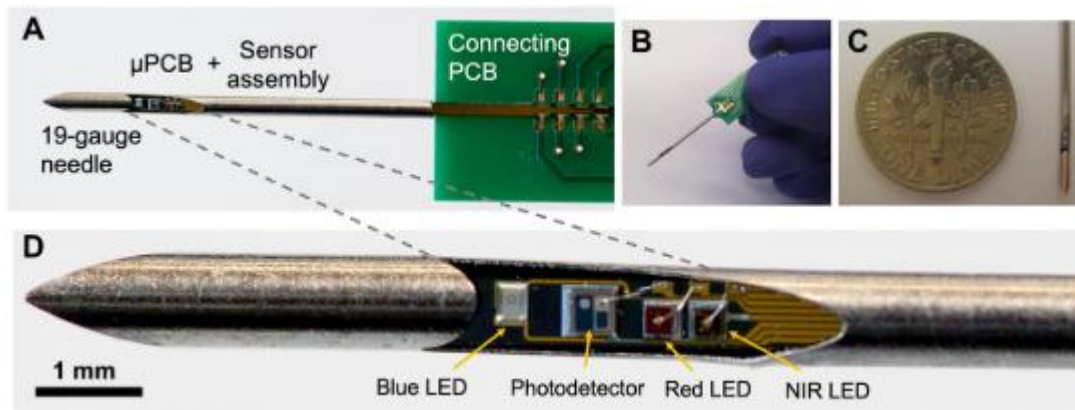


Figura 10 – Sistema desenvolvido por Lee et al. para o estudo de prova de conceito para a detecção do cancro pancreático. Partilhado de [36], com a autorização da Science através de uma licença *Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC)*.

Os vários métodos descritos mostram que, de facto, existe muito potencial em técnicas espectrofotométricas para diagnóstico clínico, com diversas soluções, quer em termos de técnica (absorbância, reflectância, fluorescência) como de equipamentos e tecnologias (PCB, ou CMOS, por exemplo), e tanto para a iluminação como para detecção. O trabalho que se apresenta de seguida será baseado em detecção de reflectância ótica, utilizando LEDs e implementado em PCB.

### 3. MÉTODOS E IMPLEMENTAÇÃO

Este capítulo aborda todos os circuitos de atuação e detecção implementados para a resolução do problema, desde o seu desenho, dimensionamento, simulação e implementação.

#### 3.1 Sistema de Iluminação

O sistema a implementar na presente dissertação é um sistema espectrofotométrico de reflectância ótica, pelo que é necessário a implementação de uma fonte de iluminação para o mesmo. Deste modo, é necessário compreender qual a zona do espectro ótico relevante para a realização do sistema. Na figura 7, encontra-se o espectro da reflectância ótica de várias medições de amostras sanguíneas saudáveis e amostras com parasitas da malária, cultivados em laboratório, e medidos num espectrofotómetro comercial, no âmbito do projeto MalariaChip. A partir deste espectro, seleccionaram-se 16 comprimentos de onda ( $\lambda$ ) relevantes para o desenvolvimento do projeto: 400, 435, 520, 590, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 700, 720, 740 e 800 nm. Estes comprimentos de onda cobrem todo o espectro de reflectância das amostras, pelo que se espera que, a partir de apenas 16 comprimentos de onda na gama 400 - 800 nm, seja então possível reconstruir com precisão o seu espectro.

Após serem seleccionados os dezasseis comprimentos de onda de interesse para reconstruir o espectro de reflectância da amostra, é necessário encontrar uma fonte luminosa que seja capaz de emitir luz em toda a gama pretendida, ou seja, dos 400 nm aos 800 nm. Não tendo sido possível, no decorrer do trabalho, encontrar uma fonte de luz LED única, cujo espectro de emissão cobrisse toda a gama desejada, optou-se por uma conjugação de três tipos de LEDs diferentes, um com emissão entre 450 nm e 750 nm para a zona visível do espectro (que consiste na região compreendida entre os 400 nm e os 750 nm), um, com pico de emissão estreito nos 400 nm, para a zona ultravioleta do espectro (região que se encontra abaixo dos 400 nm) e um, com pico de emissão estreito próximo dos 800 nm, para a zona do infravermelho (região entre os 800 nm e os 50  $\mu$ m). Assim, com a conjugação de LEDs nas três gamas referidas anteriormente, espera-se que seja possível obter uma fonte de luz que cubra satisfatoriamente todo o espectro pretendido.

O fornecimento de corrente para cada um dos LEDs é realizado através de um microcontrolador (Arduíno Mega 2560), que atua os LEDs por modulação por largura de pulso (PWM, do inglês *Pulse Width Modulation*), programados de modo a variar o *duty cycle* de uma onda quadrada de 0 a 100%, o

que equivale a um valor de tensão de saída entre 0 e 5 V. A onda programada contém uma frequência de 490 Hz. Foi definida a frequência de 490 Hz uma vez que era pretendida uma frequência na gama dos 500 Hz, para que a frequência de alimentação do LED não fosse demasiado baixa (ficando o LED a piscar), nem elevada, de modo a que quando alimentado com um *duty cycle* mais alto, o LED passasse a ser alimentado com um sinal contínuo, pois o tempo de comutação da onda seria superior à sua frequência de emissão. Assim, e tendo o Arduino ondas de PWM predefinidas com frequência de 490 Hz, optou-se por utilizar essa frequência. Na saída do Arduino é colocada uma resistência para limitar a corrente fornecida aos LEDs, de modo que esta não exceda a corrente máxima permitida indicada pelos fabricantes no respetivo *datasheet* (Anexo I). Na figura abaixo, figura 11, está representado o esquemático do circuito realizado para alimentar os emissores de luz (LEDs).

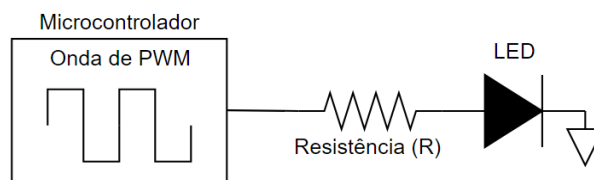


Figura 11 - Esquemático do circuito utilizado para a alimentação dos emissores de luz.

Como referido anteriormente, e, de modo a impedir que a corrente fornecida aos LEDs ultrapasse a corrente máxima permitida ( $I_{max}$ ), foi dimensionado o valor da resistência mínima que seria necessária, através do uso da Lei de Ohm ( $R = U/I$ , em que  $R$  é a resistência ( $\Omega$ ),  $U$  a queda de tensão (V) e  $I$  a corrente (A)), assumindo a tensão máxima de alimentação do microcontrolador ( $V_{dd} = 5$  V), e um sinal contínuo, para prevenir o excesso de corrente na alimentação dos LEDs. Com o desenrolar do projeto e a necessidade de otimizar o sistema de iluminação, foram desenvolvidas e comparadas três versões diferentes de placas PCB do sistema de iluminação. Todas as versões incluíram LEDs na zona do visível (cobrindo a maior parte da luz branca do espectro), para os 405 nm e para os 800 nm, atuados de forma independente. No Anexo II apresenta-se o código desenvolvido para a atuação dos LEDs com a frequência de 490 Hz e *duty cycle* variável.

### 3.1.1 Placa de Emissão de Luz 1

Na primeira versão (Placa de Emissão 1) optou-se por colocar nove LEDs que emitem luz na zona visível do espectro no centro da placa, uma vez que é nessa região do espectro onde se encontram a maioria dos comprimentos de onda relevantes para o sistema. Nas extremidades foram colocados

quatro LEDs, dois na região dos 405 nm e dois na região dos 800 nm, como é possível verificar na figura 12, onde se encontra um esquemático do posicionamento dos LEDs na placa de iluminação. Para a emissão de luz, nesta primeira versão da placa de iluminação, foram utilizados como fonte de luz os LEDs LEDSW50, LED405L e LED800L, todos da THORLABS. A tabela 1 apresenta o dimensionamento dos circuitos de alimentação para cada um dos LEDs na Placa de Emissão 1 (assumindo corrente contínua), tal como previamente descrito.

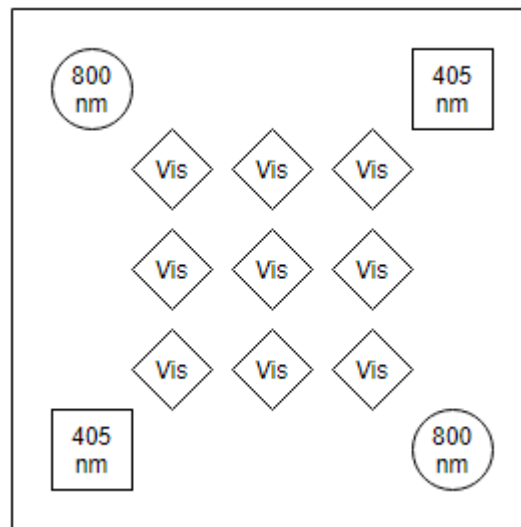


Figura 12 - Esquemático do posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 1.

Tabela 1- Dimensionamento dos circuitos de emissão dos LEDs na Placa de Emissão 1.

LED	$V_{dd}$ (V)	$V_d$ (V) (datasheet)	$V_r$ (V)	$I_{max}$ (mA) (datasheet)	$R_{minima}$ ( $\Omega$ )
405 nm	5	4	1	30	50
Visível	5	3,6	1,4	180	9,33
800 nm	5	2	3	75	60

Após o dimensionamento teórico, os circuitos de emissão foram testados experimentalmente. Na prática, foram usadas resistências com valores acima dos valores calculados (68  $\Omega$  para os LEDs de 405 e 800 nm e 100  $\Omega$  para os LEDs da zona do visível), tendo-se obtido correntes de 21 mA para os LEDs de 405 nm, 19,35 mA para os LEDs da zona do visível e 41,1 mA para os LEDs de 800 nm. Para os LEDs da zona do visível, a resistência utilizada é bastante elevada comparando com o valor mínimo calculado, uma vez que a intensidade de luz emitida pelos mesmos, comparando com os LEDs de 405



e 800 nm, é também ela muito superior, e este ajuste serviu para diminuir a intensidade luminosa (para garantir maior equilíbrio entre a emissão dos 3 tipos de LEDs).

Na figura 13, está representado o *layout* da placa de circuito impresso – PCB (*printed circuit board*) desenhada no programa PADS, como também uma fotografia da PCB após fabrico e soldagem de todos os componentes na mesma. O conjunto dos LEDs que se encontra soldado na placa tem uma dimensão de cerca de 5 cm x 5 cm.

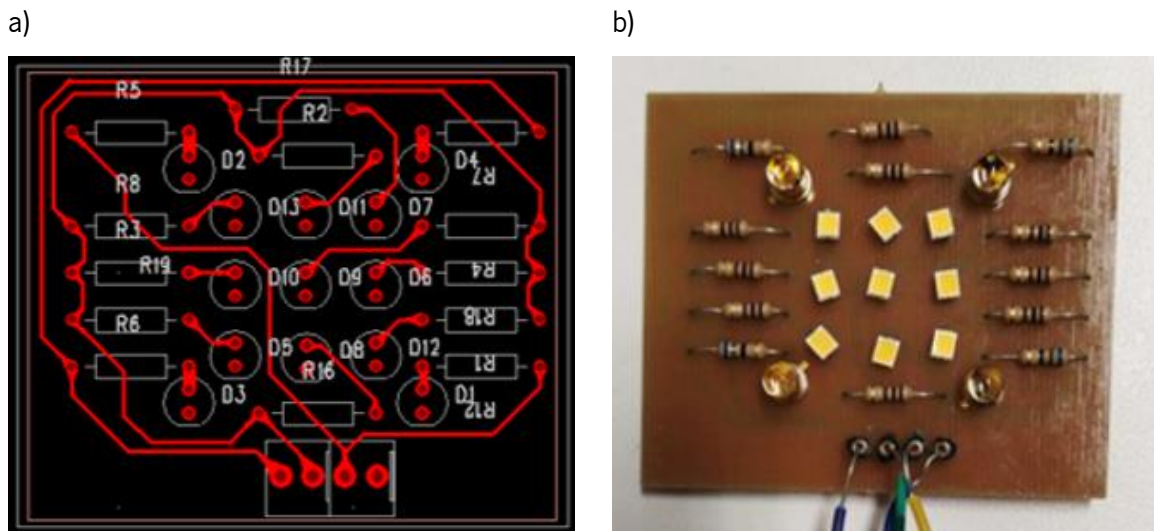


Figura 13 – a) Layout da PCB desenhada com auxílio do programa PADS para a Placa de Emissão 1. b) Fotografia da placa desenvolvida.

A placa foi caracterizada com base na análise do espectro de emissão ótica, utilizando um espectrofotómetro para realizar as medições, e foi também medida a densidade ótica emitida pela placa, com um *powermeter*. Os resultados destes testes serão apresentados na secção 4.1.1.

### 3.1.2 Placa de Emissão de Luz 2

Desenvolveu-se uma segunda versão do sistema de iluminação, Placa de Emissão 2, com algumas alterações em relação à versão 1, com o objetivo de otimizar o espectro emitido e garantir uma emissão o mais constante possível em toda a região visível. Na Placa de Emissão 2, foram utilizados quatro LEDs na região do visível, e aumentou-se o valor da resistência (em comparação com a versão 1) de modo a limitar ainda mais o valor da corrente fornecido ao LED. Relativamente à zona dos 405 nm, passou-se de dois LEDs para oito LEDs. Na zona dos 800 nm, existiu também um aumento de LEDs, porém este foi menor, de dois para cinco LEDs. Este ajuste teve em conta os resultados preliminares de caracterização da Placa de Emissão 1 uma vez que, pela análise do espectro de emissão representado

na figura 53 do capítulo 4.1.1, é possível observar que o espectro de emissão dos LEDs de 405 nm e 800 nm, para o mesmo número de fontes de luz, é o dobro para a zona de 800 nm comparando com a zona de 405 nm. Na 2ª versão, recorreu-se aos LEDs UV5TZ-400-30 da Bivar Inc. para emissão nos 400 nm, e aos LEDs MTE2081-OH5 da Marktech Optoelectronics para emissão nos 810 nm, de modo a aumentar a intensidade luminosa emitida nestas regiões do espectro. Na figura 14 está representado o posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 2. A tabela 2 apresenta o dimensionamento dos circuitos de alimentação para cada um dos LEDs na Placa de Emissão 2 (assumindo corrente contínua).

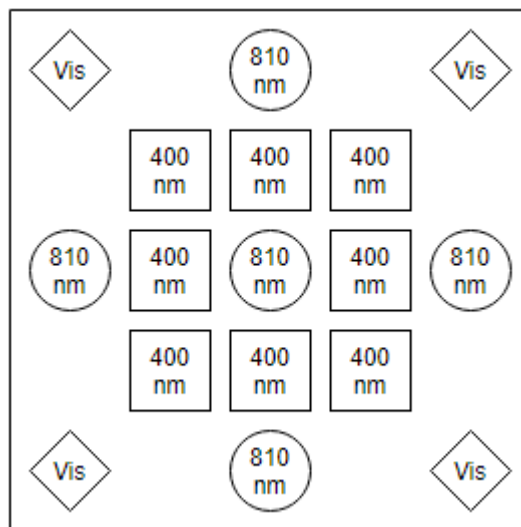


Figura 14 - Esquemático do posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 2.

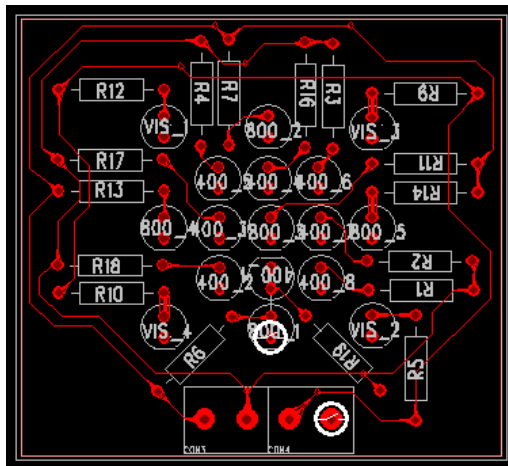
Tabela 2 - Dimensionamento dos circuitos de emissão dos LEDs na Placa de Emissão 2.

LED	$V_{dd}$ (V)	$V_d$ (V) (datasheet)	$V_f$ (V)	$I_{max}$ (mA) (datasheet)	$R_{minima}$ ( $\Omega$ )
400 nm	5	3,5	1,5	20	75
Visível	5	3,6	1,4	180	9,33
810 nm	5	1,9	3,1	100	31

Uma vez mais, os circuitos de alimentação foram testados experimentalmente em *breadboard*. Na prática, utilizaram-se resistências de 100  $\Omega$  para os circuitos de alimentação dos LEDs de 400 nm (corrente de 16 mA) e 33  $\Omega$  para os LEDs de 810 nm (corrente de 95 mA). Nos LEDs da zona do visível, e uma vez que são os mesmos que na primeira versão da placa, as resistências utilizadas foram as mesmas.

Posteriormente, realizou-se o desenho, impressão e soldagem da PCB, a qual é possível observar na figura 15. O conjunto dos LEDs que se encontra soldado na placa tem uma dimensão de cerca de 4 cm x 4 cm. Os resultados da sua caracterização experimental são apresentados nas secções 4.1.2. e 4.2.2.

a)



b)

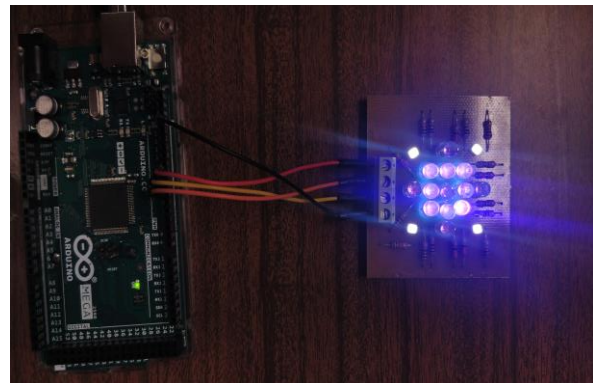


Figura 15 – a) Esquemático da Placa de Emissão 2 implementada, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de iluminação desenvolvida.

### 3.1.3 Placa de Emissão de Luz 3

Feita a análise e testes da segunda versão da placa de iluminação, e não se obtendo resultados satisfatórios em relação aos espectros de emissão obtidos, passou-se ao desenho e caracterização de uma terceira versão para a iluminação – Placa de Emissão 3. Nesta placa foram utilizados os mesmos LEDs que na Placa de Emissão 2, ou seja, os LEDs UV5TZ-400-30 da Bivar Inc. (400 nm), MTE2081-OH5 da Marktech Optoelectronics (810 nm) e LEDSW50 da ThorLabs (visível), sendo apenas necessário alterar a disposição e quantidade dos mesmos. Após a observação dos resultados obtidos aos testes realizados na segunda versão da placa (secção 4.1.2), chegou-se à conclusão de que existia um défice de emissão luminosa na zona do visível e, comparativamente, uma emissão muito elevada na região dos 400 nm, tendo-se reajustado a quantidade de LEDs em cada uma das regiões espectrais. Na figura 16 encontra-se a nova disposição dos LEDs na placa de iluminação, sendo esta constituída por seis LEDs na zona do visível, sete LEDs na zona dos 800 nm e quatro LEDs na zona dos 400 nm. As resistências utilizadas nos circuitos de alimentação são as mesmas que foram utilizadas na Placa de Emissão 2 para os LEDs de 400 nm e 810 nm. Para os LEDs da zona do visível a resistência de alimentação passou dos 100  $\Omega$  para os 33  $\Omega$ .

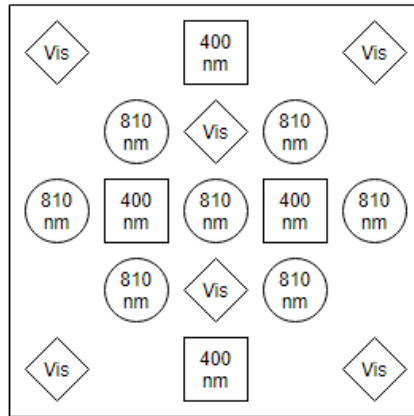
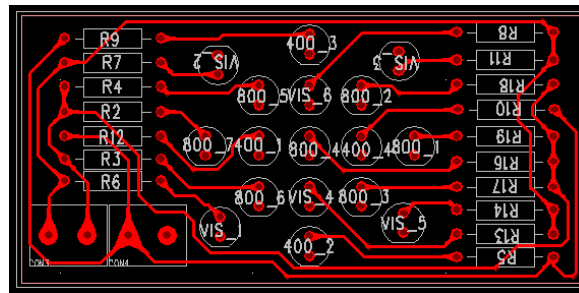


Figura 16 - Esquemático do posicionamento dos LEDs na Placa de Emissão 3.

Após o dimensionamento a Placa de Emissão 3, realizou-se o desenho, impressão e soldagem da PCB, a qual é possível observar na figura 17. O conjunto dos LEDs que se encontra soldado na placa tem uma dimensão de cerca de 4 cm x 4 cm. A impressão da PCB da Placa de Emissão 3 foi realizada na Guimocircuito, com a soldagem feita nos laboratórios do CMEMS.

a)



b)

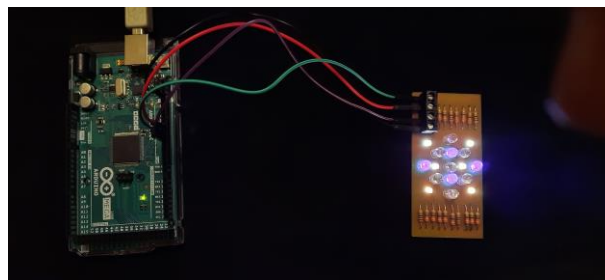


Figura 17 - a) Esquemático da Placa de Emissão 3 implementada, desenvolvida com o apoio do programa PADS.

b) Fotografia da placa de iluminação desenvolvida e alimentada pelo Arduino.

## 3.2 Sistema de Aquisição e Tratamento de Sinal

Além do sistema de emissão, foi necessário desenhar, simular e testar o sistema de aquisição dos sinais óticos (utilizando fotodetetores) e do seu condicionamento e amplificação. Como fotodetetores foram utilizados fotodíodos. Por sua vez, o sinal de saída dos fotodíodos é um sinal com valores muito baixos (em corrente, com valores na gama dos  $\mu\text{A}$ ) existindo uma propensão para que pequenos ruídos possam afetar o sinal de saída, sendo necessário construir um sistema de tratamento de sinal de modo que estas interferências não tenham impacto na reconstrução do espectro de reflectância. De modo a evitar que os ruídos interferissem no sinal lido, dimensionou-se um amplificador *lock-in* para filtrar o sinal na frequência pretendida (490 Hz, uma vez que é esta a frequência utilizada para a excitação dos LEDs). De um modo simplificado, um amplificador *lock-in* pode ser descrito como um voltímetro AC (corrente alternada) especial, que consegue medir a amplitude de sinais em corrente alternada a uma frequência de referência, mesmo que a potência do sinal seja extremamente baixa e, eventualmente menor do que a potência dos sinais de ruído [37].

### 3.2.1 Fotodíodo

De forma a adquirir o sinal luminoso que é enviado pelos LEDs e é refletido na amostra, foram utilizados fotodíodos, que são componentes que convertem a intensidade do sinal luminoso em corrente elétrica. Para a aplicação pretendida, foi necessário seleccionar um fotodíodo comercial capaz de ter boa eficiência quântica em todo o espectro relevante no sistema, espectro este compreendido entre os 400 e os 800 nm. Tendo em conta a relação qualidade – preço, escolheu-se o fotodíodo BPW 34 BS da OSRAM. Este fotodíodo contém, como pretendido, um intervalo de sensibilidade de comprimentos de onda dos 400 nm até aos 1100 nm, pelo que, para a aplicação necessária cobre todos os comprimentos de onda desejados. Na figura 18 encontra-se um gráfico da sensibilidade espectral relativa (%) do fotodíodo em função do comprimento de onda.

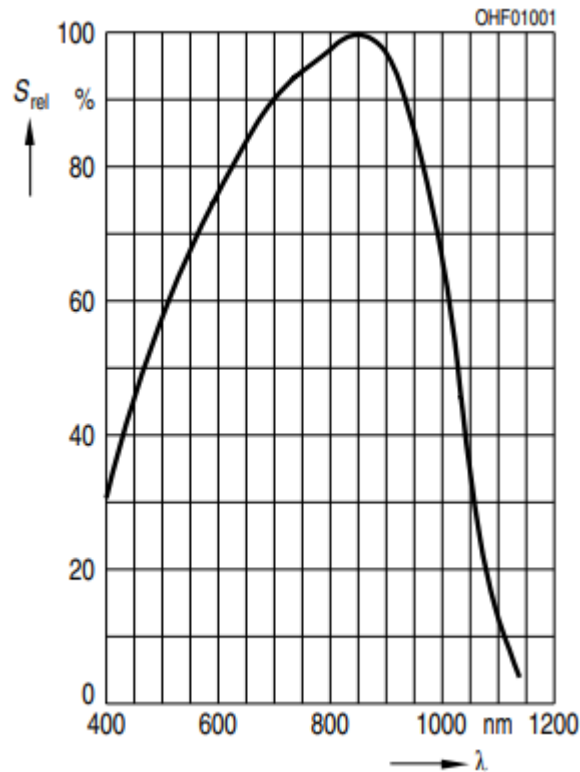


Figura 18 – Sensibilidade espectral relativa (%) do fotodiodo BPW 34 BS da OSRAM [38].

De modo a verificar se o fotodiodo escolhido teria o comportamento desejado em toda a gama espectral pretendida, analisou-se a sua corrente de saída quando este é iluminado diretamente com a placa de iluminação desenhada para a aplicação. Para estes testes preliminares, utilizou-se a Placa de Emissão 3. Realizados os testes, obtiveram-se os resultados apresentados nos gráficos da figura 19, onde se encontra a corrente de saída do fotodiodo ( $\mu\text{A}$ ) em função do *duty cycle* (%) aplicado à placa de iluminação. Os testes foram realizados para cada um dos tipos de LEDs (LEDs de 400 nm, LEDs da zona do visível e LEDs de 810 nm) atuados individualmente, e para todos os LEDs ligados em simultâneo.

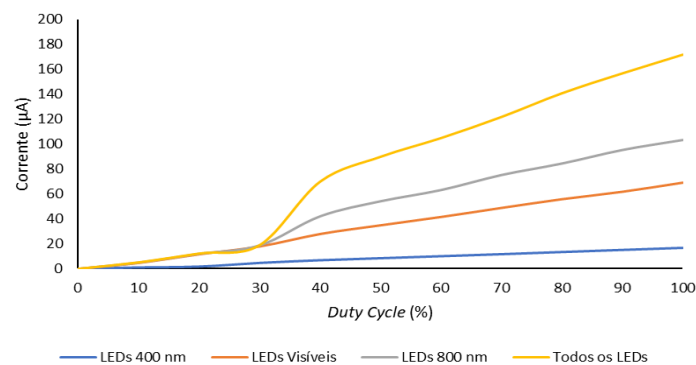


Figura 19 – Corrente de saída ( $\mu\text{A}$ ) do fotodiodo BPW 34 BS da OSRAM em função do *duty cycle* (%) aplicado na placa de iluminação, para cada um dos LEDs da placa de emissão.

Observando os gráficos obtidos, é possível concluir que o fotodíodo reage de forma semelhante em todas as zonas do espectro, existindo apenas pequenas variações não muito significativas. É possível observar o comportamento do fotodíodo com o aumento do *duty cycle* da onda de atuação dos LEDs, e, como esperado, a corrente de saída do mesmo aumenta com o aumento do *duty cycle* e com o respetivo aumento de intensidade de luz emitida pela placa de iluminação. Por último, analisou-se a gama de corrente de saída do fotodíodo, que está compreendida entre os 0,0039  $\mu\text{A}$ , quando este se encontra completamente no escuro, e os 175,1  $\mu\text{A}$ , quando este se encontra iluminado com todos os LEDs atuados com 100% de *duty cycle*, ou seja, com a intensidade máxima de luz que o sistema consegue fornecer.

### 3.2.2 Circuito de Transimpedância

Uma vez escolhido e caracterizado o fotodíodo, foi dimensionado um circuito de transimpedância, como o representado na figura 20, que é utilizado para converter a corrente de saída de alguns tipos de sensores (resposta mais linear do que a resposta em tensão) numa tensão mensurável. Este circuito é implementado apenas com um amplificador operacional, uma resistência e um condensador. O circuito de transimpedância foi dimensionado para ter um ganho de 28000, para que na saída do mesmo se encontre uma tensão máxima de cerca de 5 V, uma vez que esta é a tensão máxima suportada pelo Arduino. Para o ganho pretendido, foram selecionados uma resistência de 28,7 k $\Omega$  para  $R$  e um condensador de 7,5 pF para  $C$ . O condensador foi dimensionado com recurso ao *Photodiode Circuit Design Wizard*. Na impossibilidade de usar uma resistência de 28,7 k $\Omega$ , foi usada uma resistência de 22 k $\Omega$ , sendo que o efeito desta alteração apenas se reflete no ganho do circuito (ganho experimental de 22000) e consequentemente na tensão de saída do circuito de transimpedância, passando de cerca de 5 V para uma tensão máxima a rondar os 4 V. É importante referir que um ganho tão elevado tem uma desvantagem: ao ser o primeiro contacto com a saída do fotodíodo, o sinal contém ruído e, se a amplificação for demasiado elevada, pode provocar uma deterioração no sinal pelo aumento do ruído, dificultando posteriormente o seu tratamento e a sua análise.

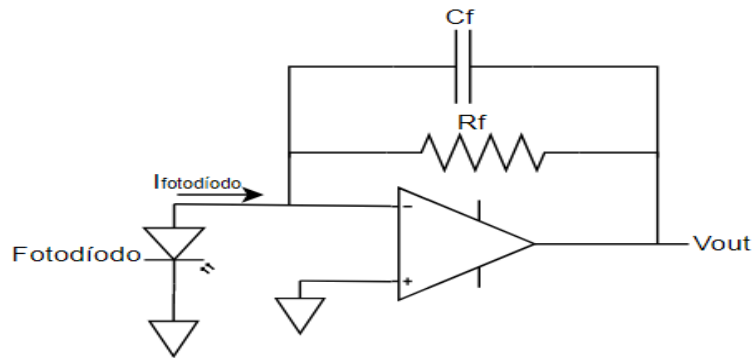


Figura 20 - Esquemático do circuito de transimpedância dimensionado.

### 3.2.3 Amplificador *Lock-In*

Dimensionado o circuito de transimpedância, é necessário tratar o sinal vindo do mesmo, tendo sido utilizado para esse efeito um amplificador *lock-in que*, resumidamente, consiste numa classe de amplificadores que consegue extrair um sinal a partir de uma onda de referência conhecida (neste caso é uma onda sinusoidal de 490 Hz, visto ser esta a frequência a que os LEDs se encontram alimentados), de um ambiente com elevado ruído. O amplificador *lock-in* proposto é constituído por um amplificador operacional inicial, que tem como função amplificar o sinal de entrada de baixa amplitude (vindo dos fotodiodos), tornando a filtragem do mesmo mais fácil. No presente trabalho, numa primeira fase, implementou-se este andar de pré-amplificação. Contudo, na versão final apresentada nesta dissertação, este andar de pré-amplificação não foi implementado, uma vez que o ganho necessário em tensão já foi conseguido no passo anterior, através do circuito de transimpedância. Após a amplificação, o sinal atravessa um filtro passa banda, filtro este que contém frequências de corte teóricas em 100 Hz e 1000 Hz (escolhidas de modo a permitir a passagem dos sinais na frequência de atuação dos LEDs). Porém, depois de dimensionar os filtros (dimensionamento descrito adiante nesta secção), e não sendo possível encontrar componentes com o valor exatamente igual ao dimensionado, as frequências de corte dos filtros foram um pouco alteradas, para os valores de 117 Hz para o filtro passa alto, e 947,35 Hz para o filtro passa baixo. Este ajuste em nada afetou o comportamento do sistema dimensionado. Esta primeira filtragem tem como objetivo eliminar o ruído que o sinal possa conter devido a várias interferências possíveis de acontecer. Depois de filtrado, o sinal passa por um multiplicador, onde o sinal de saída do filtro passa banda (com a informação do fotodiodo e algum ruído) é multiplicado por um sinal de referência que tem uma frequência de 490 Hz, frequência esta que é, como já foi referido, a mesma a que os LEDs estão a ser alimentados. Na fase seguinte, o sinal atravessa um filtro passa baixo para eliminar algum ruído que ainda persista. Este último filtro foi dimensionado para uma frequência de corte



teórica de 1000 Hz, capaz de remover ruído de elevada frequência. Porém, devido a alguns ajustes que foi necessário realizar no circuito, na prática, o mesmo apresenta uma frequência de corte de 947,35 Hz. Por fim, o sinal é sujeito a uma amplificação final, com ganho de 2. Na figura 21 encontra-se o esquemático do amplificador *lock-in* implementado.

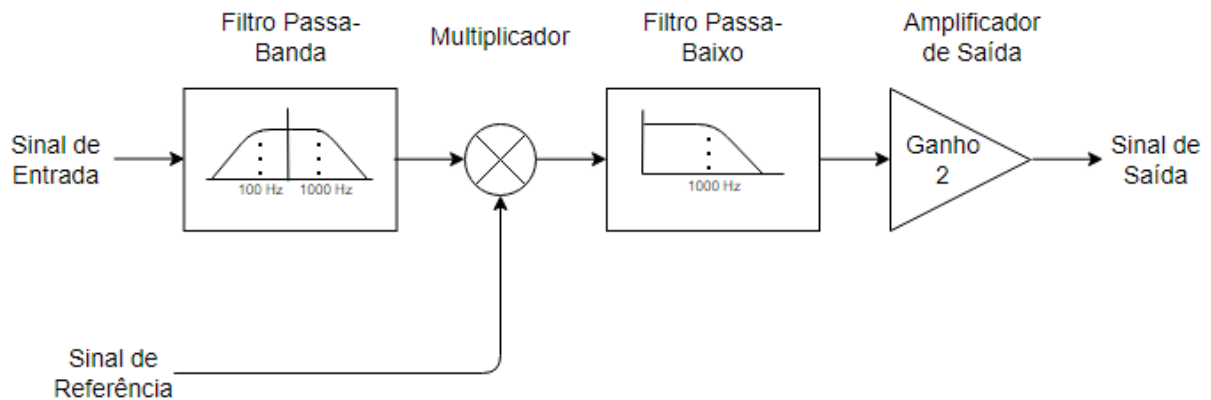


Figura 21 – Esquemático do amplificador *lock-in* implementado.

Após um estudo do amplificador *lock-in* e de compreender o seu funcionamento, passou-se ao dimensionamento dos seus módulos (filtro passa banda, multiplicador, filtro passa baixo e amplificador). O dimensionamento destes circuitos encontra-se descrito nos próximos pontos.

### 3.2.2.1 Filtro passa banda

Como se pode observar na figura 22, o filtro passa banda proposto é constituído, num primeiro andar, por um filtro passa alto *Sallen-Key* de ganho unitário e, posteriormente, por um filtro passa baixo *Sallen-Key* também de ganho unitário. Tanto o filtro passa alto como o passa baixo dimensionados são filtros de ordem 2, uma vez que oferecem uma resposta mais rápida (decaimento de 40 dB por década) comparando com os filtros de primeira ordem, que apresentam um decaimento de 20 dB por década (e que, por isso, apresentam uma resposta mais lenta com a variação da frequência). Optou-se por filtros *Sallen-Key* uma vez que estes apresentam ganho unitário, não interferindo com o ganho do circuito. É relevante referir que um aumento na ordem dos filtros iria provocar uma resposta mais rápida com a variação da frequência. Porém, a resposta dos filtros de segunda ordem já é satisfatória e o aumento de ordem iria provocar um aumento da complexidade e custo dos circuitos.

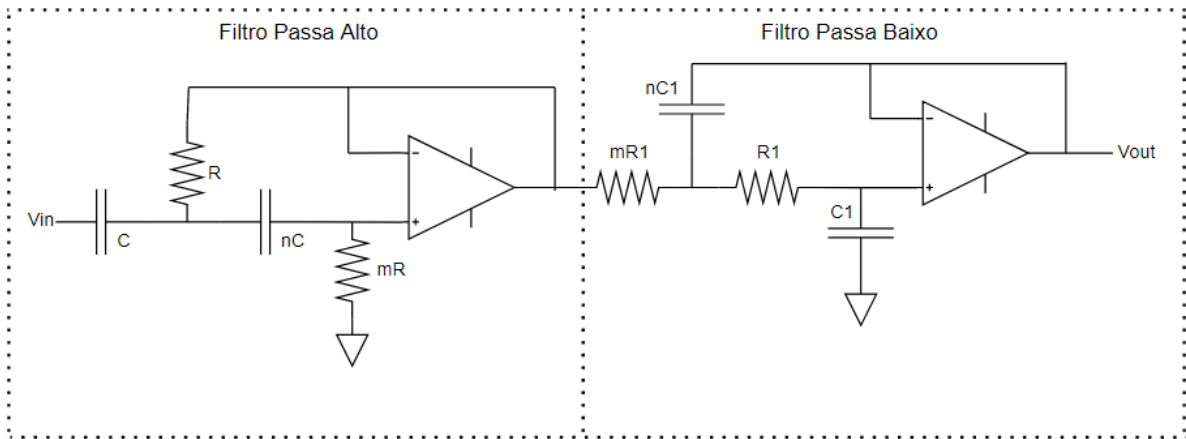


Figura 22 – Esquemático do filtro passa banda de 2ª ordem dimensionado.

○ Filtro Passa Alto

Para o dimensionamento do filtro passa alto, o primeiro passo foi escolher a frequência de corte, frequência essa que se encontra nos 100 Hz, que é suficiente para remover a componente DC dos sinais. Usando condensadores iguais ( $n = 1$ , onde  $n$  é a relação entre os condensadores), e considerando o fator qualidade do filtro ( $Q$ ) igual a 1 (dado pela figura 23), foi necessário determinar o valor de  $m$  (correspondente à relação entre as resistências  $R$  e  $mR$ ) a partir da expressão  $Q = \frac{\sqrt{m \cdot n}}{(n+1)}$ , obtendo-se  $m = 4$ .

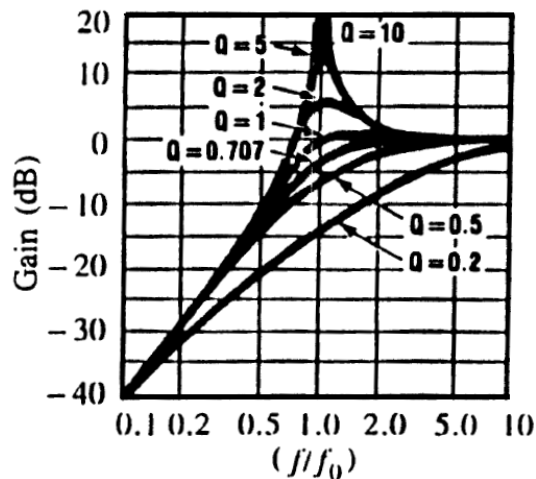


Figura 23 – Fator de qualidade do filtro passa alto [39].

Após o cálculo de  $m$ , o próximo passo foi calcular o valor da resistência  $R$  a partir da expressão  $F_c = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot \sqrt{m \cdot n} \cdot R \cdot C}$ , onde  $F_c$  é a frequência do corte do filtro e  $C$  é o valor do condensador a utilizar no filtro. Assumindo um valor de 10 nF para os condensadores (de igual valor para  $C$  e  $nC$ ), obtém-se uma

resistência ( $R$ ) de 79,577 k $\Omega$ . Consultando os valores comerciais de resistências, e na ausência de resistências semelhantes, recorreu-se a uma resistência de 68 k $\Omega$ , não comprometendo o correto funcionamento do circuito. Calculado o valor de  $R$ , o valor de  $mR$  é dado por  $mR = m * R$ , ou seja,  $mR = 318,308$  k $\Omega$ . Na prática, usou-se uma resistência de 330 k $\Omega$  para  $mR$ . Tendo sido alterados os valores de alguns componentes do circuito, também a frequência de corte do filtro foi ligeiramente alterada, sendo a nova frequência de corte de 117,02 Hz.

Após o dimensionamento do filtro, este foi, numa primeira fase, simulado com recurso ao NI Multisim 14.0, como se pode observar na figura 24, onde se encontra o esquemático do circuito dimensionado, de forma a simular o seu funcionamento antes de passar à implementação em *breadboard* e posteriormente em PCB.

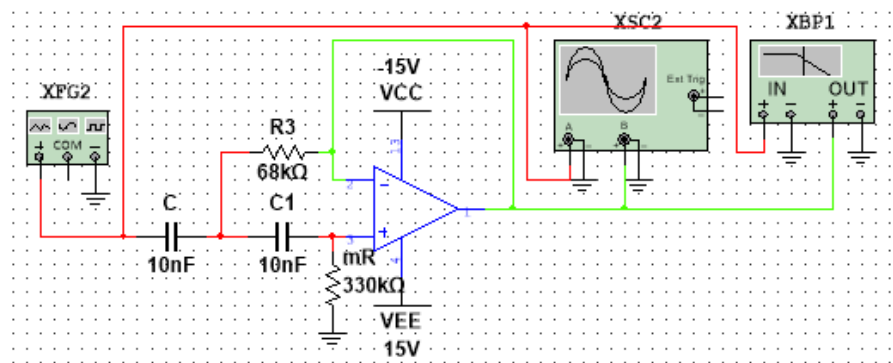


Figura 24 - Circuito do filtro passa alto dimensionado, implementado no programa de simulação NI Multisim 14.0.

Na simulação, procedeu-se à análise do diagrama de bode do circuito, de modo a comprovar o comportamento do circuito em frequência, ou seja, verificar se os sinais com frequência menor do que 117,02 Hz são atenuados. Em simultâneo, o filtro foi implementado em *breadboard* e determinou-se o seu diagrama de bode experimental, a partir da medição do valor do ganho para várias frequências, para comparação com os valores simulados. A figura 25 apresenta a comparação entre o diagrama de bode simulado e o experimental do filtro passa alto de 2ª ordem. Observando o gráfico, é possível concluir que, como esperado, o circuito apresenta uma frequência de corte próxima dos 100 Hz, ou seja, atenua a amplitude de todos os sinais que estejam abaixo dessa frequência e deixa passar os sinais acima da frequência. O gráfico mostra ainda que não existe grande disparidade entre os valores obtido em simulação com os valores obtidos experimentalmente, concluindo-se assim que o circuito dimensionado se encontra a funcionar corretamente.

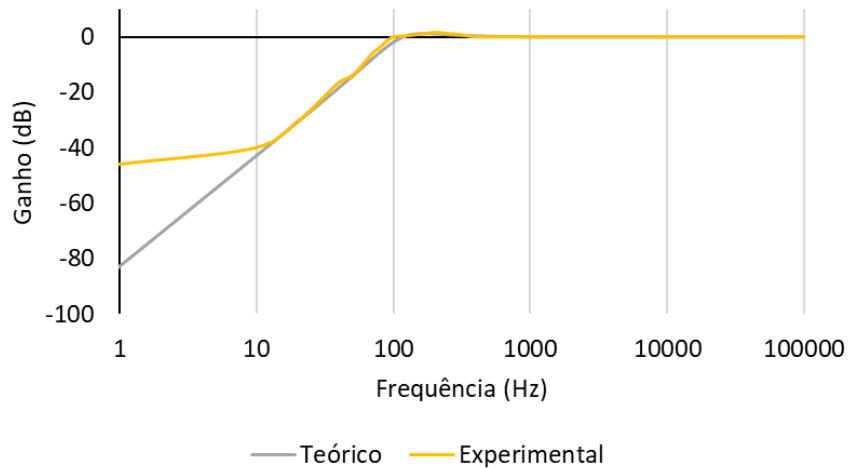


Figura 25 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa alto de 2ª ordem.

○ Filtro Passa Baixo

Dimensionado e testado o circuito do filtro passa alto de 2ª ordem, dimensionou-se a segunda parte do filtro passa banda, nomeadamente o filtro passa baixo de 2ª ordem. Assumiu-se uma frequência de corte nos 1000 Hz, e assumiu-se, a partir da figura 26, o fator de qualidade do filtro ( $Q$ ) que, tal como no filtro passa alto, é 1. De seguida, considerou-se a utilização de duas resistências iguais no dimensionamento do filtro, o que implica  $m = 1$ . Escolhidos todos os valores para os parâmetros iniciais, calculou-se o valor de  $n$  a partir da expressão  $Q = \frac{\sqrt{m \cdot n}}{(m+1)}$ , obtendo-se  $n = 4$ .

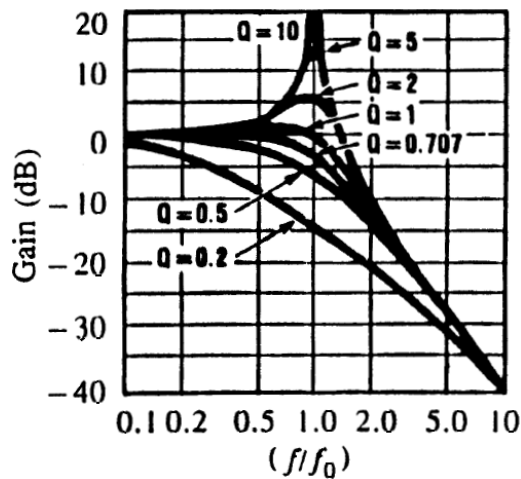


Figura 26 - Fator de qualidade do filtro passa baixo [39].

A partir destes parâmetros, dimensionaram-se os componentes do filtro passa baixo (tal como representado no esquemático da figura 22), através, uma vez mais, da equação  $F_c = \frac{1}{2 * \pi * \sqrt{m * n * R * C}}$ . Assim, considerou-se um valor de 5,6 nF para C1, obtendo-se um valor de 20,3 kΩ para o valor de R1 e de mR1. O valor de nC1 é dado por  $nC1 = n * C1$ , pelo que se chega a  $nC1 = 22,4$  nF. Na prática, recorreu-se a um condensador de 22 nF para nC1, assim como a duas resistências de 15 kΩ. Realizando novamente o cálculo da frequência de corte através da mesma expressão, e substituindo os valores dos parâmetros pelos valores dos componentes, obtêm-se a seguinte 947,35 Hz como valor frequência de corte do filtro dimensionado.

O filtro passa baixo de 2ª ordem dimensionado foi simulado no programa NI Multisim 14.0. A figura 27 ilustra o circuito realizado no NI Multisim 14.0 para realizar a simulação.

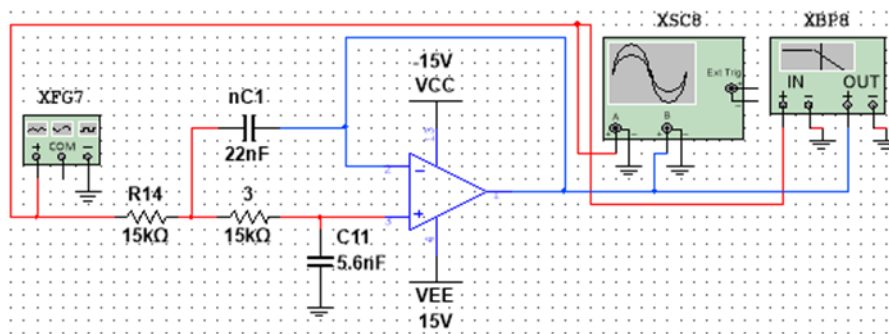


Figura 27 - Circuito implementado no programa NI Multisim 14.0 para a realização da simulação do filtro passa baixo de 2ª ordem.

A figura 28 apresenta o diagrama de bode simulado e experimental do filtro passa baixo de 2ª ordem dimensionado. Analisando o mesmo, pode-se concluir que este tem uma frequência de corte na ordem dos 950 Hz, como expectável. Pela observação dos dois diagramas de bode conclui-se que, e como expectável, existem poucas diferenças entre os mesmos, sendo que o circuito funciona como o previsto.

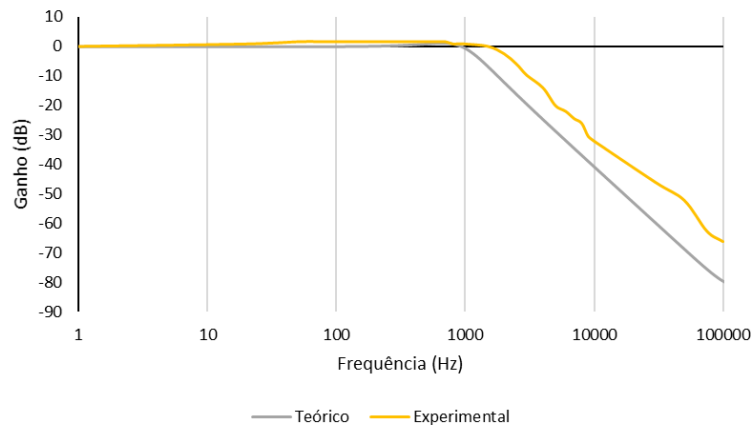


Figura 28 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa baixo de 2ª ordem.

Dimensionados os dois filtros necessários para implementar o filtro passa banda (filtro passa alto *Sallen-Key* de ganho unitário e filtro passa baixo *Sallen-Key* de ganho unitário), realizou-se a junção dos mesmos para o propósito final. Da mesma forma como nos testes dos circuitos anteriores, em primeiro lugar testou-se o circuito no programa de simulação NI Multisim 14.0 e só depois se passou para o teste em *breadboard*. Na figura 29 encontra-se o circuito dimensionado do filtro passa banda implementado no NI Multisim 14.0.

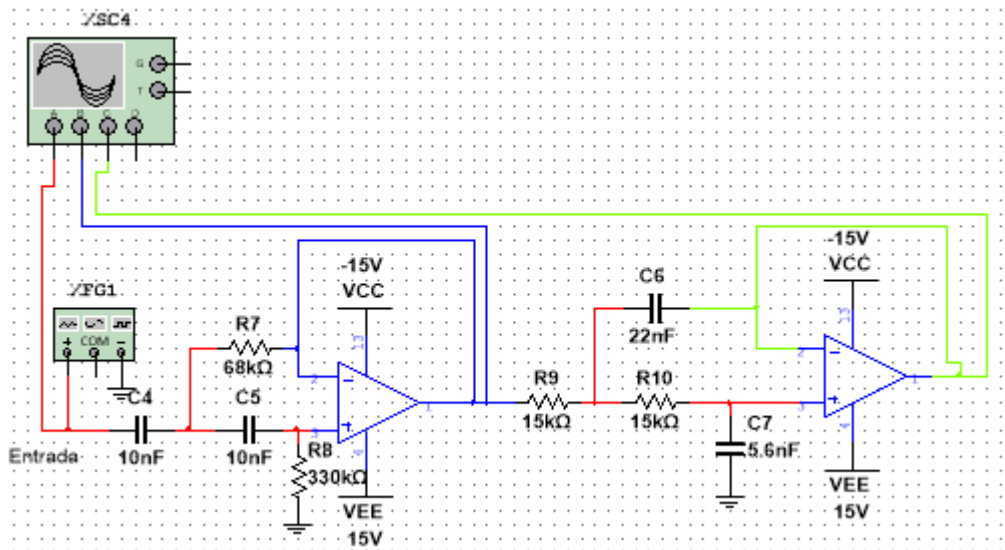


Figura 29 - Circuito implementado no programa NI Multisim 14.0 para a realização da simulação do filtro passa banda.

A figura 30 apresenta a comparação entre o diagrama de bode simulado e experimental do filtro passa banda dimensionado. Se os traçados forem analisados vê-se que ambos são semelhantes, existindo apenas uns pequenos desvios pouco significativos para a aplicação pretendida.

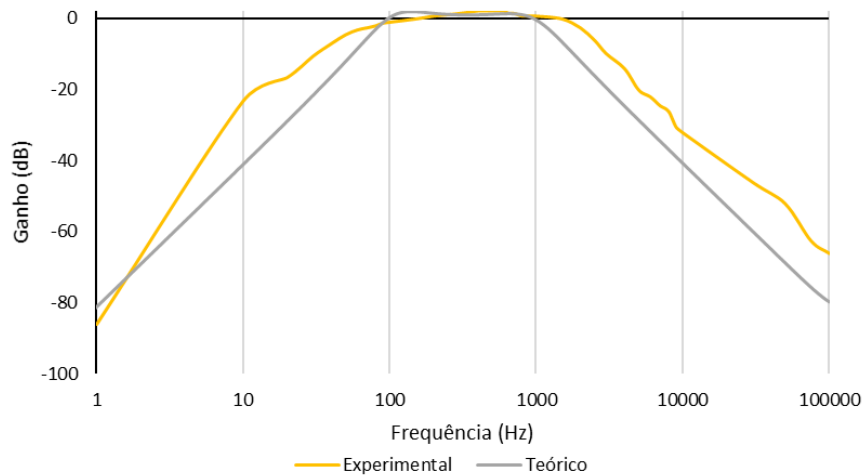


Figura 30 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa banda.

### 3.2.2.2 Multiplicador

Seguindo a estrutura proposta para o desenvolvimento de um amplificador *lock-in*, o próximo sistema a dimensionar é um multiplicador. No caso, foi utilizado um multiplicador comercial AD633JN [40]. A função do multiplicador será, e como o próprio nome indica, multiplicar o sinal de saída do filtro passa banda por uma onda de referência, sem ruído, com a frequência de 490 Hz, frequência esta que é a mesma a que os LEDs se encontram atuados. Na figura 31 encontra-se representado o diagrama de blocos do multiplicador utilizado, em que X1, X2, Y1 e Y2 são as entradas do mesmo, Vs+ e Vs- as tensões de alimentação positiva e negativa, W a saída do multiplicador e Z a entrada para a tensão de *offset*.

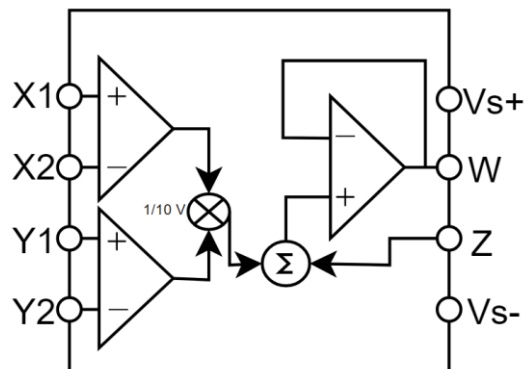


Figura 31 - Diagrama de blocos do multiplicador AD633JN.

A função de transferência do multiplicador é dada por  $W = \frac{(X1-X2)*(Y1-Y2)}{10} + Z$ , [40], ou seja, o valor das entradas será dividido por 10, o que provoca uma diminuição significativa da tensão de saída, comparando com as tensões de entrada.

Como em todos os circuitos dimensionados anteriormente, o multiplicador também foi simulado no NI Multisim 14.0 antes de ser testado na prática. Para o efeito, utilizou-se o circuito apresentado na figura 32, circuito este que apresenta duas fontes de alimentação, com frequência e amplitude variáveis, uma para cada uma das entradas do circuito integrado. Como não se pretende subtrair nada ao sinal vindo das fontes, as entradas X2 e Y2 são ligadas ao *ground*. O *offset* do circuito encontra-se também ligado ao *ground*.

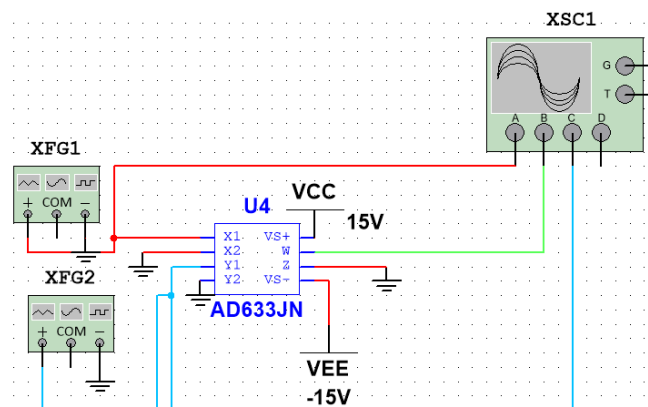


Figura 32 - Circuito utilizado para simulação do integrado AD633JN.

Na primeira simulação realizada, colocaram-se duas ondas iguais na entrada, ambas sinusoidais, com uma amplitude de 10 V e com uma frequência de 490 Hz. Na figura 33, apresenta-se o sinal de saída do multiplicador (a cinza) para dois sinais de entrada iguais (linhas laranja e azul). As entradas X1 e Y1 encontram-se sobrepostas. Como esperado, a saída do multiplicador encontra-se sempre positiva, uma vez que ao multiplicar dois sinais negativos os mesmos passam a positivos. Também é possível verificar que a frequência da onda de saída se torna o dobro da frequência das ondas de entrada.



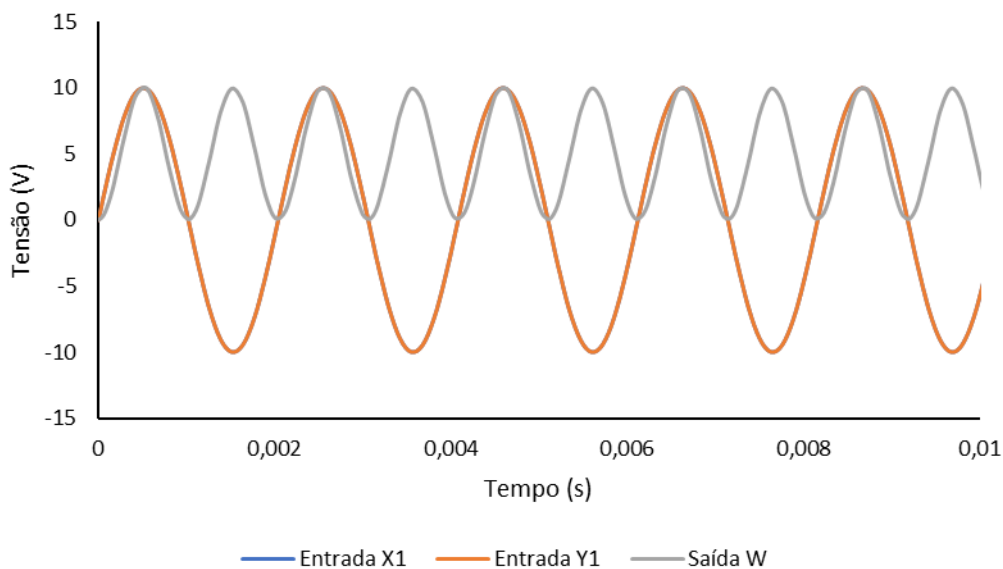


Figura 33 - Simulação do multiplicador AD633JN para duas entradas iguais constituídas por duas ondas sinusoidais com uma amplitude de 10 V de pico e com uma frequência de 490 Hz.

De seguida, simulou-se o comportamento do circuito multiplicador para duas ondas de diferente frequência e amplitude. Colocando na entrada Y1 uma onda com 5 V de amplitude de pico e frequência de 350 Hz e na entrada X1 uma onda com 10 V de amplitude de pico e frequência de 490 Hz, obteve-se na saída uma onda com duas componentes em frequência: uma primeira a rondar os 140 Hz (correspondente à subtração  $490 \text{ Hz} - 350 \text{ Hz}$ ), e uma segunda frequência de 840 Hz (correspondente à soma  $490 \text{ Hz} + 350 \text{ Hz}$ ). O resultado desta simulação encontra-se representado na figura 34, e vem de encontro ao esperado ao multiplicar dois sinais sinusoidais.

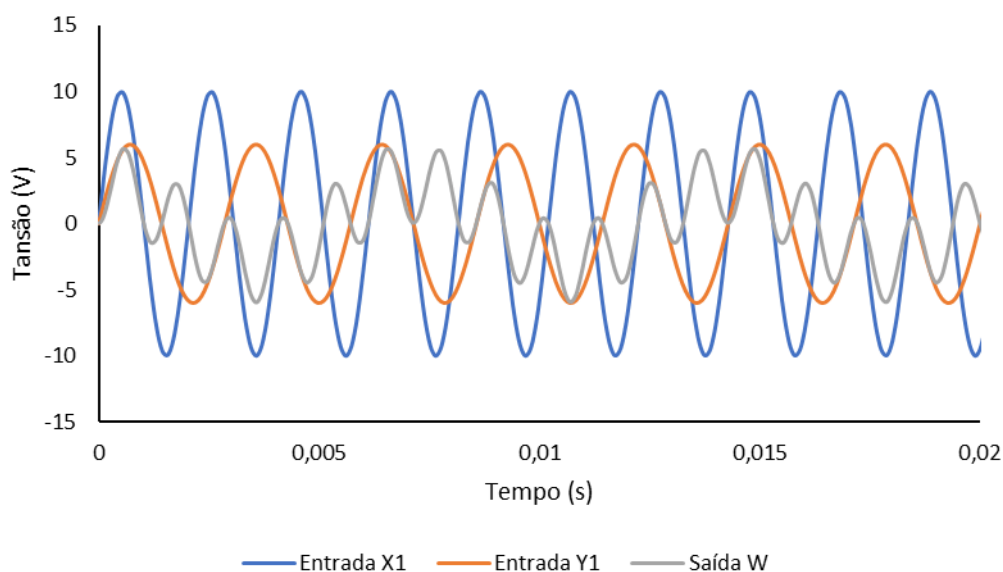


Figura 34 - Simulação do multiplicador para duas entradas com frequências diferentes.

Experimentalmente, o circuito multiplicador foi testado com duas ondas de entrada iguais no multiplicador (ligadas a X1 e Y1), ondas estas com frequência de cerca de 500 Hz e uma amplitude de 3 V. Os pinos do multiplicador X2 e Y2 foram ligados à massa, tal como na simulação. O sinal de saída do multiplicador é apresentado na figura 35. Observa-se que o circuito multiplicador funciona como esperado, e o valor de tensão de pico na saída W (cerca de 1V) é coerente com a expressão da função de transferência do multiplicador.

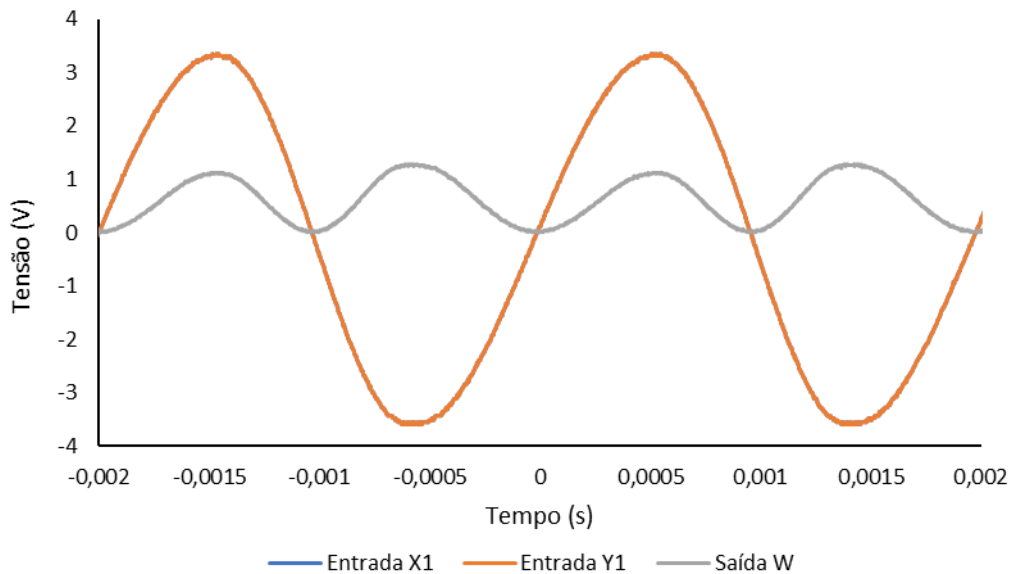


Figura 35 - Teste experimental do circuito multiplicador com duas entradas iguais de 500 Hz de frequência e 3 V de amplitude.

### 3.2.2.3 Filtro Passa Baixo de 2ª Ordem

Na saída do multiplicador, o amplificador *lock-in* deve incluir ainda um novo filtro passa baixo, de forma a eliminar algum ruído de alta frequência que ainda exista no sistema. Da mesma forma como fora dimensionado o filtro passa baixo anterior, também se iniciou o dimensionamento deste novo filtro de 2ª ordem por escolher a frequência de corte do mesmo (1000 Hz). Escolheu-se o fator de qualidade dos filtros ( $Q$ ) igual aos casos anteriores, ou seja,  $Q = 1$ . Após a escolha do fator de qualidade e partindo pressuposto que as resistências que constituem o filtro serão iguais ( $m = 1$ ) calculou-se, uma vez mais, o valor de  $n$  através de  $Q = \frac{\sqrt{m \cdot n}}{(n+1)}$ , obtendo-se  $n = 4$ .

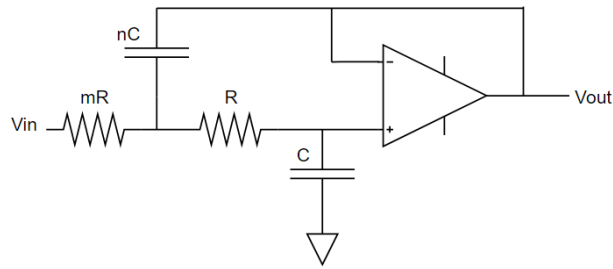


Figura 36 - Esquemático do filtro passa baixo dimensionado.

A partir da relação  $n = 4$ , considerou-se então  $C = 5,6 \text{ nF}$  e  $nC = 22 \text{ nF}$  (ambos disponíveis comercialmente). Deste modo, calculou-se o valor das resistências  $R$  e  $mR$  a partir da expressão  $F_c = \frac{1}{2 * \pi * \sqrt{m * n * R * C}}$ , obtendo-se  $14,210 \text{ k}\Omega$ . Experimentalmente, utilizaram-se duas resistências de  $15 \text{ k}\Omega$ . Devido a estes ajustes, determinou-se a nova frequência de corte do circuito, obtendo-se o valor de  $947,35 \text{ Hz}$ , pelo que esta alteração não trará impacto no bom funcionamento do circuito.

Tal como nos circuitos anteriores, o circuito dimensionado foi simulado no NI Multisim 14.0, utilizando o esquemático presente na figura 37.

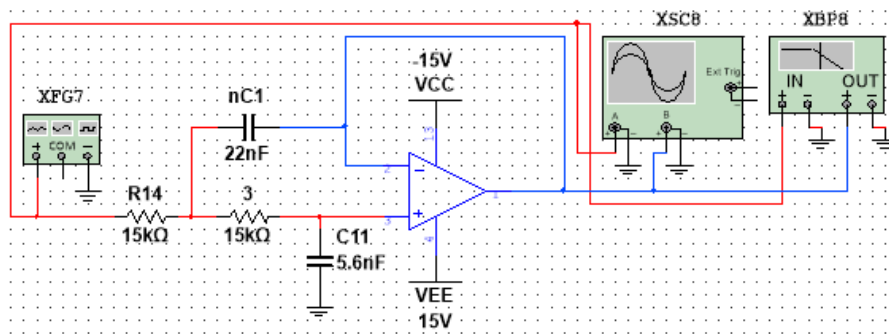


Figura 37 - Circuito implementa no programa NI Multisim 14.0 para a realização da simulação do filtro passa baixo de 2ª ordem.

A figura 38 apresenta a comparação entre o diagrama de bode simulado e experimental do filtro passa baixo dimensionado, que representa a resposta em frequência do filtro. Como expectável, o filtro apresenta uma frequência de corte perto dos  $1000 \text{ Hz}$ . Experimentalmente, a frequência de corte é ligeiramente superior, encontrando-se mais próxima dos  $1500 \text{ Hz}$ , não pondo em causa o funcionamento do circuito.

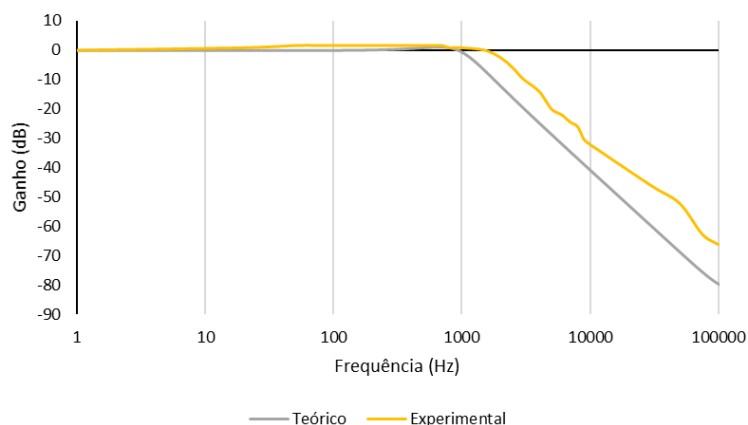


Figura 38 - Comparação dos diagramas de bode obtidos experimentalmente e teoricamente para o filtro passa baixo de 2ª ordem.

### 3.2.2.4 Amplificador de Saída

O último componente do amplificador *lock-in* dimensionado é um amplificador inversor de ganho 2. O esquemático do circuito encontra-se representado na figura 39. A tensão de saída do amplificador é dada por  $V_{out} = -\left(\frac{R_f}{R}\right) * V_{in}$ , onde  $V_{out}$  é a tensão de saída do circuito,  $R$  a resistência de entrada,  $R_f$  a resistência de referência e  $V_{in}$  a tensão de entrada. O ganho do amplificador é dado por  $G = \frac{R_f}{R}$ .

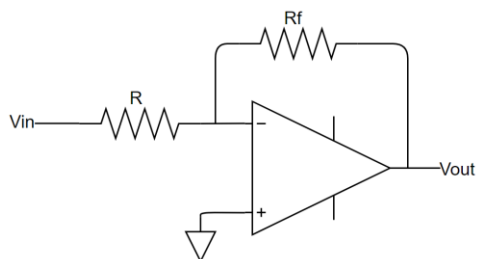


Figura 39 - Esquemático do amplificador inversor dimensionado.

Analisando o valor das resistências comerciais existentes, optou-se por usar uma resistência com o valor de 10 kΩ para  $R_f$  e uma resistência de 4,7 kΩ para  $R$ , obtendo-se um ganho de 2,12. Na figura 40 encontra-se o circuito desenhado em NI Multisim 14.0 para a simulação do amplificador inversor.

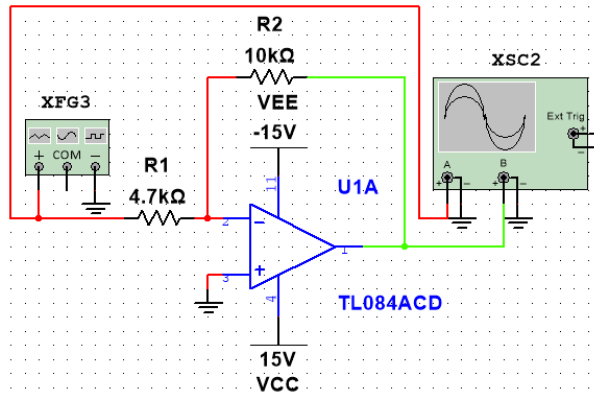


Figura 40 - Circuito implementado no NI Multisim 14.0 para a simulação do amplificador inversor.

A figura 41 apresenta a resposta do amplificador inversor para uma onda de entrada de 100 mV de amplitude e frequência 490 Hz, o que implica uma onda na saída com a mesma frequência da onda de entrada, o dobro da amplitude e fase invertida.

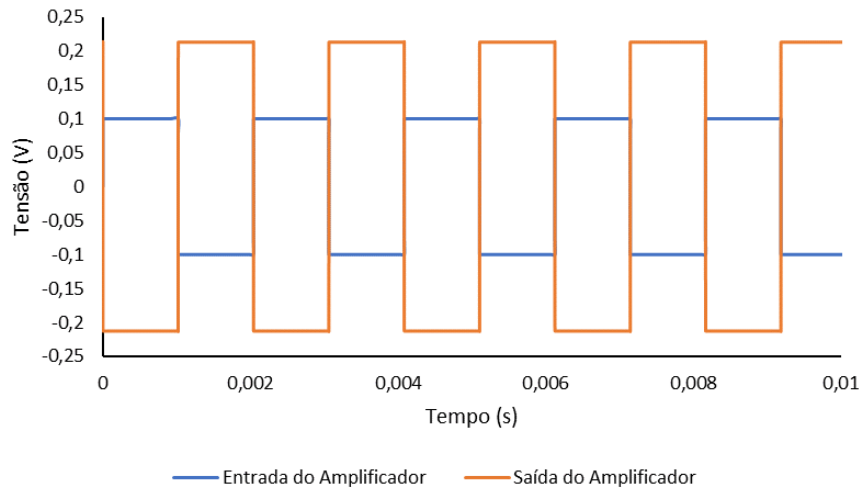


Figura 41 - Simulação do amplificador inversor no NI Multisim 14.0.

Simulados todos os componentes que fazem parte do amplificador *lock-in* (incluindo o filtro passa banda, multiplicador, filtro passa baixo e amplificador de saída) simulou-se o circuito completo em NI Multisim 14.0. Nas simulações realizadas, colocaram-se ondas de 490 Hz com ruído na entrada. O objetivo do amplificador passa então pela recuperação da onda na frequência pretendida, mas com a eliminação do ruído. Na figura 42 encontra-se o circuito que será utilizado para a simulação do amplificador *lock-in*, onde é possível observar todos os componentes que constituem o mesmo. É relevante notar que, para esta simulação, na ausência do fotodiodo e do circuito de transimpedância para conversão da corrente em tensão, considerou-se na simulação, em alternativa, uma entrada já em

tensão, com um primeiro andar amplificador inversor (com ganho 50), antes do filtro passa banda. Na prática, este amplificador não estará presente na placa de aquisição desenvolvida.

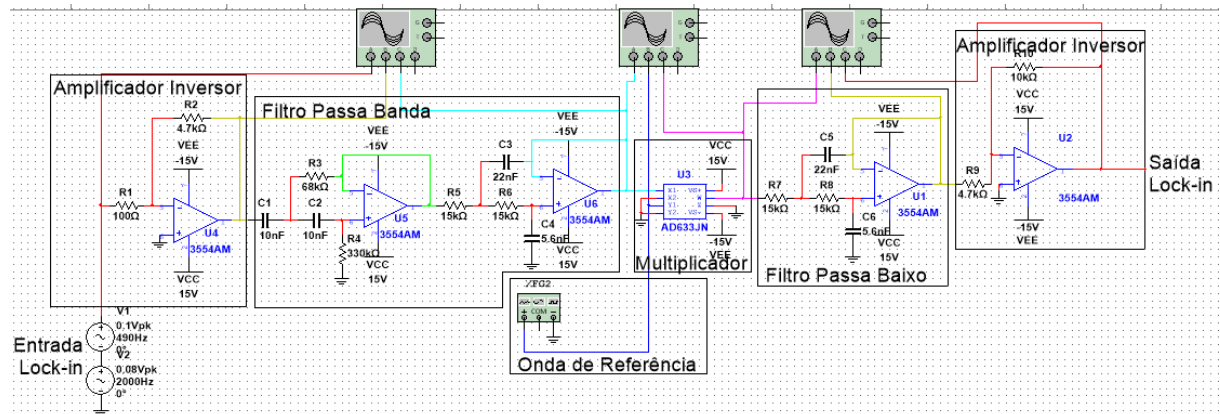
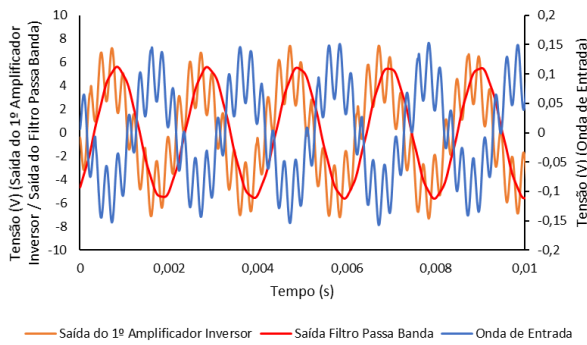


Figura 42 - Circuito realizado em NI Multisim 14.0 para o teste do amplificador *lock-in* dimensionado.

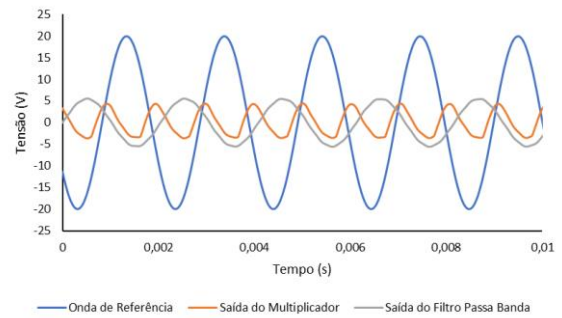
O amplificador *lock-in* foi testado com diferentes combinações de sinais de ruído, em particular com ruídos de diferentes frequências e amplitudes, inclusivamente próximas da amplitude do sinal da onda a recuperar.

A figura 43 apresenta a simulação do amplificador *lock-in* para uma onda de entrada de 490 Hz com 0,1 V de pico e com um sinal de ruído sobreposto, com 4000 Hz de frequência e com 0,05 V (figura 43 a)). O amplificador inversor inverte e amplifica o sinal (incluindo o ruído), passando a onda de um pico de perto de 0,15 V para um pico 7 V. Na saída do filtro passa banda (também na figura 43 a)), observa-se que o sinal mantém a amplitude mas o ruído é removido quase na sua totalidade. De seguida, na figura 43 b), pode analisar-se o efeito do multiplicador no *lock-in*, tendo sido considerada uma onda de referência com frequência de 490 Hz (a mesma frequência da onda que se pretende recuperar), e amplitude de 20 V. A amplitude elevada da onda de referência justifica-se pela função de transferência do multiplicador, que implica uma divisão por 10, tal como previamente referido, o que irá diminuir a amplitude de saída da mesma. Por fim, após a última filtragem e amplificação, tal como observado na figura 43 c), a onda de saída do *lock-in* é uma senoide sem ruído, tal como esperado, e de frequência correspondente à soma das frequências da onda de entrada e de referência (cerca de 952 Hz).

a)



b)



c)

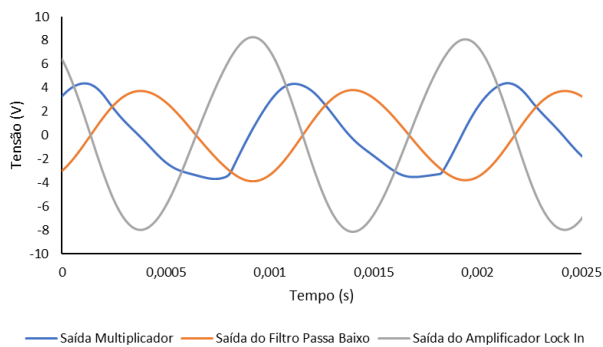


Figura 43 – Simulação do amplificador *lock-in* para uma onda de entrada de 490 Hz e 0,1 V, e ruído de 4000 Hz e 0,05 V. a) Entrada, saída do 1º amplificador inversor e saída do filtro passa banda. b) Onda de referência, onda de saída do multiplicador e onda de saída do filtro passa banda. d) Saída do multiplicador, saída do filtro passa baixo de 2ª ordem e saída do 2º amplificador inversor, correspondente à saída do amplificador *lock-in*.

De seguida, de modo a verificar a robustez do circuito, repetiu-se a simulação para uma onda de entrada, com sinal sobreposto de baixa frequência (10 Hz), tal como apresentado na figura 44 a). Foi aplicada à onda de entrada (uma onda sinusoidal de 490 Hz e 0,1 V de pico) uma componente de sinal de 10 Hz com uma amplitude de 0,05 V de pico. A figura 44 apresenta a resposta do amplificador *lock-in*, tendo sido considerada, uma vez mais, uma onda de referência de 490 Hz e 20 V. Na saída do amplificador *lock-in* é possível observar a completa reconstituição da onda de entrada sem nenhum ruído. A onda de saída tem uma frequência de 990 Hz devido ao facto de ter passado pelo multiplicador (onde ocorreu a soma da frequência dos dois sinais) e uma amplitude de cerca de 8 V. Após a análise das simulações realizadas, conclui-se que o amplificador *lock-in* tem os resultados esperados, conseguindo extrair uma onda de um ambiente com elevado ruído a partir de uma onda de referência.

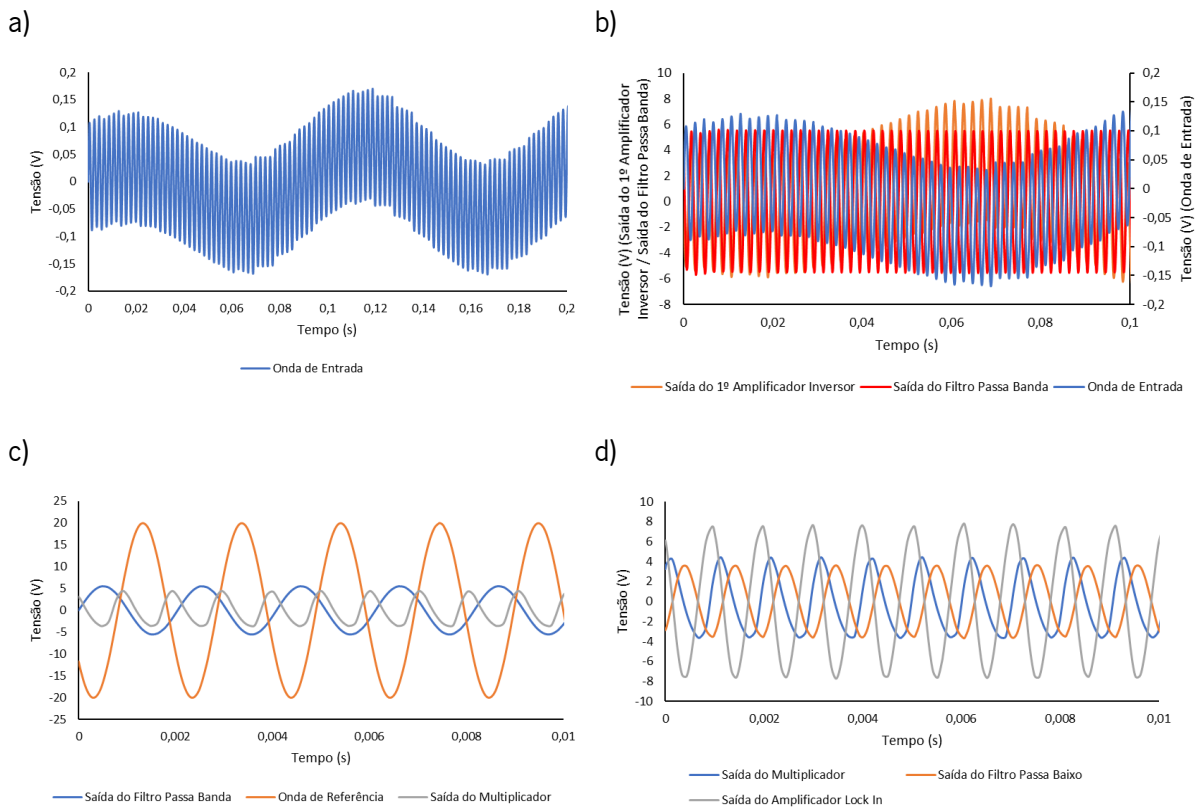


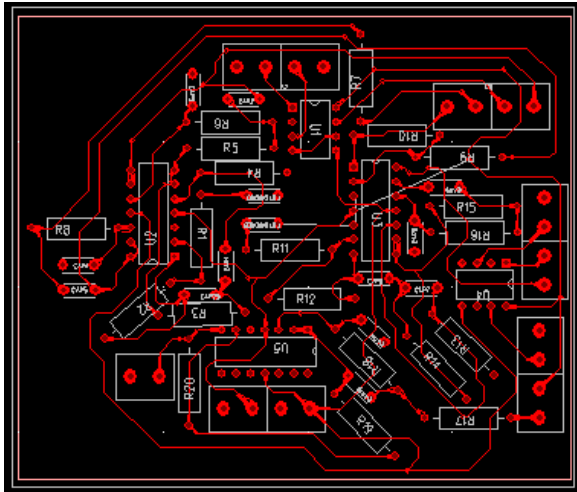
Figura 44 – Simulação do amplificador *lock-in* para uma onda de entrada de 490 Hz e 0,1 V, e com uma componente adicionada de 10 Hz e 0,05 V. a) Entrada do amplificador *lock in* (escala de tempo alargada para visualização da oscilação de baixa frequência). b) Entrada, saída do 1º amplificador inversor e saída do filtro passa banda. c) Onda de referência, onda de saída do multiplicador e onda de saída do filtro passa banda. d) Saída do multiplicador, saída do filtro passa baixo de 2ª ordem e saída do 2º amplificador inversor, correspondente à saída do amplificador *lock-in*.

### 3.2.4 Desenho das PCB de aquisição e tratamento de sinal e do encapsulamento do protótipo

Uma vez testado o amplificador *lock-in*, e caracterizada a resposta do fotodiodo que se iria utilizar, desenvolveu-se numa primeira fase uma PCB para aquisição e tratamento de sinal individual, isto é, sem a incorporação do sistema de iluminação, que servirá para testar o sistema para absorbância, isto é, com as placas de emissão e aquisição independentes e alinhadas entre si. Na figura 45 encontra-se representado o *layout* da PCB desenvolvida com auxílio do programa PADS (figura 45 a)). Na figura 45 b) encontra-se uma fotografia da placa desenvolvida, já depois de serem soldados todos os componentes, soldagem esta que foi realizada no laboratório do CMEMS, sendo a impressão da PCB feita na empresa Guimocircuito.



a)



b)

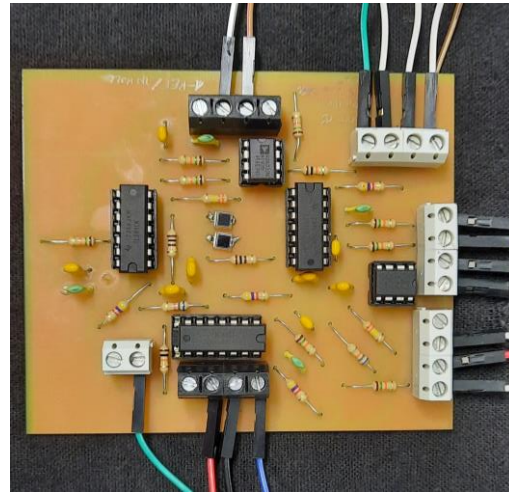


Figura 45 - a) Esquemático da PCB do circuito de aquisição e tratamento de sinal implementado, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de aquisição e tratamento de sinal desenvolvida, com dimensão total de 10 cm x 8,3 cm.

Uma vez soldados todos os componentes na PCB, e de modo a testar a mesma com o maior rigor possível, foi desenhando um encapsulamento para o sistema de forma a isolar o sistema de qualquer perturbação óptica do exterior. Assim, foi desenvolvido em CAD, no software SOLIDWORKS 2018, uma proposta de encapsulamento para o sistema, e que pode ser observada na figura 46, onde serão inseridas a Placa de Iluminação 3 de um dos lados, a placa de aquisição e tratamento de sinal do outro lado, e no centro serão colocadas cuvetes com as amostras a medir, no caso, contendo hemozoina sintética. O protótipo tem ainda um espaçamento para posicionamento dos filtros óticos necessários à seleção de cada comprimento de onda. Após a colocação de todos os componentes, será inserida uma cobertura, também ela desenhada em CAD, para isolar o sistema de interferências exteriores.

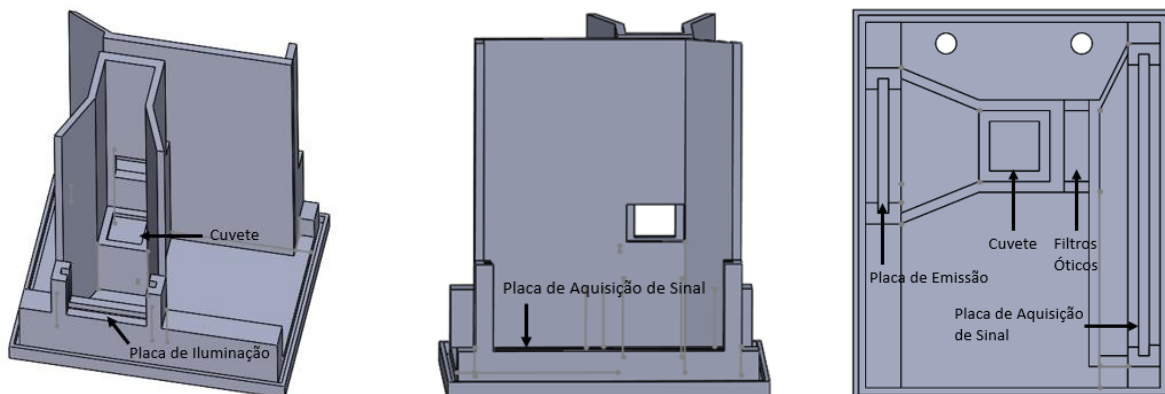


Figura 46 – Proposta de encapsulamento para os testes a realizar para a absorbância com a Placa de Emissão 3 e a placa de aquisição e tratamento de sinal.

Na figura 47 encontra-se uma fotografia do sistema desenvolvido e inserido no encapsulamento proposto.

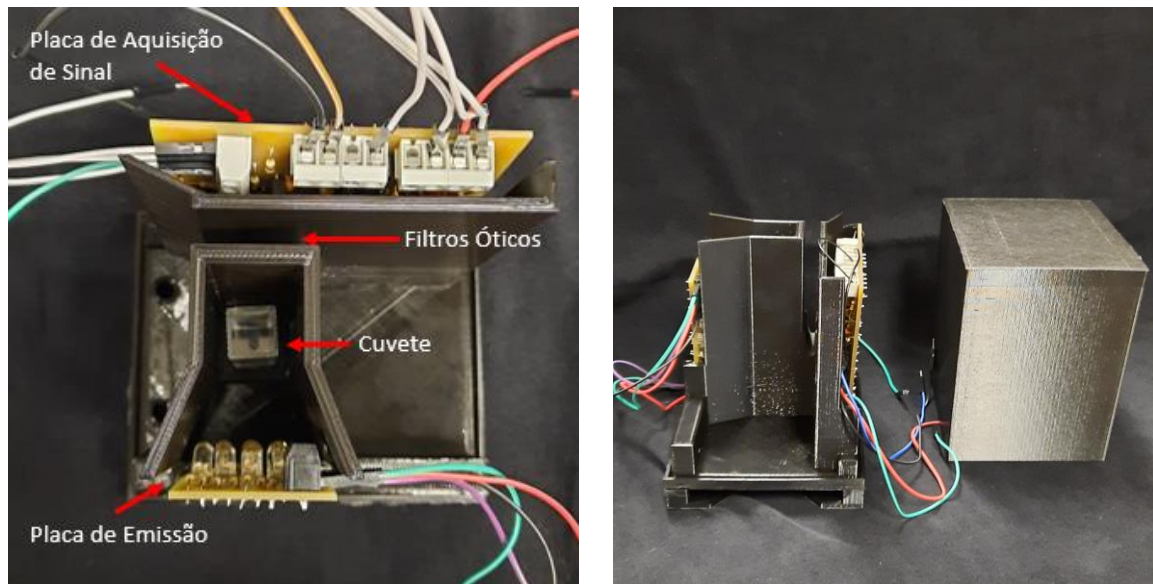
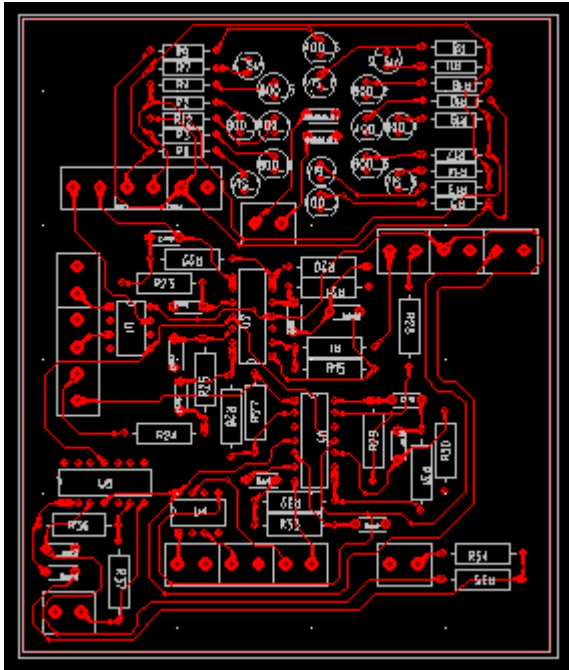


Figura 47 – Fotografias do sistema desenvolvido para a caracterização do sistema na configuração experimental de absorbância ótica.

Seguidamente, foi também desenvolvida uma PCB com o sistema de iluminação e o sistema de aquisição e tratamento de sinal integrados na mesma placa. Nesta configuração, a luz emitida pela placa incidirá na amostra e será refletida, ou seja, voltará para trás com um ângulo de  $180^\circ$ , sendo adquirida pelos fotodiodos presentes. Assim, será possível testar o funcionamento do sistema desenvolvido para reflectância ótica, como é o objetivo desta dissertação. O esquemático da placa desenvolvida encontra-se na figura 48 a), esquemático este, desenvolvido mais uma vez com recurso ao programa PADS. Na figura 48 b) encontra-se a PCB já com todos os componentes soldados, soldagem esta que foi realizada nos laboratórios do CMEMS com a impressão da placa a ser feita na Guimocircuito. É importante notar que, nesta placa, os LEDs e fotodiodos encontram-se agrupados na mesma região da PCB (estando os fotodiodos posicionados no centro da área de emissão ótica dos LEDs) e, por isso, essa região deverá ser isolada óticamente do exterior.

a)



b)

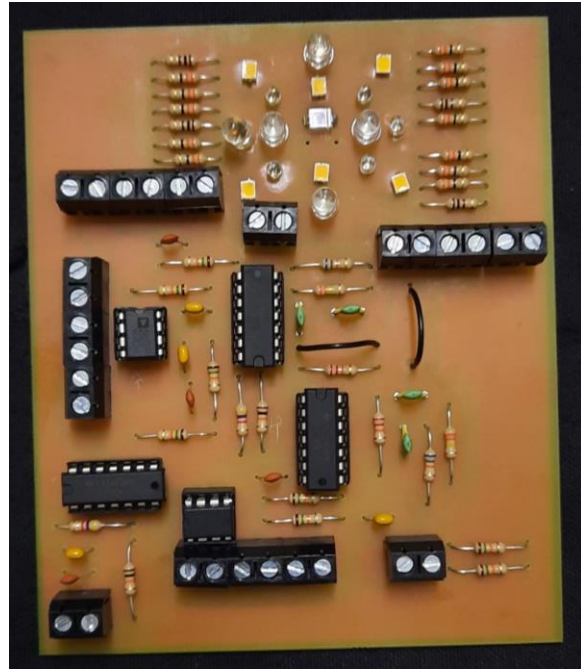


Figura 48 - a) Esquemático da PCB do circuito de aquisição e tratamento de sinal implementado, e integrado com o sistema de iluminação, desenvolvida com o apoio do programa PADS. b) Fotografia da placa de aquisição e tratamento de sinal desenvolvida com o sistema de iluminação incorporado (visível no topo da placa), com dimensão total de 10,2 cm x 12,2 cm.

De igual modo ao sucedido com o conjunto anterior (Placa de Emissão 3 e placa de aquisição e condicionamento de sinal), foi também criado um encapsulamento para a placa que incorpora os dois sistemas (o sistema de emissão e o sistema de aquisição e tratamento de sinal em simultâneo). A proposta de encapsulamento desenhada encontra-se representada na figura 49, contendo uma região para a placa eletrónica, uma região para os filtros óticos que irão seleccionar os comprimentos de onda de interesse, e uma região para o posicionamento das cuvetes com as amostras, onde se irá medir a reflectância ótica.

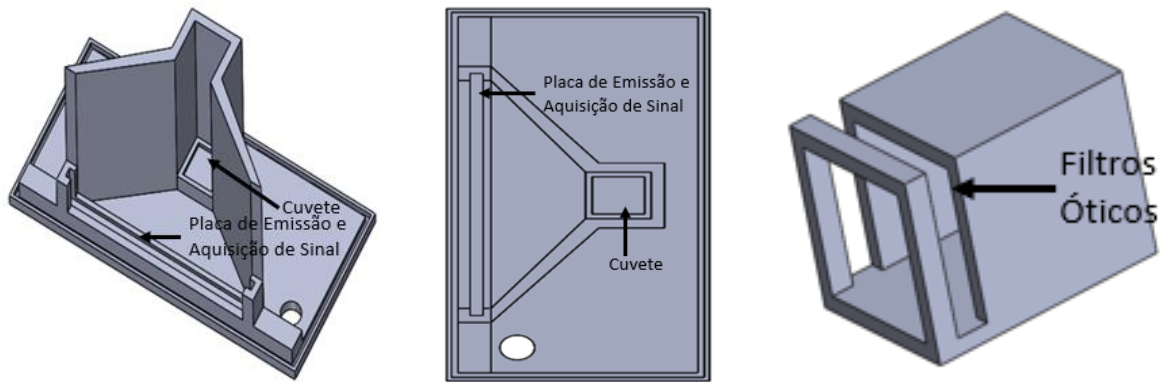


Figura 49 – Proposta de encapsulamento desenhada em CAD para a PCB que contém o sistema de iluminação e o sistema de aquisição e tratamento de sinal integrados.

Na figura 50 encontra-se uma fotografia do sistema desenvolvido e inserido no encapsulamento proposto.

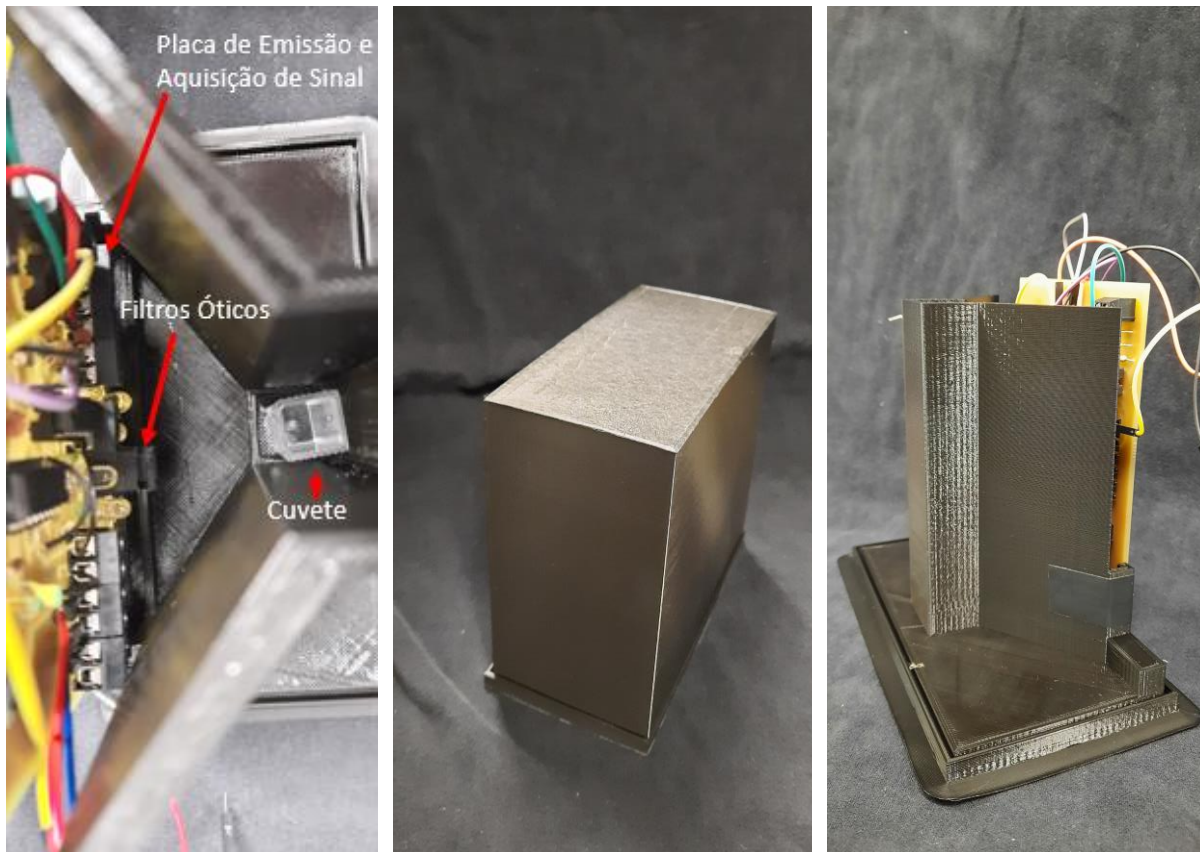


Figura 50 - Fotografias do sistema desenvolvido para a caracterização do sistema em reflectância ótica.

### 3.3 Montagens experimentais utilizadas para a caracterização dos circuitos de emissão ótica

Foram utilizadas diferentes montagens experimentais para a caracterização dos circuitos de emissão ótica baseados em LEDs. As montagens utilizadas e os procedimentos experimentais serão descritos nesta secção.

#### 3.3.1 *Setup* Espectrofotométrico

Os resultados da caracterização das placas de emissão de luz foram obtidos através de testes realizados no *setup* apresentado na figura 51, que é constituído pela placa de iluminação desenvolvida nesta dissertação, alimentada por um Arduino Mega 2560, onde é controlado o *duty cycle* de uma onda quadrada fazendo, por sua vez, variar a intensidade de iluminação dos LEDs. Os LEDs foram atuados de acordo com o código apresentado no Anexo II. A luz emitida pelos LEDs é captada por uma fibra ótica comercial, que se encontra alinhada por baixo dos mesmos. A luz é guiada pela fibra ótica até um espectrofotómetro AvaSpec-ULS2048XL EVO da Avantes, com monocromador e fotodetetores integrados, que recebe a luz, converte-a para sinais digitais, e envia para o computador onde posteriormente é analisado no software AvaSoft 8.11 [20]. Em todos os ensaios espectrofotométricos, foi efetuado um varrimento da luz entre os 350 nm e os 850 nm, de modo a obter informação de todo o espectro relevante para o presente trabalho. De forma a melhorar a qualidade do teste e para evitar que a luz exterior tenha interferência nas medições realizadas, o sistema (zona de iluminação e captação da luz) foi coberto com um pano preto de forma a isolar opticamente o mesmo.

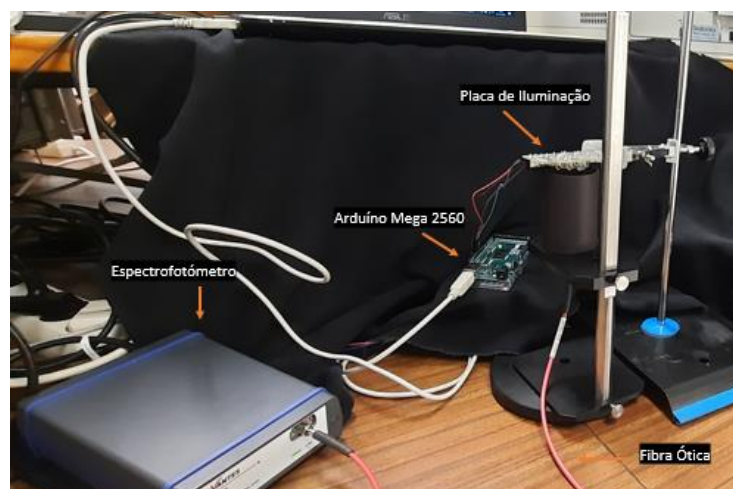


Figura 51 - Setup experimental utilizado para a medição do espectro de emissão da placa de iluminação.

### 3.3.2 Powermeter para medição da densidade ótica

Para uma melhor caracterização das placas de iluminação desenhadas, foram realizados testes com recurso ao *powermeter*, com a finalidade de medir qual a densidade de potência ótica ( $W/cm^2$ ) emitida por cada placa. Recorrendo-se ao *setup* ilustrado na figura 52, constituído por um *powermeter* (Newport, Modelo 1918-R) para a realização das medições, o Arduino Mega 2560 que é utilizado para controlar a placa de iluminação, um fotodetetor (fotodiodo com 1 cm x 1 cm de área ativa) que capta o sinal e pela placa de iluminação que vai ser testada. Com vista à obtenção dos melhores resultados possíveis, as zonas da placa de iluminação e do fotodetetor foram isoladas do ambiente exterior com um pano preto, para evitar que a luz que rodeia o sistema tivesse interferência nas medições.

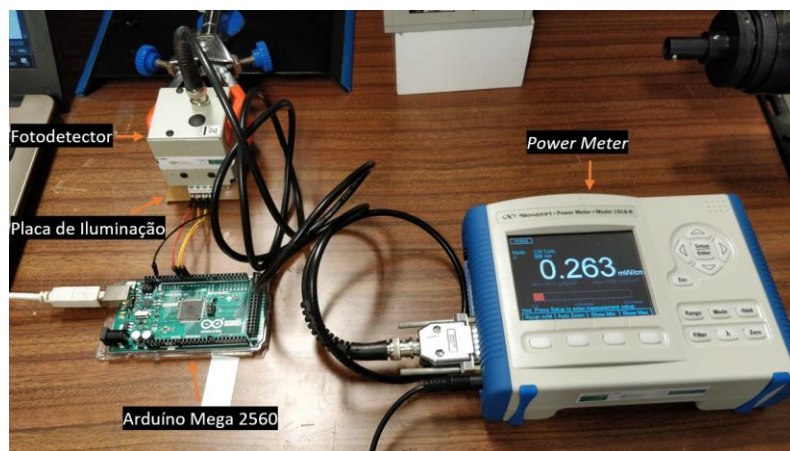


Figura 52 - Fotografia do *setup* experimental utilizado para a medição da densidade de potência ótica ( $W/cm^2$ ).

## 4. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos durante a realização deste trabalho e é feita também a discussão dos mesmos.

### 4.1 Caracterização Experimental das Placas de Emissão Ótica

Numa primeira fase, caracterizaram-se óticamente as várias placas de emissão desenvolvidas, quer em termos de espectro de emissão, quer de potência ótica emitida. Assim, nesta secção são apresentados os resultados obtidos nas medições óticas realizadas com as placas de iluminação.

#### 4.1.1 Caracterização Experimental da Placa de Emissão de Luz 1

Após a montagem do *setup* experimental, a Placa de Emissão 1 foi caracterizada experimentalmente. A figura 53 a) apresenta as curvas obtidas para o espectro de emissão de cada um dos LEDs, nomeadamente para os LEDs de 405 nm e 800 nm atuados com um *duty cycle* de 99%, e com os LEDs visíveis atuados com um *duty cycle* de 50%. Apesar de os três tipos de LEDs apresentarem picos de emissão nas regiões esperadas (próximo dos 400 nm, 800 nm e entre os 450 nm e os 700 nm), os valores de intensidade da luz emitida (obtidos em *Counts*, contagens no ADC interno do espectrofotómetro) variam muito entre os três tipos de LEDs. Em particular, para o LED de 800 nm, a intensidade é muito reduzida, chegando por vezes o espectro de emissão a misturar-se com ruído que entra no sistema. Por sua vez, os LEDs na gama visível apresentam boa intensidade luminosa, mesmo quando atuados a um *duty cycle* inferior. A figura 53 b) apresenta o espectro de emissão da Placa de Emissão 1, quando os três tipos de LEDs são atuados em simultâneo, nomeadamente os LEDs de 405 nm e de 800 nm a 99% e os LEDs visíveis a 1% de *duty cycle*.

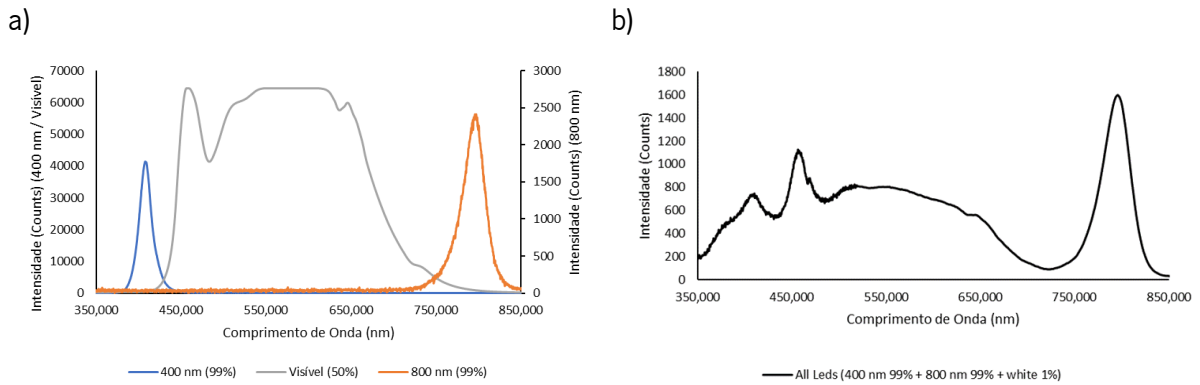


Figura 53 -a) Espectro de emissão da Placa de Emissão 1, em que os LEDs de 405 nm, e de 800 nm se encontram atuados com um *duty cycle* de 99%, e os LEDs visíveis são atuados a 50%. b) Espectro de emissão de toda a placa de iluminação 1, com os LEDs da zona do visível a serem atuados com 1% de *duty cycle*, os LEDs de 405 nm atuados com 99% de *duty cycle* e os LEDs de 800 nm atuados com 99% de *duty cycle*.

Após as medições realizadas no espectrofotômetro, foi medida a densidade ótica de cada tipo de LEDs da Placa de Emissão 1, em separado e de forma conjunta. Na figura 54, no traçado preto, é possível observar os resultados obtidos para a densidade ótica dos LEDs de 405nm, variando os valores entre 0,0427 e 0,1237 mW/cm<sup>2</sup>, sendo que os valores aumentam linearmente com o aumento do *duty cycle*. Na figura 54 (linha cinzenta) encontra-se o gráfico das medições de densidade ótica realizadas com os LEDs da zona do visível, variando os valores entre 0,0283 mW/cm<sup>2</sup> e 4,5263 mW/cm<sup>2</sup>, também de uma forma linear. Na figura 54 (tracejado a laranja) encontram-se os resultados obtidos para as medições dos LEDs de 800 nm, também eles lineares, variando os valores entre 0,0177 e 0,1517 mW/cm<sup>2</sup>. Analisando os dados dos gráficos, é possível concluir que a potência emitida pelos LEDs da zona do visível é muito maior do que a potência emitida pelos restantes LEDs, pelo que, quando foi testada a potência emitida pelo conjunto dos LEDs da placa, variou-se apenas o *duty cycle* dos LEDs na região visível, e os LEDs de 405 e de 800 nm mantiveram-se atuados com o *duty cycle* máximo, a 99% (como apresentado na figura 54 (linha amarela)). Nos gráficos os valores de densidade ótica foram obtidos pela média de 3 medições.



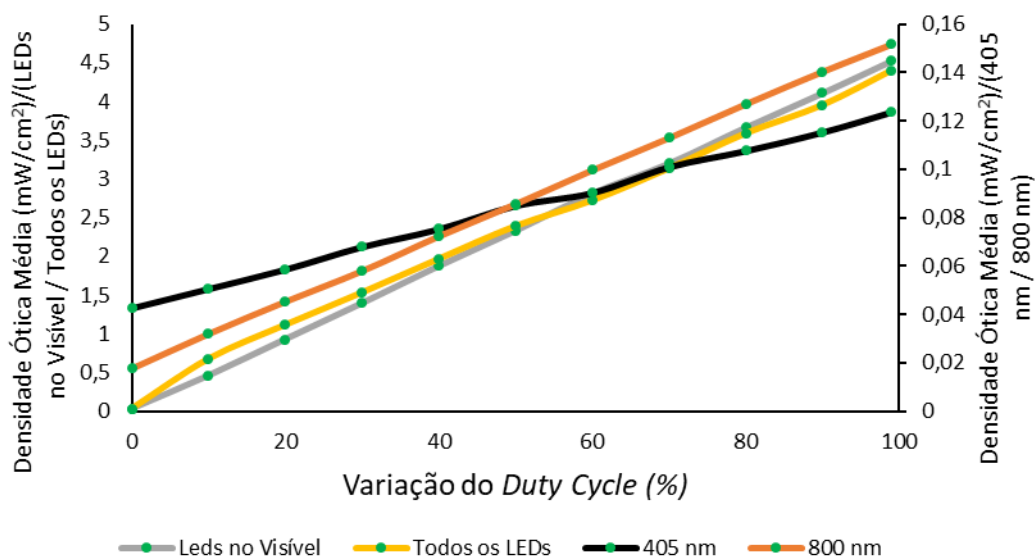


Figura 54 – Curva dos valores médios de densidade ótica ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) medidos no *powermeter*, para os diferentes LEDs da Placa de Emissão 1.

Analisando os resultados obtidos nos testes realizados, quer na análise do espectro de emissão quer na densidade ótica, pode-se concluir que, apesar de todos os LEDs apresentarem o comportamento linear esperado, existe uma elevada diferença entre os valores obtidos nos LEDs de 405 nm e de 800 nm, comparando com os LEDs da zona do visível, sendo necessário realizar ajustes para obter uma maior uniformidade entre os resultados obtidos. A grande disparidade na intensidade luminosa levou à necessidade de desenvolvimento das placas de emissão 2 e 3, descritas no capítulo 3.

#### 4.1.2 Caracterização Experimental da Placa de Emissão de Luz 2

Realizadas as melhorias necessárias para resolver os problemas que a Placa de Emissão 1 apresentava, nomeadamente o baixo espectro de emissão e de densidade ótica na zona dos 400 e 800 nm comparada com a zona do visível, testou-se a nova versão da placa de emissão no espectrofotómetro e no *powermeter*. Na figura 55 a) encontra-se o espectro de emissão de cada um dos LEDs atuados individualmente, estando todos eles atuados com um *duty cycle* de 99%. Em comparação com os resultados obtidos para a Placa de Emissão 1, conclui-se que o défice de emissão nas zonas de 400 e 800 nm encontra-se resolvido, porém, a zona do visível apresenta valores de intensidade demasiado baixos, que não são os ideais (cerca de 1600 counts, ou contagens no ADC interno do espectrofotómetro) para a finalidade pretendida. Apesar dos picos de emissão estarem nos valores pretendidos, continua a existir uma elevada discrepância entre os valores de intensidade dos LEDs de 400 e 810 nm comparando

com os LEDs na zona do visível, sendo nesta versão o valor de intensidade dos LEDs da zona do visível muito menor comparando com os LEDs de 400 e 810 nm. Analisado o espectro de emissão de todos os LEDs em separado, a Placa de Emissão 2 foi testada com os LEDs atuados em simultâneo para verificar se era possível existir alguma zona (algum valor de *duty cycle*) em que o espectro da placa de iluminação fosse homogêneo e que tivesse uma boa intensidade de luz emitida. Contudo, os resultados obtidos não foram os mais favoráveis, existindo um défice de intensidade na zona do visível, como é possível observar na figura 55 b), comparando com os LEDs de 400 e 810 nm. Desta forma, o único ponto onde foi possível obter um sinal homogêneo foi com um *duty cycle* mínimo nos LEDs de 400 e 810 nm, o que não é suficiente para obter uma boa intensidade de emissão, e com o *duty cycle* máximo nos LEDs da zona do visível, pelo que foi necessário desenvolver uma versão com novos ajustes na placa de emissão de modo a obter uma melhor resposta.

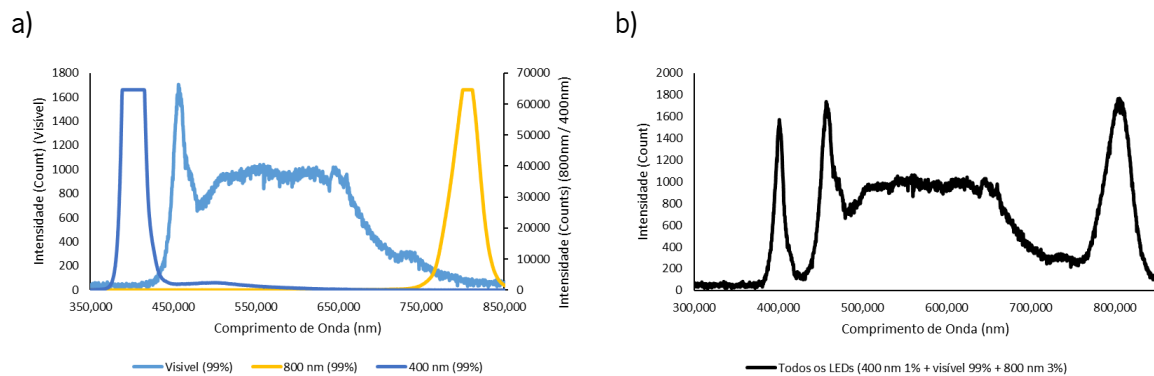


Figura 55 – a) Espectro de emissão da Placa de Emissão 2, em que os LEDs de 400 nm, de 810 nm e os LEDs visíveis se encontram atuados com um *duty cycle* de 99%. b) Espectro de emissão de toda a placa de iluminação 2, com os LEDs da zona do visível a serem atuados com 99% de *duty cycle*, os LEDs de 400 nm atuados com 1% de *duty cycle* e os LEDs de 810 nm atuados com 3% de *duty cycle*.

Como sucedido na Placa de Emissão 1, após a medição do espectro de emissão no espectrofotómetro foi medida a densidade ótica para Placa de Emissão 2 dimensionada. Na figura 56 é possível observar os resultados obtidos através das medições efetuadas. Começando pela figura 56 (traçado a preto) onde se encontra a densidade ótica dos LEDs de 400 nm, verifica-se que existe uma variação linear entre os 0,04 e os 8,99 mW/cm<sup>2</sup>. Na figura 56 (linha vermelha) encontram-se apresentados os resultados dos testes feitos para os LEDs da zona do visível, com os valores obtidos a variarem entre os 0,01 mW/cm<sup>2</sup> e os 4,98 mW/cm<sup>2</sup>, variando estes também de forma linear. Na figura 56 (linha amarela) encontram-se os resultados das medições aos LEDs com o pico do comprimento de onda nos 810 nm, desde que se encontram desligados até ao máximo de emissão que é possível obter,

sendo que os valores variam entre 0,002 e 1,46 mW/cm<sup>2</sup>. Na última medição realizada foi medida densidade ótica de todos os LEDs ligados ao mesmo tempo, variando o *duty cycle* de 0 a 99% em todos os LEDs. Na figura 56 (linha azul) estão representados os resultados obtidos para este último caso, existindo uma variação de 0,025 mW/cm<sup>2</sup>, com os LEDs desligados, até 7,76 mW/cm<sup>2</sup> com os LEDs a emitirem a máxima luz possível.

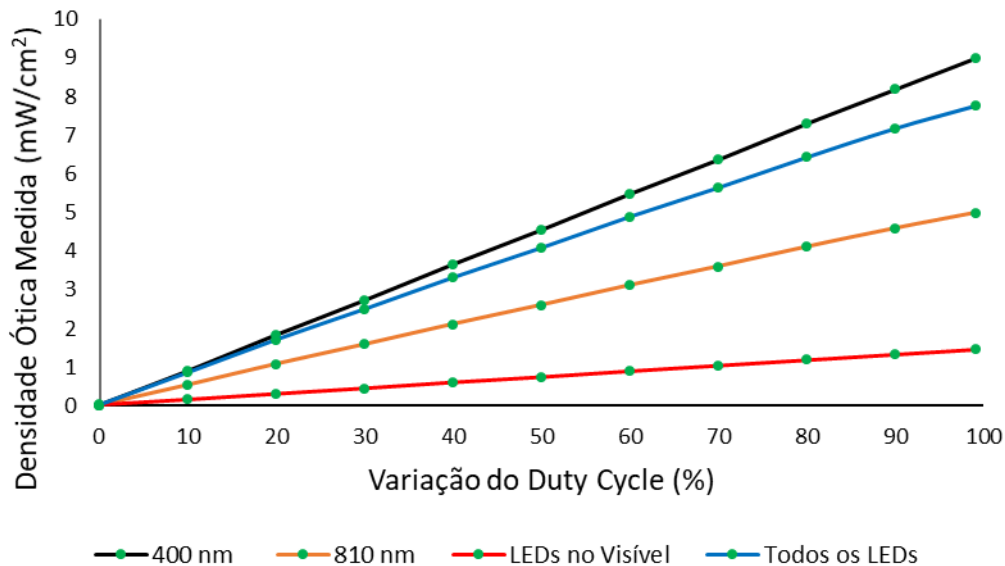


Figura 56 – Curva dos valores médios de densidade ótica (mW/cm<sup>2</sup>) medidos no *powermeter*, para os diferentes LEDs da Placa de Emissão 2.

Comparando os resultados obtidos nesta Placa de Emissão 2, com as medições efetuadas na versão anterior, pode-se concluir que existe uma maior potência emitida nos LEDs de 400 nm e 810 nm, isto porque o número de LEDs é maior e encontram-se mais próximo uns dos outros comparando com a Placa de Emissão 1. Por sua vez, os LEDs da zona do visível sofreram um decréscimo maior do que o esperado, sendo necessário novos ajustes para que a emissão seja mais homogênea. Esta discrepância levou à necessidade do desenvolvimento da Placa de Emissão 3, previamente descrita no capítulo 3.

#### 4.1.3 Caracterização Experimental da Placa de Emissão de Luz 3

Uma vez soldados os componentes da Placa de Emissão 3, passou-se à sua análise e teste em espectrofotômetro. Assim, começou-se por analisar os picos de emissão de cada LED, estando os mesmos situados nas zonas pretendidas, como espectável. Na figura 57 a) são apresentados os espectros de emissão para cada um dos LEDs individualmente (LEDs 400 nm, LEDs da zona do visível e LEDs de 810 nm) e, como se pode observar nas curvas obtidas, todos eles têm uma boa intensidade para 90% de *duty cycle* chegando aos 65000 *Counts* (contagens de intensidade no ADC interno do espectrofotômetro) e saturando o fotodíodo do espectrofotômetro. Na figura 57 b) encontra-se o espectro de emissão da Placa de Emissão 3 com todos os LEDs ligados em simultâneo. Nesta medição foi utilizado um *duty cycle* de 30% para os LEDs de 810 nm, 21% para os LEDs da zona do visível e 15% para os LEDs de 400 nm. Observa-se que nesta versão, mesmo com um *duty cycle* relativamente baixo, foi possível encontrar um ponto de equilíbrio no espectro de emissão e com uma intensidade de emissão elevada, o que deixa espaço para o aumento da intensidade mantendo o equilíbrio entre os LEDs, não existindo grandes diferenças na intensidade emitida. Mesmo nas regiões de baixa emissão ótica (cerca de 425 nm e entre os 700 e os 770 nm), a intensidade apresenta ainda um total de contagens no ADC acima dos 5000 *counts* em todos os ensaios.

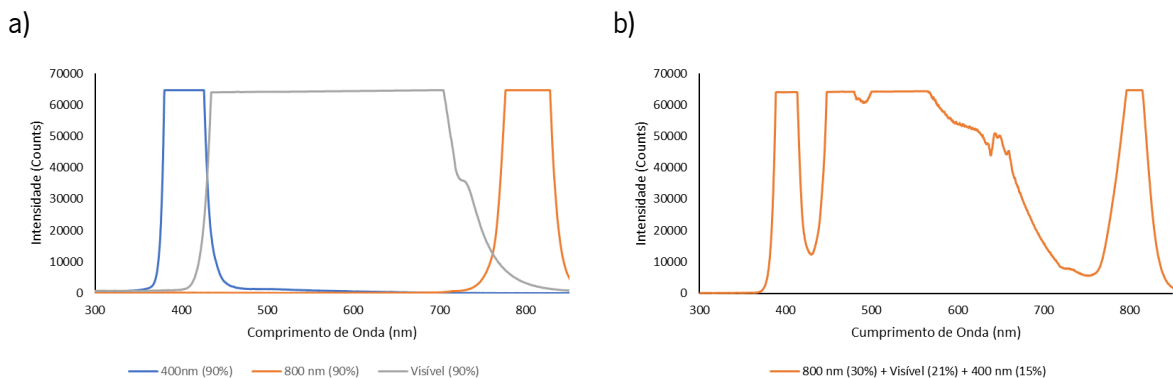


Figura 57 - a) Espectro de emissão da Placa de Emissão 3, em que os LEDs de 400 nm, de 810 nm e os LEDs visíveis se encontram atuados com um *duty cycle* de 90%. b) Espectro de emissão de toda a placa de iluminação 3, com os LEDs da zona do visível a serem atuados com 21% de *duty cycle*, os LEDs de 400 nm atuados com 15% de *duty cycle* e os LEDs de 810 nm atuados com 30% de *duty cycle*.

Realizadas as medições no espectrofotômetro, foi medida a densidade ótica de cada tipo de LEDs da Placa de Emissão 3, em separado e de forma conjunta. Na figura 58 (traçado a preto) encontram-se os resultados obtidos para a densidade ótica dos LEDs de 400 nm, variando os valores entre 0,000183 e 5,98 mW/cm<sup>2</sup> de uma forma quase linear, existindo apenas uma quebra quando os LEDs passam de 50% de *duty cycle* para 60% (podendo dever-se a alguma perturbação ótica no ambiente no decorrer das medições). Na figura 58 (linha a vermelho) encontra-se a densidade ótica emitida pelos LEDs da zona do visível em mW/cm<sup>2</sup>, variando esta até um valor máximo de 1,92 mW/cm<sup>2</sup> quando os LEDs se encontram atuados com 99% de *duty cycle*. Tal como para os LEDs anteriores, a variação da densidade ótica acontece de forma linear até aos 70% de *duty cycle* existindo entre os 70 e 80% um aumento elevado que retira a linearidade ao traçado. Após os 80% a variação continua de forma linear. Na figura 58 (linha laranja) está representada a variação da densidade ótica dos LEDs de 810 nm, variando a mesma de 0,00016 até 2,76 mW/cm<sup>2</sup>. A variação tal como nos LEDs de 400 nm ocorre de forma linear exceto quando o *duty cycle* varia de 50 para 60%. Na figura 58 (traçado azul) está representada a densidade ótica para quando todos os LEDs se encontram atuados com o mesmo *duty cycle*, variando a densidade ótica de 0,00015 até 9,23 mW/cm<sup>2</sup>, acontecendo esta variação de forma linear.

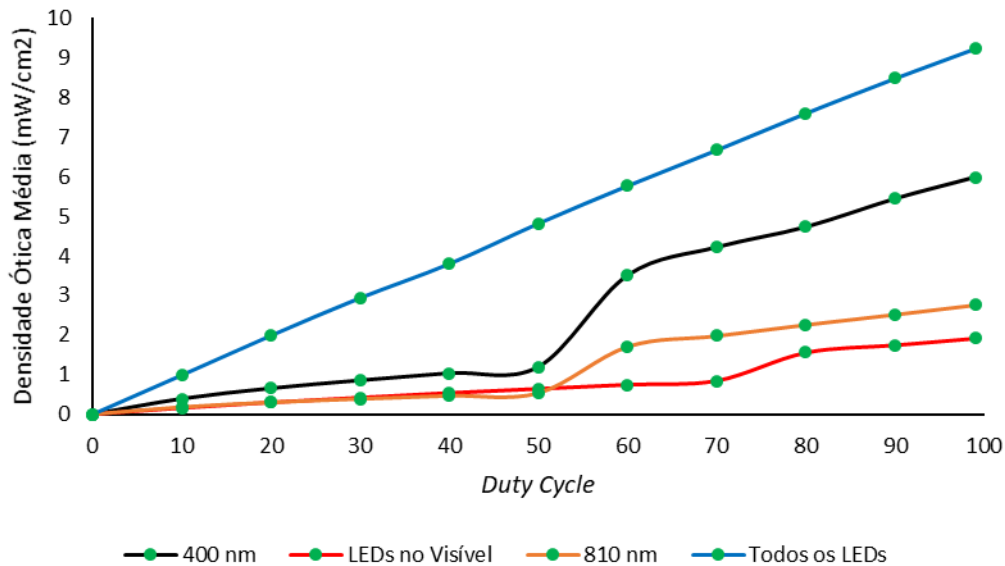


Figura 58 - Curva dos valores médios de densidade ótica (mW/cm<sup>2</sup>) medidos no *powermeter*, para os diferentes LEDs da Placa de Emissão 3.

Comparando os resultados das medições realizadas com a Placa de Emissão 3, com as duas placas de emissão anteriores, conclui-se que os resultados são melhores isto porque, na Placa de Emissão 3 é possível encontrar um espectro de emissão mais homogêneo (apesar de ainda existirem duas regiões do espectro com menor intensidade de emissão que as restantes), com uma boa intensidade de luz emitida e com valores de *duty cycle* semelhantes entre os vários LEDs. Assim, esta placa será considerada para os testes finais do dispositivo, descritos na secção 4.2 e 4.3.

## **4.2 Caracterização Experimental do Sistema em Absorbância Ótica**

Após o desenvolvimento de todos os componentes do sistema, incluindo a placa de emissão, placa de aquisição e tratamento de sinal para o sistema e o seu isolamento ótico do ambiente exterior, passou-se à caracterização da placa de aquisição e tratamento de sinal do sistema numa configuração de absorbância ótica. Para isso, o sistema desenvolvido garante o alinhamento entre as fontes de luz (LEDs) e os fotodíodos, com uma região entre elas, para posicionamento das amostras a medir. Nos testes da placa experimental do sistema consideraram-se como amostras cuvetes de 1 cm de caminho ótico com soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sintéticas, da Invivogen, diluídas em água em diferentes concentrações (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) (como representado na figura 59, e onde se observam as diferentes tonalidades das amostras). É importante notar que estas amostras apenas têm em conta a variação da concentração de hemozoína (ou seja, do cristal produzido pelo parasita), não tendo sido testado o efeito do sangue e dos parasitas nestas medições. Outros trabalhos têm em conta as amostras de sangue (como por exemplos os espectros apresentados na figura 7). No entanto, como se sabe que a infeção da malária afeta a quantidade de hemozoína produzida, espera-se que, se o sistema for capaz de detetar as diferentes concentrações da hemozoína diluída, apresente potencial para distinção da hemozoína também em amostras reais.

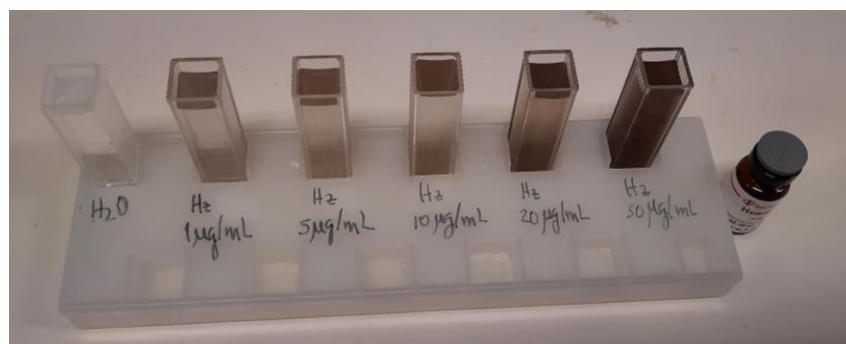


Figura 59 – Fotografia das amostras de hemozoína sintéticas usadas para a realização dos testes na caracterização experimental do sistema (com concentrações entre 0 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), em cuvetes de 1 cm de caminho ótico, para os testes nas montagens experimentais para as configurações em absorvância e em reflectância ótica.

De forma a selecionar a luz dos comprimentos de onda de interesse, para ser possível reconstruir o espectro das amostras na gama 400 a 800 nm, foram utilizados filtros óticos, baseados em filmes finos de óxido de magnésio, dióxido de silício e dióxido de titânio, nos comprimentos de onda de 397, 419, 516, 585, 603, 649, 701 e 746 nm. Neste caso, utilizaram-se apenas 8 comprimentos de onda e não os 16 esperados, devido à disponibilidade dos filtros no laboratório. Na figura 60 encontram-se fotografias dos filtros utilizados para fazer os testes [20].

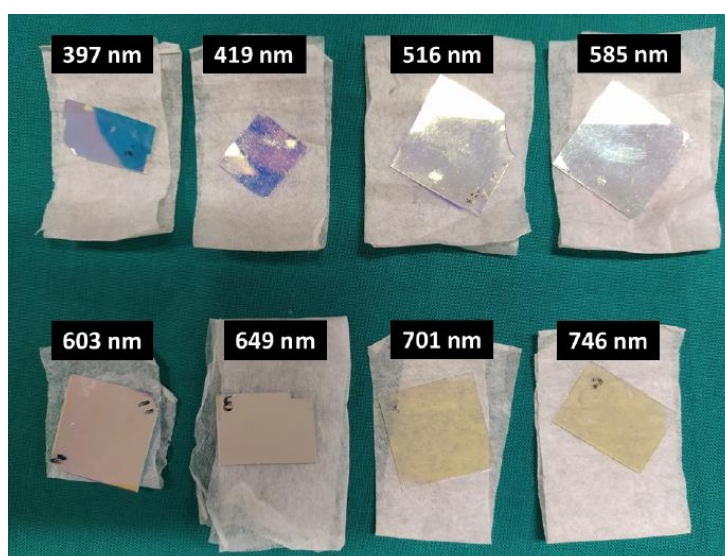


Figura 60 – Fotografia dos 8 filtros (para os comprimentos de onda de 397 nm, 419 nm, 516 nm, 585 nm, 603 nm, 649 nm, 701 nm e 746 nm), utilizados na caracterização experimental do sistema em absorvância e reflectância ótica, partilhado de [20], com autorização da MDPI através de uma licença *Creative Commons CC BY*.

Na figura 61, encontra-se representada a transmitância de cada um dos filtros utilizados para os testes da caracterização experimental do sistema nas configurações de absorvância ótica e de reflectância ótica.

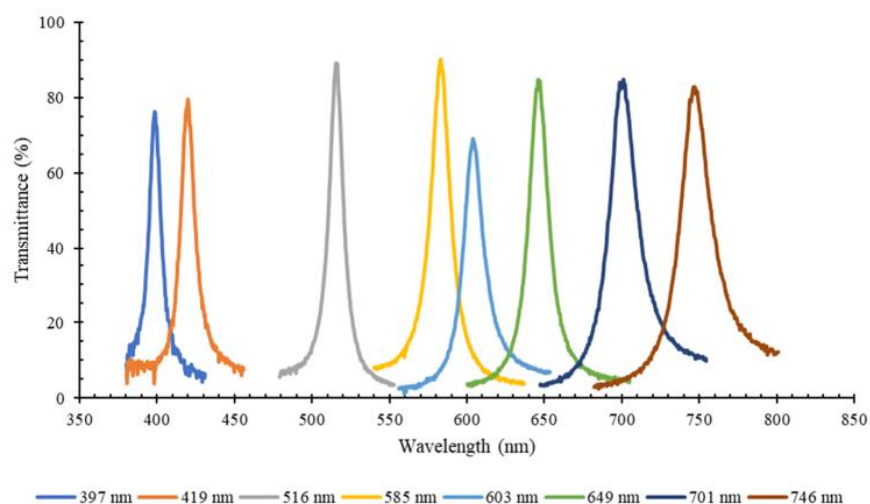


Figura 61 - Transmittância dos 8 filtros, baseados em filmes finos, utilizados nas caracterizações experimentais do sistema, partilhado de [20], com autorização da MDPI através de uma licença *Creative Commons CC BY*.

É importante referir que, na realização das medições para este protótipo, e como o número de fotodíodos é limitado (2 fotodíodos, em vez dos 8), as medições foram realizadas sequencialmente, tendo sido necessário trocar os filtros manualmente entre medições, em função dos comprimentos de onda de interesse. Adicionalmente, antes de iniciar as medições com as amostras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi feita uma medição no vazio (amostra de água), que foi considerada a medida de referência a partir do qual se calculou a transmittância das amostras (tal como descrito no capítulo 2.3).

Na tabela 3, encontram-se as tensões de saída do amplificador *lock-in* a partir das quais foram calculados os valores de absorbância apresentados nas figuras 62 e 63.

Tabela 3 – Tensões de saída do amplificador *lock-in*, nas quais se basearam os cálculos da absorbância ótica.

Comprimento de Onda do Filtro(nm)	Tensão de Saída do Sistema (V)								
	Sem Filtro	397	419	516	585	603	649	701	746
Concentração (µg/ml)									
Água	5,125	3,35	2,15	3,9	3,3	3,9	2,85	2,8	2,35
1	3,95	2,25	1,8	2,85	2,4	2,9	2,05	1,85	1,7
5	3,75	2,15	1,7	2,75	2,25	2,75	1,8	1,8	1,65
10	3,575	2,05	1,525	2,45	2,15	2,5	1,5	1,725	1,375
20	2	1,5	1,05	1,55	1,3	1,7	0,95	0,925	0,675
50	1,175	0,7	0,525	0,8	0,5	0,8	0,35	0,45	0,425

Os primeiros valores de absorbância calculados foram para as medidas realizadas sem filtros, ou seja, sem ter em conta os 8 comprimentos de onda de interesse, e pretendiam provar que, considerando o espectro total entre os 400 e os 800 nm, a saída do sistema variava com a variação da concentração da amostra. Assim, uma maior concentração na amostra (maior quantidade de hemozóina)



implica uma menor transmitância (e conseqüente maior absorbância). Na figura 62, encontram-se representados os resultados obtidos nestas medições, sendo que, pela análise do gráfico obtido se confirma que, como pretendido e esperado, a transmitância total do sistema diminuiu com o aumento da concentração de hemozoina da amostra.

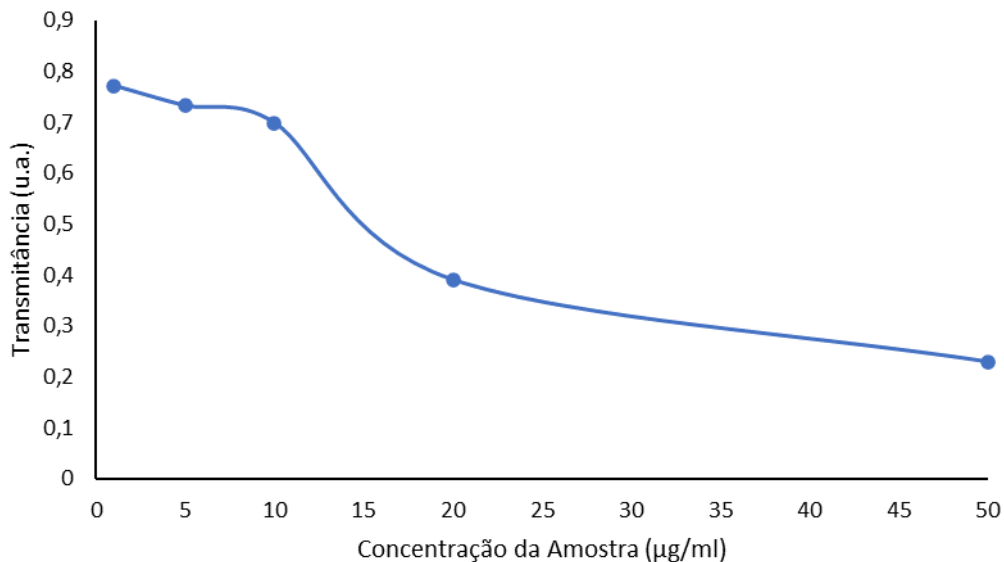


Figura 62 – Medição da transmitância (u.a.) total da amostra em função da concentração de hemozoina, entre os 400 e os 800 nm do espectro ótico.

O gráfico da figura 63 representa a reconstrução dos espectros de transmitância de cada uma das amostras a partir dos 8 comprimentos de onda considerados. Nestas medições, já foram utilizados os filtros óticos para selecionar os comprimentos de onda pretendidos (397, 419, 516, 585, 603, 649, 701, 746 nm) e, analisando a saída do sistema, a mesma varia como pretendido, ou seja, existe uma diminuição da transmitância com o aumento das concentrações de hemozoina. Desta forma prova-se que o sistema consegue detetar diferentes quantidade de hemozoina, mesmo em quantidades pouco elevadas como 1 µg/mL.

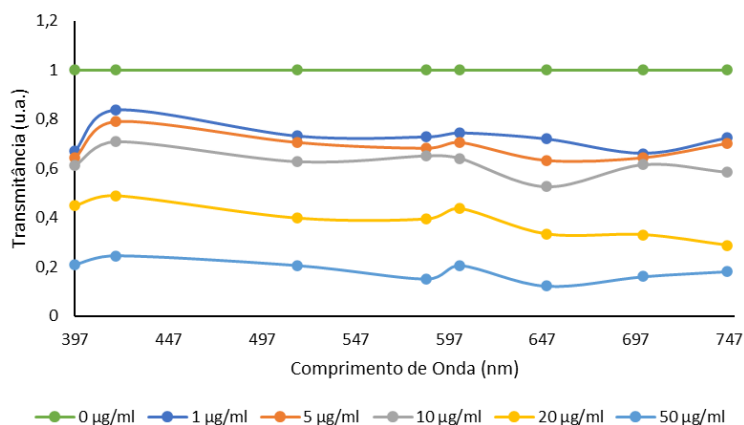


Figura 63 – Transmitância (u.a.) das amostras de hemozoína, em função da concentração, para os 8 comprimentos de onda considerados.

Por fim, na figura 64, observou-se o comportamento do sistema para cada um dos comprimentos de onda (selecionados por cada um dos 8 filtros), com a variação da concentração das amostras de hemozoína, e verificou-se uma diminuição da transmitância com o aumento das concentrações em todos os filtros, sendo este comportamento também o esperado. Estes resultados mostram que o sistema desenvolvido e caracterizado numa configuração de absorvância ótica, é capaz de distinguir a presença de hemozoína diluída numa solução aquosa a partir de uma concentração de 1 µg/mL.

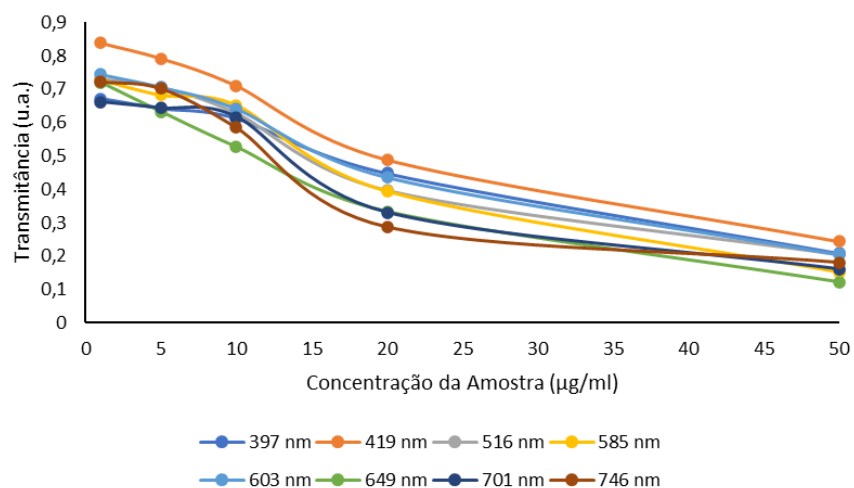


Figura 64 – Variação da transmitância (u.a.) das amostras de hemozoína, em função da concentração, para cada um dos 8 filtros óticos utilizados.

Após a análise dos gráficos, foi também calculada a sensibilidade, tendo o sistema uma sensibilidade de 0,275 V/µg para o intervalo de concentrações de 1 µg/ml até 5 µg/ml. Entre as

concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ , o sistema apresenta uma sensibilidade de 0,035 V/ $\mu\text{g}$ . Entre 10  $\mu\text{g/ml}$  e 20  $\mu\text{g/ml}$ , a sensibilidade é de 0,1575 V/ $\mu\text{g}$ . Por último, a sensibilidade entre 20 e 50  $\mu\text{g/ml}$  é de 0,0275 V/ $\mu\text{g}$ .

### 4.3 Caracterização Experimental do Sistema em Reflectância Ótica

Tal como na caracterização experimental do sistema em absorvância ótica, também o sistema experimental do sistema numa configuração para reflectância ótica foi caracterizado com amostras de hemozoína sintética similares às utilizadas nos ensaios de absorvância ótica e com o mesmo valor de concentrações. Da mesma forma, para selecionar a luz dos comprimentos de onda de interesse, foram utilizados os mesmos 8 filtros óticos disponíveis no laboratório, com comprimentos de onda em 397, 419, 516, 585, 603, 649, 701, 746 nm. Uma vez que os dados de reflectância têm uma menor intensidade, comparando com os de absorvância, foi necessário aumentar o ganho do circuito de transimpedância, de 22000 para  $1 \times 10^6$ . Usando o esquemático da figura 20, passou então a ter-se uma resistência ( $R$ ) de 1 M $\Omega$ , sendo que o condensador ( $C$ ) se manteve o mesmo, garantindo assim uma amplificação suficiente para obter informação sobre a luz refletida.

Para as medições de reflectância, começou por medir-se a reflectância total do sistema usando como referência uma amostra de sulfato de bário, uma vez que este material apresenta uma reflectância de luz quase total, acima de 99%.

De igual forma aos resultados apresentados para o teste do sistema em absorvância ótica, também nos testes em reflectância ótica o primeiro passo foi criar uma tabela com os valores de tensão obtidos na saída do amplificador *lock-in* para cada uma das medições, tabela esta representada na tabela 4. A partir dos resultados apresentados foi calculado o espectro de reflectância das amostras.

Tabela 4 - Tensões de saída do amplificador *lock-in*, nas quais se basearam os cálculos da reflectância ótica.

Comprimento de Onda do Filtro (nm)	Tensão de Saída do Sistema (V)								
	Sem Filtro	397	419	516	585	603	649	701	746
Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )									
Sulfato de Bário	4,1	3,15	2,1	2,65	2,15	2,5	2,05	2,1	2,05
1	0,95	0,975	0,875	1	0,625	0,95	0,825	0,775	0,95
5	0,9	1,125	0,975	1	1,125	0,9	0,875	0,825	0,5
10	0,75	0,875	0,775	0,7	0,475	0,775	0,725	0,625	0,6
20	0,675	0,95	0,725	0,775	0,875	0,725	0,95	0,55	0,9
50	0,65	0,925	0,875	0,875	0,725	0,875	0,6	0,825	0,575

De igual forma ao procedido para o teste experimental do sistema em configuração de absorvância ótica, também o primeiro teste experimental realizado para a caracterização do sistema de reflectância

ótica foi verificar se a saída do sistema variava em função da concentração de hemozoína na amostra. Desta forma, uma maior concentração de hemozoína na amostra provocará uma menor reflectância da luz, como se pode observar no gráfico presente na figura 65. Esta diminuição vem de encontro ao observado no espectro contínuo dos parasitas da malária, anteriormente apresentado na figura 7. Assim, prova-se que o sistema eletrônico de emissão e detecção de sinais de reflectância, na ausência dos filtros óticos, é capaz de medir corretamente a intensidade da luz total refletida.

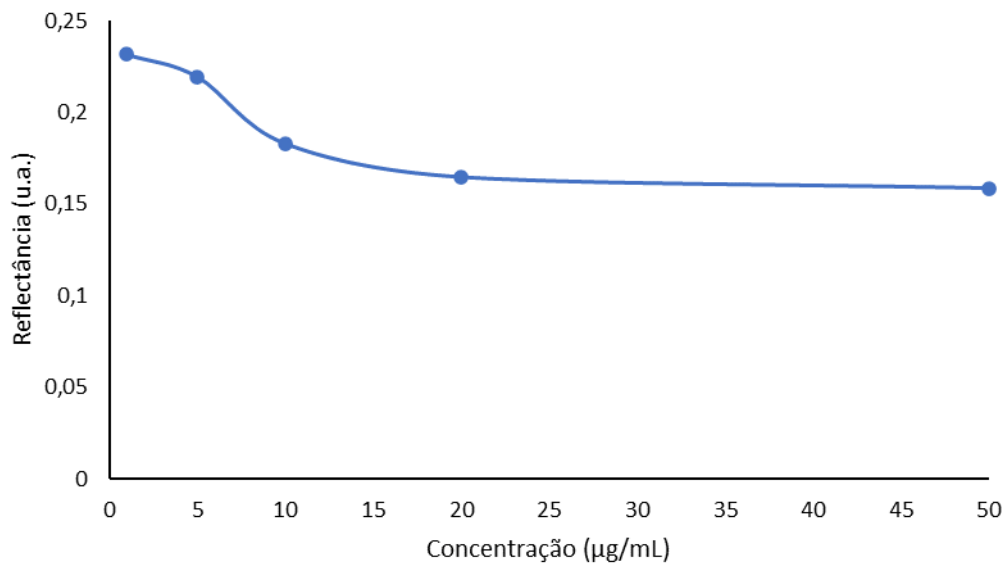


Figura 65 - Medição da reflectância (u.a.) total da amostra em função da concentração de hemozoína, entre os 400 e os 800 nm do espectro ótico.

Contudo, na figura 66 encontra-se o espectro de reflectância construído através dos 8 comprimentos de onda selecionados (397, 419, 516, 585, 603, 649, 701, 746 nm), tendo sido utilizados os mesmos filtros óticos usados na caracterização experimental do sistema em absorvância ótica. Como se observa, neste gráfico apresentam-se apenas os espectros de reflectância para as concentrações de hemozoína de 1 µg/ml e 10 µg/ml. Para estas concentrações mais reduzidas, em que a reflectância ótica é superior, observa-se que o aumento da concentração leva à diminuição da reflectância, o que vem de encontro ao apresentado anteriormente na figura 65.

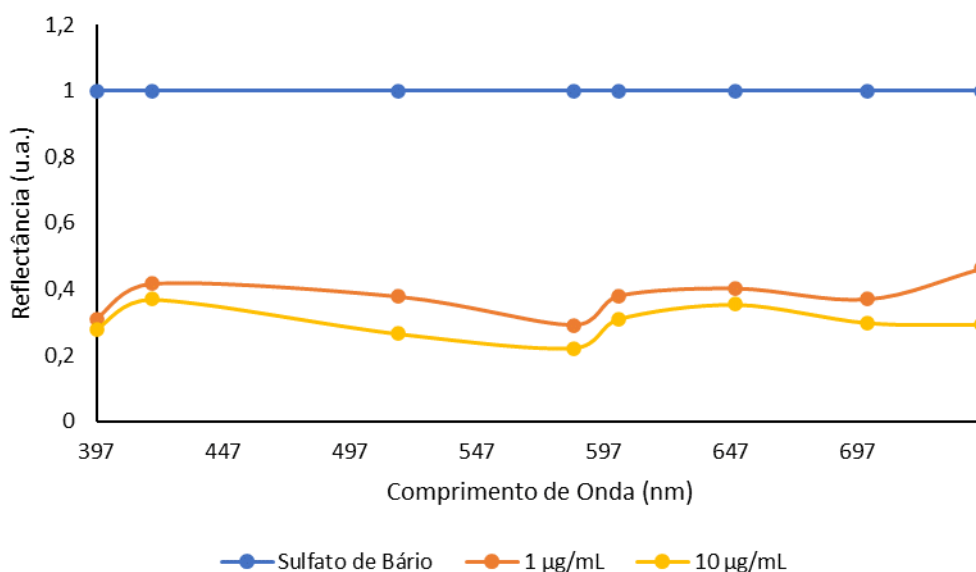


Figura 66 – Espectro de reflectância das amostras de hemozoína sintética com concentrações de 1 µg/ml e 10 µg/ml.

Na presença dos filtros óticos, os resultados obtidos para as restantes concentrações não foram os melhores (existindo oscilações não esperadas em diversas concentrações) e, assim, não foi possível distinguir através de reflectância diferentes quantidades de hemozoína em diversas amostras, sendo que o sistema não varia como pretendido, não existe uma diminuição consistente da reflectância com o aumento das concentrações da amostra de hemozoína. Estes resultados para cada uma das concentrações não foram adequados porque os filtros óticos têm, também eles, uma reflectância muito elevada e, por isso, estão a perturbar as medições das amostras de concentração mais elevada (ou seja, que teriam uma reflectância inferior em cada comprimento de onda). Isto faz com que para as concentrações mais altas tenha sido impossível a distinção das diferentes concentrações de hemozoína em cada comprimento de onda. Como solução, o processo de fabrico dos filtros devia ser melhorado através da deposição controlada de filmes finos anti reflexão nas superfícies destes filtros óticos multicamada. Nas medições para a caracterização do sistema em absorbância não existiu este problema uma vez que os filtros transmitem adequadamente a luz, porém refletem luz em comprimentos de onda não desejados.

Foi também calculada a sensibilidade do sistema para medições de reflectância, obtendo-se uma sensibilidade de 0,064 V/µg entre as concentrações de 1 µg/ml e 5 µg/ml. Entre as concentrações de 5 e 10 µg/ml a sensibilidade do sistema é de 0,03 V/µg. Para as concentrações entre 10 µg/ml e 50 µg/ml a sensibilidade é de 0,0025 V/µg.

## 5. CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Este capítulo apresenta as principais conclusões do trabalho desenvolvido, assim como algumas propostas de trabalho futuro para ultrapassar os problemas encontrados no decorrer deste trabalho.

### 5.1 Conclusões

Nesta dissertação foi proposta a realização de um sistema miniaturizado para a detecção de hemozoina por reflectância ótica, com potencial para ser utilizado em diagnóstico de malária. Para a obtenção do resultado final, foi necessário desenvolver uma fonte de emissão de luz capaz de cobrir o espectro ótico entre os 400 e os 800 nm, assim como um sistema de captação e tratamento de sinal.

No que concerne às placas de emissão baseadas em LEDs atuados por PWM, foram desenvolvidas três placas diferentes, chegando a uma placa de emissão otimizada (Placa de Emissão 3), com um espectro de emissão razoável em toda a gama pretendida (dos 400 aos 800 nm), existindo apenas duas pequenas zonas do espectro com menor intensidade ótica emitida (cerca de 425 nm e entre os 700 e os 770 nm). Adicionalmente, a Placa de Emissão 3, com os três tipos de LEDs atuados em simultâneo, apresenta um consumo de potência máximo de 468 mW, provando que o sistema funciona com baixo consumo, sendo adequada a um sistema portátil.

Em relação ao sistema de detecção, este baseou-se em fotodíodos que apresentaram boa linearidade na resposta a diferentes valores de *duty cycle* durante a atuação dos LEDs. Em relação ao sistema de amplificação e condicionamento de sinal, quer as simulações realizadas, quer os testes práticos, mostraram o correto funcionamento do amplificador *lock-in* dimensionado, sendo o mesmo capaz de recuperar uma onda, através de uma onda de referência e de um conjunto de filtros de segunda ordem.

Após o desenvolvimento e encapsulamento dos sistemas de emissão e detecção, estes foram caracterizados experimentalmente através de medições de absorbância e reflectância ótica, com amostras de hemozoina de diferentes concentrações, reconstruindo os seus espectros a partir de apenas 8 comprimentos de onda. A caracterização experimental do sistema em absorbância ótica apresentou resultados positivos, sendo possível a identificação de várias quantidades de hemozoina, distinguindo-as de amostras sem hemozoina, mesmo com concentrações baixas (com um limite de detecção de 1 µg/ml). A caracterização experimental do sistema em reflectância ótica mostrou, nos seus resultados, que o sistema é capaz de distinguir entre várias concentrações de hemozoina na ausência dos filtros óticos

(com um limite de detecção de 1 µg/ml), ou seja, considerando a reflectância total da luz. Porém, não foi possível reconstruir o espectro de reflectância nos 8 comprimentos de onda selecionados devido à elevada reflectância dos filtros óticos utilizados (e que se encontravam disponíveis no laboratório), o que provocou perturbações nas medições, impossibilitando assim a devida reconstrução dos espectros para todas as concentrações.

No entanto, os resultados obtidos mostram que o sistema desenvolvido foi capaz de medir com elevada precisão os sinais, quer de absorbância quer de reflectância, de um modo rápido, portátil e de baixo consumo, apresentando elevado potencial para a sua possível integração num dispositivo *point-of-care* para diagnóstico de malária, cumprindo os objetivos propostos nesta dissertação.

O trabalho desenvolvido, nomeadamente o desenvolvimento das placas de emissão levou à contribuição científica como co-autor num artigo em revista internacional: M Costa, V Baptista, G Ferreira, D Lima, G Minas, MI Veiga, SO Catarino, *Multilayer thin-film optical filters for reflectance-based malaria diagnostics, Micromachines*, 2021, 12(8), 890 (DOI: 10.3390/mi12080890), IF: 2.891.

## 5.2 Trabalhos futuros

No seguimento do trabalho realizado na presente dissertação e para que o sistema possa ser futuramente utilizado para o diagnóstico de malária, existem algumas limitações no presente trabalho que terão de ser ultrapassadas, nomeadamente:

- Uma melhoria na placa de emissão que contém algumas regiões de baixa emissão ótica (nas regiões em torno dos 425 nm e entre os 700 e os 770 nm). Porém, apesar desta limitação, esta apresenta ainda uma intensidade com um total de contagens no ADC acima dos 5000 *counts* em todos os ensaios que se mostraram suficientes para uma precisão nas medições em absorbância.
- O uso de uma matriz de 16 fotodiodos para integração de todos os filtros óticos desenvolvidos, o que irá permitir a medição de todos os comprimentos de onda relevantes em simultâneo, o que é essencial para que o dispositivo seja *point-of-care*, automático e de fácil utilização.
- Miniaturização das placas PCB desenvolvidas, com otimização das suas áreas, permitindo uma redução da área total ocupada e a melhoria do encapsulamento do protótipo.
- Criação de um algoritmo de deteção e calibração automática dos LEDs, com uma *interface friendly user*, para que qualquer pessoa possa usar o sistema, bem como um circuito de alimentação simples, com recurso a baterias, para tornar o sistema portátil.

- Necessidade de uma melhoria no processo de fabrico dos filtros óticos multicamada, com a deposição de filmes finos anti reflexão nas superfícies dos filtros, para eliminar a elevada reflectância que estes apresentam e permitir a medição adequada do sistema de reflectância desenvolvido.
- Testes do sistema com amostras de parasitas reais, em culturas de glóbulos vermelhos para testar a fiabilidade do sistema em sangue real, assim como testes do efeito da pele humana nos espectros obtidos. Estes testes permitirão verificar se o sistema poderá, de facto, ser usado de forma não invasiva, diretamente na pele dos pacientes.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] K. V. Ragavan, S. Kumar, S. Swaraj, and S. Neethirajan, "Advances in biosensors and optical assays for diagnosis and detection of malaria," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 105, no. January, pp. 188–210, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.01.037.
- [2] B. Grondin, B. Hassett, and T. Loomis, "Low Cost Malaria Detection A Major Qualifying Project Report" April, 2017.
- [3] H. Wilgar, "What is malaria? | Facts | yourgenome.org," 2016. <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-malaria> (accessed Mar. 09, 2021).
- [4] World Health Organization, *World Malaria Report*, vol. WHO/HTM/GM, no. December. 2010.
- [5] World Health Organization, *World malaria report 2019*. 2019.
- [6] M. S. Costa, V. Baptista, G. Minas, M. I. Veiga, and S. O. Catarino, "Effect of the materials ' properties in the design of high transmittance and low FWHM SiO<sub>2</sub> / TiO<sub>2</sub> thin film optical filters for integration in a malaria diagnostics device.," *Biodevice 2021*, vol. 1, no. Biostec, pp. 21–31, 2020, doi: 10.5220/0010193900210031.
- [7] Z. Bisoffi, F. Gobbi, and J. Van Den Ende, "Rapid diagnostic tests for malaria," *BMJ*, vol. 348, no. 1, pp. 66–78, 2014, doi: 10.1136/bmj.g3846.
- [8] M. T. Makler, C. J. Palmer, and A. L. Ager, "A review of practical techniques for the diagnosis of malaria," *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, vol. 92, no. 4, pp. 419–433, 1998, doi: 10.1080/00034989859401.
- [9] V. Baptista *et al.*, "The Future in Sensing Technologies for Malaria Surveillance: A Review of Hemozoin-Based Diagnosis," *ACS Sensors*, 2021, doi: 10.1021/acssensors.1c01750.
- [10] W. K. Peng *et al.*, "Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 9, pp. 1069–1073, 2014, doi: 10.1038/nm.3622.
- [11] I. Fescenko *et al.*, "Diamond Magnetic Microscopy of Malarial Hemozoin Nanocrystals," *Phys. Rev. Appl.*, vol. 11, no. 3, p. 1, 2019, doi: 10.1103/PhysRevApplied.11.034029.
- [12] C. Cai *et al.*, "In vivo photoacoustic flow cytometry for early malaria diagnosis," *Cytom. Part A*, vol. 89, no. 6, pp. 531–542, 2016, doi: 10.1002/cyto.a.22854.
- [13] S. E. McBirney, D. Chen, A. Scholtz, H. Ameri, and A. M. Armani, "Rapid Diagnostic for Point-of-Care Malaria Screening," *ACS Sensors*, vol. 3, no. 7, pp. 1264–1270, 2018, doi: 10.1021/acssensors.8b00269.
- [14] S. O. Catarino, P. Felix, P. J. Sousa, V. Pinto, M. I. Veiga, and G. Minas, "Portable Device for

- Optical Quantification of Hemozoin in Diluted Blood Samples,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 67, no. 2, pp. 365–371, 2020, doi: 10.1109/TBME.2019.2913454.
- [15] E. Lukianova-Hleb *et al.*, “Transdermal diagnosis of malaria using vapor nanobubbles,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 21, no. 7, pp. 1122–1127, 2015, doi: 10.3201/eid2107.150089.
- [16] M. Rebelo, R. Grenho, A. Orban, and T. Hänscheid, “Transdermal diagnosis of malaria using vapor nanobubbles,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 22, no. 2, pp. 343–344, 2016, doi: 10.3201/eid2107.150089.
- [17] S. O. Catarino, I. Silva, R. Lima, and G. Minas, “Spectrophotometric characterization of hemozoin as a malaria biomarker,” p. 5, 2017, doi: 10.1117/12.2270995.
- [18] L. Frame, J. Brewer, R. Lee, K. Faulds, and D. Graham, “Development of a label-free Raman imaging technique for differentiation of malaria parasite infected from non-infected tissue,” *Analyst*, vol. 143, no. 1, pp. 157–163, 2018, doi: 10.1039/c7an01760j.
- [19] V. Baptista *et al.*, “Hemozoin: the future in malaria diagnosis,” *MAM 2020 – Mol. Approaches to Malaria*, Lorne, Aust., 2020.
- [20] M. S. Costa *et al.*, “Multilayer thin-film optical filters for reflectance-based malaria diagnostics,” *Micromachines*, vol. 12, no. 8, 2021, doi: 10.3390/mi12080890.
- [21] H. Shim, “2.1.5: Spectrophotometry,” pp. 1–5, 2021.
- [22] I. Grabowska, M. Chudy, A. Dybko, and Z. Brzozka, “Uric acid determination in a miniaturized flow system with dual optical detection,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 130, no. 1, pp. 508–513, 2008, doi: 10.1016/j.snb.2007.09.051.
- [23] I. Grabowska, D. Stadnik, M. Chudy, A. Dybko, and Z. Brzozka, “Architecture and method of fabrication PDMS system for uric acid determination,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 121, no. 2, pp. 445–451, 2007, doi: 10.1016/j.snb.2006.04.101.
- [24] G. Minas, R. F. Wolffenbuttel, and J. H. Correia, “A lab-on-a-chip for spectrophotometric analysis of biological fluids,” *Lab Chip*, vol. 5, no. 11, pp. 1303–1309, 2005, doi: 10.1039/b506817g.
- [25] J. C. Ribeiro, G. Minas, P. Turmezei, R. F. Wolffenbuttel, and J. H. Correia, “A SU-8 fluidic microsystem for biological fluids analysis,” *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 123–124, pp. 77–81, 2005, doi: 10.1016/j.sna.2005.03.032.
- [26] V. Pinto, P. Sousa, S. O. Catarino, M. Correia-Neves, and G. Minas, “Microfluidic immunosensor for rapid and highly-sensitive salivary cortisol quantification,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 90, pp. 308–313, 2017, doi: 10.1016/j.bios.2016.11.067.
- [27] C. C. Lin, J. H. Wang, H. W. Wu, and G. Bin Lee, “Microfluidic Immunoassays,” *JALA - J. Assoc.*

- Lab. Autom.*, vol. 15, no. 3, pp. 253–274, 2010, doi: 10.1016/j.jala.2010.01.013.
- [28] A. Farahani and H. Sereshti, “An integrated microfluidic device for solid-phase extraction and spectrophotometric detection of opium alkaloids in urine samples,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 412, no. 1, pp. 129–138, 2020, doi: 10.1007/s00216-019-02214-1.
- [29] T. D. Stephens, Rod R. Seeley, Philip Tate, “*Anatomia & Fisiologia*” .
- [30] S. Pimenta, G. Minas, and F. Soares, “Spectrophotometric approach for automatic human blood typing,” *2012 IEEE 2nd Port. Meet. Bioeng. ENBENG 2012*, 2012, doi: 10.1109/ENBENG.2012.6331340.
- [31] W. Malomgré and B. Neumeister, “Recent and future trends in blood group typing,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, no. 5, pp. 1443–1451, 2009, doi: 10.1007/s00216-008-2411-3.
- [32] S. Narayanan, L. Galloway, A. Nonoyama, G. F. Leparc, L. H. Garcia-Rubio, and R. L. Potter, “UV-visible spectrophotometric approach to blood typing II: phenotyping of subtype A2 and weak D and whole blood analysis,” *Transfusion*, vol. 42, no. 5, pp. 619–626, 2002, doi: 10.1046/j.1537-2995.2002.00090.x.
- [33] J. Fernandes, S. Pimenta, F. O. Soares, and G. Minas, “A complete blood typing device for automatic agglutination detection based on absorption spectrophotometry,” *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, vol. 64, no. 1, pp. 112–119, 2015, doi: 10.1109/TIM.2014.2331428.
- [34] S. Pimenta, E. M. S. Castanheira, and G. Minas, “Optical microsystem for analysis of diffuse reflectance and fluorescence signals applied to early gastrointestinal cancer detection,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 2, pp. 3138–3153, 2015, doi: 10.3390/s150203138.
- [35] S. Pimenta, S. Cardoso, A. Miranda, P. De Beule, E. M. S. Castanheira, and G. Minas, “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,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 6, no. 8, p. 3084, 2015, doi: 10.1364/boe.6.003084.
- [36] S. Y. Lee *et al.*, “Needle-compatible miniaturized optoelectronic sensor for pancreatic cancer detection,” *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 47, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1126/sciadv.abc1746.
- [37] A. De Marcellis *et al.*, “An integrated analog lock-in amplifier for low-voltage low-frequency sensor interface,” *Proc. 2nd IEEE Int. Work. Adv. Sensors Interfaces, IWASI*, pp. 5–9, 2007, doi: 10.1109/IWASI.2007.4420033.
- [38] Osram, “Bpw 34 b,” pp. 1–12, 2018, [Online]. Available: <https://www.osram.com>.
- [39] L. Gonçalves, “Apontamentos da Unidade Curricular de Instrumentação e Sensores do Mestrado Integrado em Engenharia Electrónica Industrial e Computadores.” .

[40] Analog Devices, “Low Cost Analog Multiplier - AD633JN” *Control*, 2011.

## ANEXO I – DATASHEET DOS COMPONENTES ELETRÔNICOS

Tabela 5 - Datasheets dos LEDs utilizados em todas as placas de iluminação.

Componente	Datasheet			
LED800L	<b>Absolute Max Ratings</b>			
	<b>Specification</b>	<b>Max</b>		
	Reverse Voltage	5 V		
	DC Forward Current	75 mA		
	Pulsed Forward Current <sup>a</sup>	100 mA		
	Operating Case Temperature	-40 to 80 °C		
	Storage Temperature	-40 to 100 °C		
	<b>Specifications<sup>b</sup></b>			
		<b>Min</b>	<b>Typical</b>	<b>Max</b>
	Operating Current (Continuous)	-	50 mA	75 mA
	Forward Voltage at 50 mA	-	1.7 V	2.0 V
	Optical Output Power at 50 mA	-	20 mW	-
	Viewing Half Angle	-	12°	-
	Peak Wavelength	780 nm	800 nm	820 nm
Bandwidth (FWHM)	-	30 nm	-	
a. Pulsed Forward Current Condition: Duty Cycle = 1% and Pulse Width = 10 µs.				
b. Unless otherwise specified, all specifications are for operation at 25 °C.				
LEDSW50	<b>Absolute Max Ratings</b>			
	<b>Specification</b>	<b>Max</b>		
	Reverse Voltage	5 V		
	DC Forward Current	180 mA		
	Operating Mount Temperature	-30 to 80 °C		
	Storage Temperature	-30 to 85 °C		
	<b>Specifications<sup>a</sup></b>			
		<b>Min</b>	<b>Typical</b>	<b>Max</b>
	Correlated Color Temperature	-	5000 K	-
	Operating Current (Continuous)	-	150 mA	-
	Forward Voltage at 150 mA	-	3.4 V	3.6 V
	Optical Output Power at 150 mA	-	110 mW	-
	Viewing Half Angle	-	50°	-
	Color Rendering Index (CRI) <sup>b</sup>	90	-	-
Lifetime <sup>c</sup>	25000 hrs	-	-	
a. All values are specified for a mount temperature of 25 °C.				
b. The CRI indicates on a scale from 0 to 100 how accurate the spectrum matches a reference.				
c. Lifetime is defined as the time required for the LED light output to drop by 50% when driven at the specified current.				

LED405L	<b>Absolute Max Ratings</b>													
	<b>Specification</b>			<b>Max</b>										
	Reverse Voltage			5 V										
	DC Forward Current			30 mA										
	Pulsed Forward Current <sup>a</sup>			100 mA										
	Operating Case Temperature			-30 to 85 °C										
	Storage Temperature			-30 to 100 °C										
	<b>Specifications<sup>b</sup></b>													
				<b>Min</b>			<b>Typical</b>			<b>Max</b>				
	Operating Current (Continuous)			-			20 mA			30 mA				
Forward Voltage at 20 mA			-			3.5 V			4 V					
Optical Output Power at 20 mA			-			6 mW			-					
Viewing Half Angle			-			17°			-					
Peak Wavelength			395 nm			405 nm			415 nm					
Bandwidth (FWHM)			-			20 nm			-					
<p>a. Pulsed Forward Current Condition: Duty Cycle = 1% and Pulse Width = 10 μs.</p> <p>b. Unless otherwise specified, all specifications are for operation at 25 °C.</p>														
UV5TZ-400-30	<small>T<sub>A</sub> = 25°C unless otherwise noted</small>													
	Power Dissipation											120 mW		
	Forward Current ( DC )											20 mA		
	Peak Forward Current <sup>1</sup>											100 mA		
	Electrostatic Discharge ( Class1 )											2000 V		
	Reverse Voltage											— V		
	Operating Temperature Range											-25 ~ +80°C		
	Storage Temperature Range											-30 ~ +80°C		
	Lead Soldering Temperature ( 3 mm from the base of the epoxy bulb ) <sup>2</sup>											260°C		
	<small>Notes: 1. 10% Duty Cycle, Pulse Width ≤ 0.1 msec.    2. Solder time less than 5 seconds at temperature extreme.</small>													
<b>Electrical Characteristics</b>														
<small>T<sub>A</sub> = 25°C &amp; I<sub>F</sub> = 20 mA unless otherwise noted</small>														
Part Number	Forward Voltage (V) <sup>1</sup>			Recommend Forward Current (mA)			Reverse Current (mA)	Peak Wavelength λ <sub>p</sub> (nm) <sup>2</sup>			Emitting Power (mW)		50% Power Angle (deg)	
	MIN	TYP	MAX	MIN	TYP	MAX		MAX	MIN	TYP	MAX	MIN		TYP <sup>3</sup>
UV5TZ-385-15	3.2	3.4	3.6	10	15	20	100	382.5	385.0	387.5	10	20	15	
UV5TZ-390-15	3.2	3.4	3.6					387.5	390.0	392.5	20	40		
UV5TZ-395-15	3.1	3.3	3.5					392.5	395.0	397.5	20	40		
UV5TZ-400-15	3.1	3.3	3.5					397.5	400.0	402.5	20	40		
UV5TZ-405-15	3.1	3.3	3.5					402.5	405.0	407.5	20	40		
UV5TZ-385-30	3.2	3.4	3.6	10	15	20	100	382.5	385.0	387.5	10	20	30	
UV5TZ-390-30	3.2	3.4	3.6					387.5	390.0	392.5	20	40		
UV5TZ-395-30	3.1	3.3	3.5					392.5	395.0	397.5	20	40		
UV5TZ-400-30	3.1	3.3	3.5					397.5	400.0	402.5	20	40		
UV5TZ-405-30	3.1	3.3	3.5					402.5	405.0	407.5	20	40		
<small>Notes: 1. Tolerance of forward voltage : ±0.05V.    2. Tolerance of peak wavelength : ±1.0nm.    3. Tolerance of emitting power (Typ) : ±15%.</small>														

MTE2081-OH5

**Absolute Maximum Ratings (Ta=25°C)**



ITEMS	SYMBOL	RATINGS	UNIT
Forward Current (DC)	IF	100	mA
Forward Current (Pulse)*1	IFP	1	A
Reverse Voltage	VR	5	V
Power Dissipation	PD	180	mW
Operating Temperature Range	Topr	-20 ~ +80	°C
Storage Temperature Range	Tstg	-30 ~ +100	°C
Junction Temperature	TJ	100	°C
Lead Soldering Temperature*2	Tls	260	°C

\*1: Tw=10μsec, T=10msec. \*2: Time 5Sec max, Position: Up to 3mm from the body.

**Electrical & Optical Characteristics (Ta = 25°C)**

ITEMS	SYMBOL	CONDITIONS	MIN	TYP	MAX	UNIT
Power Output	PO	IF=50mA	--	20.0	--	mW
Forward Voltage	VF	IF=50mA	--	1.55	1.9	V
Reverse Current	IR	VR=5V	--	--	100	μA
Peak Emission Wavelength	λp	IF=50mA	--	810	--	nm
Spectral Line Half Width	Δλ	IF=50mA	--	40	--	nm
Half Intensity Beam Angle	Θ	IF=50mA	--	±7	--	deg
Switching Time	Tr,Tf	IFP=50mA	--	36, 20	--	ns
Switching Time	Tr,Tf	IFP=100mA	--	30	--	ns

## ANEXO II – CÓDIGO IMPLEMENTADO EM ARDUINO PARA A ALIMENTAÇÃO DOS LEDs

```
#include <SoftwareSerial.h>

//frequências arduino
//Pinos de Output
int led_400nm = 6; //Pin 6 de saída de PWM -> LEDs da zona dos 400nm
int led_visivel = 7; //Pin 7 de saída de PWM -> LEDs da zona do visível
int led_800nm = 8; //Pin 8 de saída de PWM -> LEDs da zona dos 800nm
int input = A0; //Pino para entrada dos dados

String value;
int value_int;
int myEraser = 7;

void setup(){
  pinMode(led_400nm, OUTPUT); //Define Pin led_400nm como output
  pinMode(led_visivel, OUTPUT); //Define Pin led_geral como output
  pinMode(led_800nm, OUTPUT); //Define Pin led_800nm como output
  pinMode(input, INPUT); //Define input como input
  //pinMode(LED_BUILTIN, OUTPUT); //LED embutido no arduino, usado para teste
  TCCR4B &= ~myEraser; //Limpa os valores do registo TCCR4B para depois escrever novamente no mesmo
  TCCR4B |= B00000011; // Define a frequência dos pinos 6/7/8 para 490 Hz

  //Serial Config.
  // Open serial communications and wait for port to open:
  Serial.begin(9600);
  while (!Serial) {
    ;
  }
  // wait for serial port to connect. Needed for Native USB only
}

void set_pwm_freq(int aux){
  //TCCR2B = TCCR2B & B11111000 | B00000001; // 31372.55 Hz
  //TCCR2B = TCCR2B & B11111000 | B00000010; // 3921.16 Hz
  //TCCR2B = TCCR2B & B11111000 | B00000011; // 500 Hz
  //TCCR2B = TCCR2B & B11111000 | B00000100; // 122.55 Hz
  //TCCR2B = TCCR2B & B11111000 | B00000101; // 30.64 Hz
  Serial.println(TCCR4B);
```



```

if(aux == 1){
  TCCR4B &= ~myEraser;
  TCCR4B |= B00000001; // for PWM frequency of 31372.55 Hz
}
else if(aux == 2){
  TCCR4B &= ~myEraser;
  TCCR4B |= B00000010; // for PWM frequency of 3921.16 Hz
}
else if(aux == 3){
  TCCR4B &= ~myEraser;
  TCCR4B |= B00000011; // for PWM frequency of 490 Hz
}
else if(aux == 4){
  TCCR4B &= ~myEraser;
  TCCR4B |= B00000100; // for PWM frequency of 122.55 Hz
}
else if(aux == 5){
  TCCR4B &= ~myEraser;
  TCCR4B |= B00000101; // for PWM frequency of 30.64 Hz
}
}

void menu(int value_int){
  int XD = value_int;
  int aux;
  int pwm_int;
  int pwm_value;
  String aux_string;
  String decision;
  String value_pwm;

  String todos = "todos";
  String quatrocentos = "400nm";
  String oitocentos = "800nm";
  String visivel = "branco";

  if(value_int==1){
    Serial.print("\n todos - Variar PWM de todos os leds \n 400nm - Variar PWM dos LEDs de 400nm \n 800nm - Variar PWM dos LEDs de
800nm \n branco - Variar PWM dos LEDs da zona do visível \n\n");
    while (!Serial.available()) {
    }
    if (Serial.available() > 0) {

```

```

decision = Serial.readString();
decision.trim();
Serial.print(decision);
Serial.print("\n");
}
if (decision.equals(todos)){
do{
Serial.print("\nInserir valor entre 0 - 99\n");
while (!Serial.available()) {}
if (Serial.available() > 0) {
value_pwm = Serial.readString();
Serial.print(value_pwm);
Serial.print("\n");
pwm_int = value_pwm.toInt();
pwm_value = (pwm_int * 255) / 100; //Converte o valor de percentagem de duty cycle para valor de 0 a 255
Serial.print("\nValor Recebido: ");
Serial.print(pwm_int);
Serial.print("\n");
}
}while(pwm_int <= (-1) || pwm_int >= 101);
for (int i = 0; i < pwm_value; i++) {
analogWrite(led_400nm, i);
analogWrite(led_visivel, i);
analogWrite(led_800nm, i);
}
}
else if (decision.equals(oitocentos)){
do{
Serial.print("\nInserir valor entre 0 - 99");
while (!Serial.available()) {}
if (Serial.available() > 0) {
value_pwm = Serial.readString();
pwm_int = value_pwm.toInt();
pwm_value = (pwm_int * 255) / 100; //Converte o valor de percentagem do duty cycle para valor de 0 a 255
Serial.print("\nValor Recebido: ");
Serial.print(pwm_int);
Serial.print("\n");
}
}while(pwm_int <= (-1) || pwm_int >= 101);
for (int i = 0; i < pwm_value; i++) {
analogWrite(led_800nm, i);
}
}
}

```

```

else if (decision.equals(quatrocetos)){
do{
Serial.print("\nInserir valor entre 0 - 99");
while (!Serial.available()) {}
if (Serial.available() > 0) {
value_pwm = Serial.readString();
pwm_int = value_pwm.toInt();
pwm_value = (pwm_int * 255) / 100; //Converte o valor de percentagem do duty cycle para valor de 0 a 255
Serial.print("\nValor Recebido: ");
Serial.print(pwm_int);
Serial.print("\n");
}
}while(pwm_int <= (-1) || pwm_int >= 101);
for (int i = 0; i < pwm_value; i++) {
analogWrite(led_400nm, i);
}
}
else if (decision.equals(visivel)){
do{
Serial.print("\nInserir valor entre 0 - 99");
while (!Serial.available()) {}
if (Serial.available() > 0) {
value_pwm = Serial.readString();
pwm_int = value_pwm.toInt();
pwm_value = (pwm_int * 255) / 100; //Converte o valor de percentagem do duty cycle para valor de 0 a 255
Serial.print("\nValor Recebido: ");
Serial.print(pwm_int);
Serial.print("\n");
}
}while(pwm_int <= (-1) || pwm_int >= 101);
for (int i = 0; i < pwm_value; i++) {
analogWrite(led_visivel, i);
}
}
else {
Serial.print("\nPalavra não reconhecida\n\n");
menu(XD);
}
}

else if(value_int == 3){
Serial.print("\n\n 1-> Frequencia = 31372.55 Hz \n 2-> Frequencia = 3921.16 Hz \n 3-> Frequencia = 490 Hz \n 4-> Frequencia =
122.55 Hz \n 5-> Frequencia = 30.64 Hz");

```

```

while (!Serial.available()) {
}
if(Serial.available() > 0){
  aux_string = Serial.readString();
  aux = aux_string.toInt();
  if(aux == 1 || aux == 2 || aux == 3 || aux == 4 || aux == 5){
    set_pwm_freq(aux);
  }
  else{
    Serial.print("\nInserir valor entre 1 e 5");
    menu(XD);
  }
}
}
else if(value_int == 2){
  int tempo = 0;
  String paragem = "stop";
  String auxiliar;

  Serial.print("stop para parar leitura \n");
  do{
    delay(0.001); //ms
    int sensor_value = analogRead(input);
    sensor_value = (sensor_value * 5)/1024;
    //output.flush(sensor_value);
    Serial.println(sensor_value);
    Serial.print("\n");
  }while(!Serial.available());
  auxiliar = Serial.readString();
  if(auxiliar.equals(paragem)){
    loop();
  }
}

}

void loop(){

  Serial.print("\n*****\n* 1 -> Variar PWM          *\n* 2 -> Ler Resultados          *\n* 3 -> Várias Frequencias
PWM *\n*****\n");
  while (!Serial.available()) {
}
}

```

```
if(Serial.available() > 0){
  value = Serial.readString();
  value_int = value.toInt();
  if(value_int == 1 || value_int == 2 || value_int == 3){
    menu(value_int);
  }
  else{
    Serial.print("\nInserir valor entre 1 e 3");
    loop();
  }
}
}
```