

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Física



**Dispositivo para monitorização em tempo real da síntese e da
hipertermia mediada por nanopartículas de ouro**

Carolina Bértolo

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica
Perfil em Engenharia Clínica e Instrumentação Médica

2015

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Física



**Dispositivo para monitorização em tempo real da síntese e da
hipertermia mediada por nanopartículas de ouro**

Carolina Bértolo

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica e Biofísica
Perfil em Engenharia Clínica e Instrumentação Médica

Orientador: Professor Hugo Ferreira, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Co-orientador: Professora Ana Catarina Reis, Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias

2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, o Professor Hugo Ferreira, por me ter proposto este trabalho sem nunca esquecer as minhas preferências. Um muito obrigada não é suficiente para demonstrar o quanto lhe estou grata e a admiração que lhe tenho. Agradeço por todas as ideias, pela disponibilidade e por todo o optimismo.

À Professora Catarina Reis, a minha co-orientadora, por me receber disponibilizando as instalações e materiais para o trabalho e pelo sentido de iniciativa.

Um muito obrigada a todos os que me acompanharam e ajudaram no IBEB: João Sousa, Francisco Fernandes, Inês Neiva, André Ticló, Rita Gigante e Ricardo Ribeiro. Um obrigada especial ao João Sousa por toda a paciência, atenção e ajuda que me prestou.

Agradeço também à Catarina Silva, doutoranda da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, por toda a ajuda, paciência e material disponibilizado.

A todos os meus colegas de curso, porque sem eles estes 5 anos não teriam sido tão bons. Agradeço em especial à Mariana Neves, toda a amizade, partilha e diversão, que me ajudaram a ultrapassar estes 5 anos da melhor forma possível.

Ao André, por todo o amor, motivação e apoio nos momentos que mais precisei.

Por fim e não menos importante, à minha família, em especial pais e irmãos, obrigada por todas as palavras de motivação e compreensão, sem eles nada disto seria possível.

Resumo

O número de aplicações das nanopartículas de ouro em diversas áreas tem sido exponencial ao longo do tempo. Com este crescimento surge a necessidade de controlar devidamente alguns parâmetros característicos das nanopartículas, tais como o seu tamanho ou temperatura de síntese, consoante a aplicação a que se destinem. Para realizar o controlo destes parâmetros são necessários equipamentos devidamente especializados para esta função. Deste modo, surge a necessidade de criação de sistemas de monitorização em tempo real para processos como a síntese e a hipertermia mediada por nanopartículas.

No presente trabalho, encontra-se descrito o projecto da elaboração de um dispositivo de monitorização de nanopartículas de ouro. O dispositivo foi utilizado para monitorizar o processo de síntese de nanopartículas de ouro em suspensão, bem como a hipertermia mediada por nanopartículas de ouro em agar e por radiação laser de infravermelhos. Os principais constituintes deste dispositivo incluem uma *webcam* e um termómetro de infravermelhos, cuja informação é disponibilizada ao utilizador através de uma Interface Gráfica do Utilizador do *software* MATLAB®. Através do termómetro o dispositivo mediu a temperatura das nanopartículas à distância. Por sua vez, através da *webcam*, monitorizou visualmente as nanopartículas, analisando as imagens adquiridas de forma a retornar a coloração da suspensão de nanopartículas, de forma a inferir se visualmente a síntese decorria como esperado.

Os resultados obtidos através do dispositivo permitiram observar a sua capacidade de monitorização da temperatura e da coloração das nanopartículas durante o seu processo de síntese. Contudo, surgiram algumas dificuldades, tais como, a difícil montagem do dispositivo, nomeadamente do termómetro, e a interferência visual do agitador magnético na análise da coloração das nanopartículas. Relativamente aos resultados obtidos através do dispositivo durante a hipertermia de nanopartículas de ouro em agar no interior de *cuvetes* de plástico (fantomas), foi possível verificar a capacidade do dispositivo em monitorizar a temperatura dos fantomas quando submetidos a radiação laser infravermelha. No entanto, foi impossível inferir a temperatura das nanopartículas em particular, porque a temperatura obtida pelo dispositivo correspondeu à temperatura média do fantoma (nanopartículas, agar e *cuvete*).

Concluindo, o dispositivo desenvolvido conseguiu monitorizar todas as etapas do processo de síntese das nanopartículas de ouro, bem como monitorizar a temperatura dos fantomas com as nanopartículas quando sujeitas à radiação laser. Contudo, existem diversas melhorias que se poderiam implementar ao dispositivo para facilitar a sua utilização e melhorar a apresentação da informação fornecida por ele.

Palavras-chave: Nanopartículas, Dispositivo de Monitorização, *Webcam*, Termómetro de infravermelhos, Interface Gráfica do Utilizador

Abstract

The number of applications of gold nanoparticles in various fields has been exponential over time. With this growth comes the need to properly control some characteristic parameters of nanoparticles, such as its size or temperature synthesis, depending on the application that they are intended for. To perform the control of these parameters specialized equipment are required for this function. Thus arises the need to create monitoring systems in real time for processes such as synthesis and hyperthermia mediated by nanoparticles.

In the present work, is described the project of development of a gold nanoparticle monitoring device. The device was used to monitor the process of synthesis of gold nanoparticles in suspension as well as hyperthermia mediated by gold nanoparticles agar and by infrared laser radiation. The main components of this device include a webcam and an infrared thermometer, whose information is available to the user through a Graphical User Interface in the MATLAB® software. Through the thermometer the device measured the temperature of the nanoparticles at a distance. In turn, with the webcam, the device visually monitored the nanoparticles, analyzing the acquired images in order to return the color of the suspended nanoparticles to infer whether visually stemmed synthesis as expected. However, certain difficulties appeared such as the difficult installation of the device, in particular the thermometer, and the visual interference of the magnetic stirrer in the analysis of the staining of nanoparticles. The results obtained with the device enabled to identify its capability of monitoring the temperature and color of the nanoparticles during their synthesis process. Regarding the results obtained from the device during hyperthermia of gold nanoparticles in agar inside plastic cuvettes (phantoms), we found the device's ability to monitor the temperature of phantoms when subjected to infrared laser radiation. However, it was impossible to infer the temperature of the nanoparticles in particular, as the temperature obtained by the device corresponds to the average temperature of the phantom (nanoparticles, agar and cuvette).

In conclusion, the developed device could monitor all stages of the synthesis of gold nanoparticles process and monitor the temperature of phantoms with nanoparticles when subjected to laser radiation. However, there are several improvements that could be implemented on the device to facilitate their use and improve the presentation of the information provided by him.

Keywords: Nanoparticles, Monitoring Device, Webcam, Infrared Thermometer, Graphical User Interface

Índice de Conteúdos

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice de Conteúdos	vi
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Siglas e Acrónimos	xiv
Capítulo 1 Introdução.....	1
1.1. Nanoescala, Nanociência e Nanotecnologia.....	1
1.2. Motivação e Objectivos	2
1.3. Estrutura da Dissertação.....	2
Capítulo 2 Nanopartículas.....	4
2.1. Nanopartículas metálicas.....	4
2.2. Ressonância de Plasmão de Superfície e Coloração	4
2.3. Dimensões.....	6
2.4. Forma	8
2.5. Síntese de nanopartículas de ouro	9
2.6. Aplicações	11
Capítulo 3 Métodos de caracterização das nanopartículas	13
3.1. Microscopia.....	13
3.1.1. Microscópio electrónico de varrimento por tunelamento	14
3.1.2. Microscópio de Força Atómica	16
3.2. Métodos espectroscópicos	17
3.2.1. Métodos por Raios-X.....	18
3.2.2. Absorção e Emissão do Plasmão no Ultravioleta-Infravermelho	18
3.2.3. Dispersão da luz pela ressonância de plasmão.....	18
3.2.4. Dispersão de Raman amplificada por superfície (SERS)	18
3.3. Métodos de caracterização não-radiativos e não-electrónicos.....	19
Capítulo 4 Metodologia.....	20
4.1. Descrição dos componentes do dispositivo.....	20
4.1.1. Webcam	21

4.1.2. Termómetro de Infravermelhos	21
4.1.2.1. SMBus	22
4.1.2.2. Transferência de informação	23
4.1.2.3. TO-39 package	24
4.1.2.4. Pins do termómetro	24
4.1.2.5. Valores máximos dos parâmetros de utilização	25
4.1.2.6. Campo de visão	25
4.1.3. Arduino UNO.....	26
4.1.4. Montagem dos componentes do dispositivo	27
4.2. Descrição do Software	30
4.2.1. Fritzing.....	30
4.2.2. Interface gráfica do dispositivo (GUI)	31
4.2.3. Algoritmos desenvolvidos para o dispositivo	32
4.2.3.1. Algoritmos de implementação da webcam	32
4.2.3.2. Algoritmos de implementação do termómetro.....	33
4.3. Calibração do Material.....	33
4.3.1. Calibração da Webcam	34
4.3.2. Calibração do Termómetro	35
4.4. Utilização do dispositivo no processo de síntese das nanopartículas de ouro.....	36
4.5. Utilização do dispositivo na hipertermia das nanopartículas de ouro	37
Capítulo 5 Resultados.....	38
5.1. Calibração do termómetro de infravermelhos	38
5.2. Processo de síntese de nanopartículas de ouro	42
5.2.1. Método “Seed”	42
5.2.2. Método “Seed” (2ª redução)	48
5.2.3. Método “Growth”	50
5.2.4. Método “Seed Growth”	52
5.3. Hipertermia de nanopartículas de ouro através de radiação laser	54
Capítulo 6 Discussão e Conclusão	58
6.1. Discussão.....	58
6.1.1. Calibração dos componentes do dispositivo	58
6.1.2. Processo de síntese de nanopartículas de ouro	59
6.1.3. Hipertermia de nanopartículas de ouro através de radiação laser	60
6.2. Limitações e Perspectivas Futuras	61

6.3. Conclusão	62
Bibliografia	63
Anexo I	68
Anexo II	69
Anexo III	72
Anexo IV	73
Anexo V	74
Anexo VI	75
Anexo VII	76
Anexo VIII	77

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo da ressonância de plasmão de superfície localizada. [5]	5
Figura 2: À superfície das nanopartículas de ouro existe uma camada de aniões que as mantêm separadas (tubo de ensaio da esquerda). A adição de cloreto de sódio à suspensão de nanopartículas, estas aproximam-se e agrupam-se, devido aos iões adicionados através do cloreto de sódio. Deste modo é possível observar alterações de cor da suspensão (tubo de ensaio da direita). [48]	6
Figura 3: Espectro da luz visível de nanopartículas de ouro esféricas de vários tamanhos diferentes. [5]	7
Figura 4: Diagramas das diferentes formas estruturais de nanopartículas. [5]	7
Figura 5: Espectro visível de <i>nanorods</i> de ouro com diferentes <i>aspect ratio</i> . [5]	8
Figura 6: Diagrama com o exemplo de duas partículas com formatos diferentes, onde a maior e a menor dimensão são identificadas, L e T, respectivamente. [47]	9
Figura 7: Métodos típicos de síntese de nanopartículas para as abordagens <i>top-down</i> e <i>bottom-up</i> . [5]	9
Figura 8: Coloração das nanopartículas de ouro obtidas pelo método de <i>Turkevich</i>	11
Figura 9: Microscópio óptico, microscópio electrónico de transmissão e microscópio electrónico de varrimento (da esquerda para a direita, respectivamente). [45]	14
Figura 10: Imagem de uma ponta de tungsténio de um STM obtida através de um SEM. [46]	15
Figura 11: Funcionamento do STM. [49]	15
Figura 12: Movimento da ponta sobre a superfície. [27]	16
Figura 13: Diagrama do funcionamento geral do AFM (A); Diagrama dos modos dinâmicos de funcionamento do AFM (B). [50]	17
Figura 14: <i>Webcam</i> utilizada no presente trabalho.	21
Figura 15: Termómetro de infravermelhos utilizado no presente trabalho. [44]	22
Figura 16: Formato de um <i>byte</i> no SMBus. ACK (do inglês, <i>ACKnowledgement from receiver</i>); NACK (do inglês, <i>Not ACKnowledgement from receiver</i>); MSb (do inglês, <i>the Most Significant bit</i>); LSb (do inglês, <i>the Last Significant bit</i>); SDA (do inglês, <i>Serial Data</i>); SCL (do inglês, <i>Serial CLock</i>). [34]	23
Figura 17: TO-39 <i>package</i> do termómetro de infravermelhos MLX90614BAA. [33]	24
Figura 18: Vista superior dos <i>pins</i> do termómetro MLX90614BAA. SDA (do inglês, <i>Serial Data</i>); PWM (do inglês, <i>Pulse Width Modulated</i>); SCL (do inglês, <i>Serial CLock</i>); Vz (do inglês, <i>Zener Voltage</i>); VDD (do inglês, <i>Positive supply voltage</i>); VSS (do inglês, <i>Negative supply voltage/ Ground</i>). [33]	24
Figura 19: Campo de visão de um instrumento. [36]	25
Figura 20: Gráfico do campo de visão (FOV) do termómetro MLX90614BAA. [33]	26
Figura 21: Arduino UNO modelo R3 visto superiormente. [51]	27
Figura 22: Arduino UNO modelo R3 visto inferiormente. [52]	27
Figura 23: Esquema de montagem do termómetro, das resistências (R1 e R2), do condensador e do Arduino UNO (representado por MCU). [33]	28
Figura 24: Mini- <i>breadboard</i> de dimensões (3.3x4.3) cm ² utilizada no presente trabalho. [53]	28
Figura 25: Montagem do Arduino UNO à mini- <i>breadboard</i> com o termómetro MLX90614.	28

Figura 26: Termómetro MLX90614 e respectiva ligação à mini- <i>breadboard</i> (5 <i>IC sockets</i> e 2 <i>Interconnectors</i>); Mini- <i>breadboard</i> e respectiva ligação ao Arduino UNO (silicone).....	29
Figura 27: Termómetro MLX90614 e respectivos <i>IC sockets</i> desacoplados da mini- <i>breadboard</i> com os 2 <i>interconnectors</i>	29
Figura 28: Esquema de montagem do Arduino UNO à mini <i>breadboard</i> com o termómetro de infravermelhos e restantes componentes (duas resistências e um termómetro).	30
Figura 29: Exemplo de uma Interface Gráfica do Utilizador (GUI). [54]	31
Figura 30: <i>Layout</i> da Interface Gráfica do Utilizador no MATLAB desenvolvida para o presente trabalho. De acordo com a Figura, o “1” corresponde ao <i>output</i> da <i>webcam</i> , o “2” à imagem capturada da filmagem em “1”, o “3” à cor resultante da imagem em “2”, o “4” ao gráfico da temperatura e o “5” ao painel de instruções da GUI para o utilizador.	32
Figura 31: Painel de instruções da Interface Gráfica do Utilizador, com destaque (rectângulo amarelo) para os passos a seguir para a calibração dos componentes. .do dispositivo.	34
Figura 32: Posicionamento do cartão preto à frente da <i>webcam</i> para a realização do protocolo de calibração.	34
Figura 33: Montagem do equipamento para executar a calibração do termómetro de infravermelhos.	35
Figura 34: Algumas <i>cuvetes</i> de plástico transparente com <i>nanorods</i> em agar.	37
Figura 35: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 0,5 cm.	38
Figura 36: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 1,0 cm.	39
Figura 37: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 1,5 cm.	39
Figura 38: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 2,0 cm.	40
Figura 39: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 2,5 cm.	40
Figura 40: Gráfico com as rectas de calibração criadas para as 5 distâncias, respectivamente.....	41
Figura 41: Montagem dos componentes do dispositivo para a monitorização do método “Seed”	42
Figura 42: Visualização da filmagem da <i>webcam</i> do dispositivo na GUI previamente à realização do método “Seed”	43
Figura 43: Introdução do papel entre o balão e a areia.	43
Figura 44: Janela de calibração do termómetro IR da Interface Gráfica do Utilizador do dispositivo onde o utilizador introduz a distância termómetro-objecto, neste caso 0,5 cm.	44
Figura 45: Calibração da <i>webcam</i> com o cartão preto.	44
Figura 46: GUI em funcionamento durante o método “Seed”. Observações: Os quadrados vermelhos existentes na parte superior do gráfico da temperatura correspondem aos valores de temperatura medidos pelo dispositivo. Por sua vez, os quadrados vermelhos existentes na parte inferior do gráfico da temperatura correspondem aos valores das posições vectoriais em que as temperaturas imediatamente acima estão a ser guardadas. Os pontos pretos, correspondentes ao valor 85°C,	

correspondem ao valor de temperatura mínima necessário atingir para que ocorra a ebulição da solução de nanopartículas de ouro durante o método "Seed".	45
Figura 47: <i>Command Window</i> do MATLAB apresentando as temperaturas lidas pelo termómetro IR (correspondente ao valor de "ans").	46
Figura 48: GUI com a monitorização da solução "Seed" resultante do método.	47
Figura 49: Fotografia do balão com a solução "Seed" resultante.	47
Figura 50: Montagem da <i>webcam</i> para monitorizar a adição do 2º redutor na solução "Seed" obtida anteriormente.	48
Figura 51: Visualização da solução "Seed" em gelo sob agitação magnética (excluindo o segundo painel da GUI).	48
Figura 52: Calibração da <i>webcam</i> (excluindo o segundo painel da GUI).	49
Figura 53: Remoção do cartão preto de calibração do campo de visão da <i>webcam</i> (excluindo o segundo painel da GUI).	49
Figura 54: Início da análise da cor da solução, ou seja, após o "click" no botão "Color/Temperature" (excluindo o segundo painel da GUI).	49
Figura 55: Imediatamente após a adição do 2º agente redutor na solução "Seed" (excluindo o segundo painel da GUI).	50
Figura 56: Solução "Seed" com o 2º agente redutor após as duas horas (excluindo o segundo painel da GUI).	50
Figura 57: Montagem da <i>webcam</i> do dispositivo para a monitorização do método "Growth".	50
Figura 58: Calibração da <i>webcam</i> (excluindo o segundo painel da GUI).	51
Figura 59: Remoção do cartão preto de calibração do campo de visão da <i>webcam</i> (excluindo o segundo painel da GUI).	51
Figura 60: GUI em funcionamento durante o método "Growth" após a adição de HAuCl_4 no copo de precipitação (excluindo o segundo painel da GUI).	51
Figura 61: Resultado final da reacção do método "Growth" onde se observa a solução da cor castanho esverdeado.	52
Figura 62: Coloração da solução "Growth" obtida pelo dispositivo no final da realização do método "Growth" (excluindo o segundo painel da GUI).	52
Figura 63: GUI em funcionamento durante o método "Seed Growth" após a adição das 5 gotas de solução "Seed" (após 2ª redução) no copo de precipitação com a solução "Growth" (excluindo o segundo painel da GUI).	53
Figura 64: GUI demonstrando a solução "Seed Growth" passados 15 minutos da adição das 5 gotas de solução "Seed" (após 2ª redução) sob agitação magnética (excluindo o segundo painel da GUI).	53
Figura 65: GUI demonstrando a solução "Seed Growth" passados 15 minutos da adição das 5 gotas de solução "Seed" (após 2ª redução) sem agitação magnética (excluindo o segundo painel da GUI).	53
Figura 66: Imagem microscópica das <i>nanorods</i> da <i>cuvete</i> selecionada para a experiência previamente à realização da mesma.	54
Figura 67: Posicionamento (à direita na imagem) da <i>cuvete</i> e do termómetro IR na montagem.	55
Figura 68: Posicionamento do termómetro IR relativamente à <i>cuvete</i> com as <i>nanorods</i> (vista superior).	55

Figura 69: Gráfico resultante da 1ª medição (irradiação durante 10 minutos) em que a temperatura máxima obtida pelo dispositivo foi de 38,0 °C (excluindo o primeiro painel da GUI). Observação: O registo correspondente à <i>sample</i> 47 (final do gráfico) demonstram a diminuição de temperatura no interior da <i>cuvete</i> devido à paragem do funcionamento do feixe <i>laser</i>	56
Figura 70: Gráfico resultante da 2ª medição (irradiação durante 20 minutos) em que a temperatura máxima obtida pelo dispositivo foi de 43,2 °C (excluindo o primeiro painel da GUI). Observação: O registo correspondente às <i>samples</i> 69 e 70 (final do gráfico) demonstram a uma diminuição de temperatura no interior da <i>cuvete</i> devido à paragem do funcionamento do feixe <i>laser</i>	56
Figura 71: Imagem microscópica das <i>nanorods</i> após a primeira medição.....	57
Figura 72: Imagem microscópica das <i>nanorods</i> após a segunda medição.	57
Figura 73: GUI.fig	68

Índice de Tabelas

Tabela 1: Materiais e <i>softwares</i> utilizados no desenvolvimento do dispositivo.	20
Tabela 2: Valores máximos absolutos dos parâmetros do termómetro de infravermelhos MLX90614ESF-BAA da <i>Melexis</i> . [33]	25

Siglas e Acrónimos

ACK	Reconhecimento do Receptor (do inglês, <i>ACKnowledgement from receiver</i>)
ADC	Conversor de Analógico para Digital (do inglês, <i>Analog to Digital Converter</i>)
AFM	Microscópio de Força Atômica (do inglês, <i>Atomic Force Microscope</i>)
DPN	Nanolitografia <i>Dip Pen</i> (do inglês, <i>Dip Pen Nanolitography</i>)
DSP	Processador de Sinal Digital (do inglês, <i>Digital Signal Processor</i>)
EMC	Compatibilidade Electromagnética (do inglês, <i>Electromagnetic Compability</i>)
FOV	Campo de Visão (do inglês, <i>Field of View</i>)
GUI	Interface Gráfica do Utilizador (do inglês, <i>Graphical User Interface</i>)
HAuCl₄	Ácido cloroáurico
IR	Infravermelhos (do inglês, <i>Infrared</i>)
I²C	Circuito Inter-Integrado (do inglês, <i>Inter-Integrated Circuit</i>)
LSPR	Ressonância de Plasmão de Superfície Localizada (do inglês, <i>Localised Surface Plasmon Resonance</i>)
MSB	O Bit Mais Significativo (do inglês, <i>The Most Significant Bit</i>)
Na₃C₆H₅O₇	Citrato trissódico
NACK	Não Reconhecimento do Receptor (do inglês, <i>Not ACKnowledgement from receiver</i>)
NIR	Infravermelho próximo (do inglês, <i>Near Infrared</i>)
NP	Nanopartícula
NPs	Nanopartículas
PWM	Modulação por largura de impulsos (do inglês, <i>Pulse Width Modulated</i>)
QCM	Microbalança de Cristais de Quartzo (do inglês, <i>Quartz Crystal Microbalance</i>)
RAM	Memória de Acesso Aleatório (do inglês, <i>Random-Acess Memory</i>)
RGB	Vermelho, Verde, Azul (do inglês, <i>Red, Green, Blue</i>)
SCL	Entrada do relógio em série (do inglês, <i>Serial Clock</i>)
SDA	Entrada dos dados em série (do inglês, <i>Serial Data</i>)
SEM	Microscópio Electrónico de Varrimento (do inglês, <i>Scanning Electron Microscope</i>)
SERS	Espectroscopia de Raman Amplificada por Superfície (do inglês, <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>)
SMBus	Protocolo de barramento serial com dois fios (do inglês, <i>System Management Bus</i>)
STM	Microscópio Electrónico de Varrimento por Tunelamento (do inglês, <i>Scanning Tunnelling Microscope</i>)
TEM	Microscópio Electrónico de Transmissão (do inglês, <i>Transmission Electron Microscope</i>)
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravimetric Analysis</i>)
TO	Contornos do Transístor (do inglês, <i>Transistor Outline</i>)
USB	Barramento em Série Universal (do inglês, <i>Universal Serial Bus</i>)
VDD	Fonte de alimentação positiva (do inglês, <i>Positive Supply Voltage</i>)
VSS	Fonte de alimentação negativa/ Terra (do inglês, <i>Negative Supply Voltage/ Ground</i>)

Capítulo 1

Introdução

1.1. Nanoescala, Nanociência e Nanotecnologia

A nanoescala ou escala nanométrica refere-se à dimensão que varia entre 1 e 100 nm. [1] No Sistema Internacional de Unidades 'nano' corresponde ao factor 10^{-9} , ou 1/1 000 000 000. Um nanómetro é igual a 1 milionésimo de 1 milímetro, ou ainda, 1 milésimo de 1 micrómetro e constitui uma medida de comprimento extremamente pequena. [2]

No sentido geral, materiais com pelo menos uma dimensão na nanoescala, podem designar-se nanomateriais. Estes exibem propriedades e funcionalidades extraordinárias devido às suas reduzidas dimensões. [3]

Os nanomateriais são conhecidos e usados pelos humanos há muitos séculos. Por exemplo, o esmalte decorativo encontrado na cerâmica medieval contém nanopartículas dispersas de uma forma única para criar cores que variam de acordo com a luz incidente. Da mesma forma, a cor vermelho rubi existente nos vitrais das igrejas deve-se a nanopartículas de ouro existentes no vidro. Um exemplo mais moderno remonta ao final do século XIX com a produção da fuligem e a sua utilização na produção de borracha. Contudo, não se conhecia o mecanismo exacto do fenómeno naquela época; as partículas à nanoescala da fuligem servem para modificar o comportamento das borrachas. Devido ao desenvolvimento de técnicas avançadas de caracterização à nanoescala e as novas vias de síntese para uma grande produção e variedade, têm sido criadas propriedades únicas para uma vasta gama de aplicações de nanomateriais. [4]

A Nanociência é o estudo dos nanomateriais, assemelhando-se à ciência dos materiais na qual existe uma convergência de disciplinas académicas. Contudo, a ciência dos materiais tradicionalmente não inclui tópicos biológicos. [3]

Todos os sistemas biológicos e criados pelo Homem têm os seus primeiros níveis de organização à escala nanométrica (nanopartículas, nanotubos e nanobiomotores), onde se definem as suas funções e propriedades fundamentais. A investigação de nanobiosistemas, isto é biosistemas à escala nanométrica, tornou-se prioridade para diversos países, devido à sua contribuição na compreensão e no tratamento de sistemas vivos, em processos biotecnológicos revolucionários, na síntese de novos medicamentos e respectiva entrega nas células alvo, na medicina regenerativa, na engenharia neuromórfica e nos materiais biocompatíveis para um ambiente sustentável. Assim, surge a nanobiomedicina que se define como a área que aplica princípios e técnicas à nanoescala para a compreensão e transformação de materiais inertes e biosistemas (vivos e não-vivos) para propósitos médicos, como os referidos anteriormente. A ciência e a engenharia dos nanobiosistemas constituem um dos componentes mais desafiantes e com maior crescimento da nanotecnologia. [1]

A nanotecnologia define-se como a manipulação, controlo e integração de átomos e moléculas para formar materiais, estruturas, componentes, dispositivos e sistemas à nanoescala, ou

seja, é a aplicação da nanociência. A nanotecnologia é uma tecnologia inovadora que terá um impacto cada vez maior no desenvolvimento de materiais e dispositivos de alta qualidade, com aplicação especialmente para fins industriais e comerciais. [3] O facto de a nanotecnologia utilizar materiais com propriedades extraordinárias, com grande potencial e principalmente com dimensões reduzidas que se assemelham às dimensões das estruturas biológicas, como por exemplo as proteínas, o DNA, os vírus (dezenas de nanómetros), as células e os organelos celulares (escala do micrómetro), motiva a sua utilização em aplicações de biomateriais. [4] Prevê-se que a nanotecnologia irá afectar significativamente as nações, sendo considerada uma tecnologia que terá grande impacto na sociedade. [3]

1.2. Motivação e Objectivos

Com o aumento do interesse e da utilização das nanopartículas de ouro em diversas áreas como por exemplo na Medicina, na Toxicologia, na Alimentação, na Mecatrónica, entre outras, é necessária a produção das mesmas. Deste modo, é fundamental automatizar e controlar esta produção de forma a otimizar e aumentar a escala de produção, garantindo a qualidade da reacção e consequentemente as características das nanopartículas.

Desta forma, o objectivo deste trabalho é o desenvolvimento de um dispositivo de monitorização para o processo de síntese de nanopartículas de ouro, bem como da hipertermia mediada por nanopartículas de ouro e por feixe laser de infravermelhos. O dispositivo apresenta as vantagens de ser simples, de baixo custo, de fácil manuseamento, portátil e em tempo real. Resumidamente, o dispositivo será composto principalmente por uma *webcam* e um termómetro de infravermelhos (do inglês, *Infrared*, IR), de forma a observar e detectar alterações da cor da suspensão de nanopartículas de ouro durante a sua síntese e a medir a temperatura da suspensão durante a sua síntese e durante a hipertermia. Desenvolveu-se para o efeito uma aplicação de *software* em ambiente computacional MATLAB, que comunica e controla os dois equipamentos de forma a funcionarem correctamente e em tempo real. Numa fase final do projecto, foram realizados testes de funcionamento ao dispositivo desenvolvido.

1.3. Estrutura da Dissertação

O trabalho que se apresenta foi desenvolvido no âmbito de uma parceria entre o Instituto de Biofísica e Engenharia Biomédica (IBEB) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e o Laboratório de Nanociência e de Nanotecnologia Biomédica (LNBN) da Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).

A presente dissertação encontra-se estruturada em 6 capítulos principais e 8 anexos.

Inicia-se com o Capítulo 1 que se destina a contextualizar o leitor com o trabalho, introduzindo o tema, expondo a motivação e os objectivos do trabalho, bem como a importância do mesmo.

O Capítulo 2 inicia a descrição dos principais conceitos teóricos que suportam a dissertação. Este capítulo aborda de forma geral o tema das nanopartículas, enfatizando principalmente as nanopartículas metálicas referindo as suas principais características como as dimensões e a forma.

São enumeradas ainda várias aplicações possíveis das nanopartículas metálicas, assim como métodos de síntese das mesmas.

No Capítulo 3 encontram-se descritos de forma breve alguns dos métodos que são utilizados para caracterizar e visualizar nanomateriais, nomeadamente nanopartículas.

No Capítulo 4 apresenta-se a metodologia deste trabalho, que por sua vez se divide em 3 partes principais: a) descrição dos componentes e *softwares* utilizados no desenvolvimento do dispositivo (Secções 4.1. e 4.2.); b) calibração do termómetro de infravermelhos e da *webcam* (Secção 4.3.) e c) utilização do dispositivo na síntese e na hipertermia mediada por nanopartículas de ouro (Secções 4.4. e 4.5.).

Os dois últimos capítulos são constituídos pelos Resultados e Considerações Finais. Sendo que no Capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos experimentalmente através do dispositivo. Por sua vez, no Capítulo 6, apresentam-se as conclusões da realização do presente trabalho, assim como algumas das suas limitações e perspectivas futuras.

Por fim, os anexos são constituídos por: I – código do algoritmo de implementação da Interface Gráfica do Utilizador; II – imagem da Interface Gráfica do Utilizador; III, IV e V – códigos dos algoritmos de implementação da *webcam*; VI, VII e VIII – códigos dos algoritmos de implementação do termómetro de infravermelhos.

Capítulo 2

Nanopartículas

As nanopartículas são partículas de dimensões nanométricas constituídas por átomos ou moléculas. Contudo, a definição de nanopartícula difere de acordo com os materiais, campos e aplicações envolvidas. De forma geral, as partículas com dimensões entre 1 e 1000 nm designam-se por nanopartículas. [1] Estas são fundamentais no fabrico de nanoestruturas, sendo muito menores relativamente aos objectos com que lidamos no nosso quotidiano, que se regem pelas Leis da Mecânica Quântica, mas são maiores que os átomos ou que simples moléculas. [5]

2.1. Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas serão os blocos de construção da próxima geração de dispositivos de detecção ou sensores electrónicos, optoelectrónicos e químicos. Estas partículas metálicas são sistemas à nanoescala especialmente interessantes, devido à facilidade com que são sintetizadas e modificadas quimicamente. Do ponto de vista da compreensão dos seus efeitos ópticos e electrónicos podem também oferecer vantagens sobre os outros sistemas, devido às suas constantes ópticas (ou dieléctricas) se assemelharem às do metal que as constitui ao nível macroscópico, mas para dimensões extremamente pequenas (i.e., inferiores a 5 nm). [6] As nanopartículas de ouro, de prata e as de cobre são exemplos de nanopartículas metálicas.

Uma das observações mais interessantes é talvez o facto das partículas metálicas exibirem frequentemente bandas de extinção associadas à excitação da ressonância do seu plasma à superfície, que proporciona cor às dispersões das partículas metálicas. Esta cor varia consoante o tamanho das partículas e para partículas com dimensões comparáveis ao comprimento de onda da luz visível. [7] Isto deve-se ao efeito da ressonância de plasmão de superfície localizada (do inglês, *Localised Surface Plasmon Resonance*, LSPR), que mais à frente será discutido. [8]

2.2. Ressonância de Plasmão de Superfície e Coloração

As nanopartículas metálicas são um exemplo claro de como à escala nanométrica as propriedades da matéria podem mudar. Por exemplo, o ouro metálico (à macroescala) apresenta uma cor amarela. Como o mais nobre de todos os metais, o ouro é muito estável (por exemplo, não reage com o oxigénio ou com o enxofre) e é não tóxico. No entanto, o ouro reduzido à escala nanométrica muda de cor dependendo da sua forma e dimensão, tornando-se por exemplo vermelho, se apresentar uma forma esférica e uma dimensão de 60-70 nm ou incolor se apresentar a forma de um anel. Além disso, as nanopartículas de ouro são muito reactivas contrariamente ao ouro metálico, dando-lhes a oportunidade de serem utilizadas como catalisadores, ou seja, quando introduzidos numa reacção química têm a capacidade de acelerar a velocidade da mesma, sem serem consumidos. [9]

Alguns nanomateriais exibem propriedades ópticas, tais como a cor e a transparência, muito diferentes em comparação com os materiais à macroescala. A cor de um objecto resulta da interacção entre a luz e o material do objecto. Se o material absorve a luz de determinados

comprimentos de onda, o observador não vê as respectivas cores desses comprimentos de onda na luz reflectida. Apenas os comprimentos de onda reflectidos atingem os olhos do observador e são esses mesmo que determinam a cor que o observador vê.

As cores das nanopartículas metálicas em suspensão devem-se sobretudo aos plasmões de superfície, isto é, quando a luz atinge a superfície de um metal (de qualquer dimensão), uma parte desta propaga-se ao longo da superfície metálica dando origem a um plasmão de superfície. [10] Um plasmão representa a oscilação colectiva das cargas livres no metal, podendo ser considerada como uma espécie de onda de plasma. A carga electricamente positiva existente no metal encontra-se fixa, enquanto que o electrão livre (que também possui carga eléctrica) é livre de se mover em torno dela. Deste modo, quando num metal é aplicado um campo eléctrico externo, como uma fonte de luz, os electrões livres na superfície do metal vibram colectivamente criando um campo eléctrico, dando origem aos plasmões na superfície do metal. [5] Ao nível macroscópico quando se forma um plasmão num metal, não se regista nenhum efeito, pois os electrões podem mover-se livremente no material. No entanto, se a luz incidir num colóide que contenha nanopartículas metálicas dispersas menores que o comprimento de onda da luz, então dependendo do campo eléctrico da luz, ocorre a produção de um electrão livre na superfície do metal. Como resultado, ocorrem oscilações do campo eléctrico à superfície das nanopartículas (Figura 1) e podem ser consideradas como um tipo de polarização. [5] Este efeito é designado por efeito da ressonância de plasmão de superfície localizada ou LSPR. Quando a frequência da oscilação é igual à frequência da luz incidente que a provoca, diz-se que o plasmão está em ressonância com a luz incidente. [10]

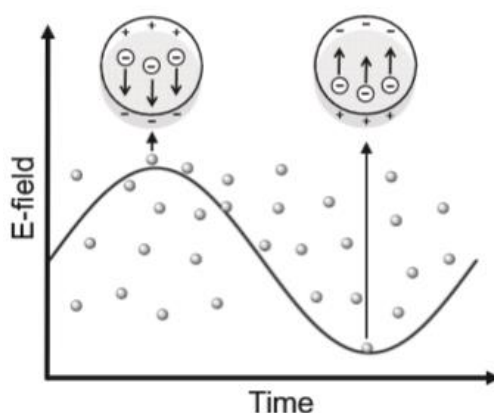


Figura 1: Mecanismo da ressonância de plasmão de superfície localizada. [5]

O comprimento de onda da LSPR é sensível ao tipo de metal constituinte da nanopartícula metálica, à forma, ao tamanho da mesma, bem como ao meio em redor, incluindo a distância entre nanopartículas vizinhas que pode ser alterada pela presença de surfactante ou iões. [9] Isto significa que, se um ligando, como por exemplo uma proteína, se ligar à superfície da nanopartícula metálica, o comprimento de onda da LSPR sofre alteração e consequentemente ocorre alteração na cor da nanopartícula. A Figura 2 demonstra a variação da cor de uma suspensão de nanopartículas de ouro desencadeada pela adição de iões, sob a forma de cloreto de sódio (NaCl). A adição de NaCl faz com que as nanopartículas de ouro se agreguem umas às outras, ficando portanto mais próximas umas das outras, fazendo com que a banda de ressonância dos plasmões sofra um alargamento e se

desloque para comprimentos de onda superiores, tornando assim a o ouro coloidal mais azulado/arroxado.

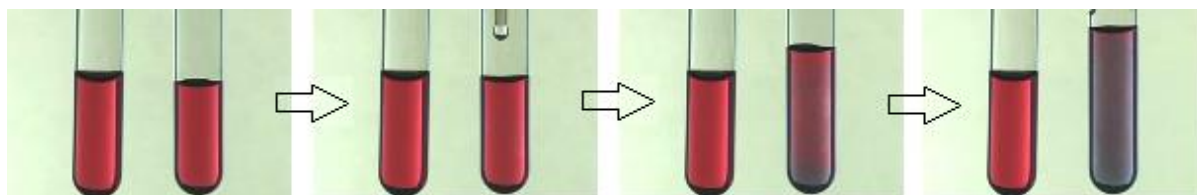


Figura 2: À superfície das nanopartículas de ouro existe uma camada de aniões que as mantêm separadas (tubo de ensaio da esquerda). A adição de cloreto de sódio à suspensão de nanopartículas, estas aproximam-se e agrupam-se, devido aos íons adicionados através do cloreto de sódio. Deste modo é possível observar alterações de cor da suspensão (tubo de ensaio da direita). [48]

Uma das consequências do efeito LSPR nas nanopartículas metálicas é a sua forte absorção na gama do visível, devido à oscilação ressonante e coerente dos plasmões. Como resultado, nanopartículas metálicas em suspensão, tais como o ouro ou a prata, podem exibir cores que nada se assemelham à cor dos respectivos metais à macroescala, como por exemplo, vermelho, púrpura ou laranja, dependendo da forma, do tamanho e do meio circundante das nanopartículas. [10] Por exemplo, o comprimento de onda máximo da banda de ressonância de plasmão de uma nanopartícula esférica de ouro é de 520-550 nm. Se um colóide composto por nanopartículas deste tipo for irradiada com luz visível, a luz visível correspondente ao verde (520-550 nm) é absorvida pelas nanopartículas, deste modo o colóide demonstrar-se-á de cor roxa, que é a cor complementar ao verde. No caso de nanopartículas de prata que apresentam um comprimento de onda máximo da banda de ressonância de plasmão perto dos 400 nm, que no espectro da luz visível corresponde à cor azul, quando irradiadas com luz visível absorvem a cor azul da luz visível e demonstram-se da cor amarela que é a cor complementar ao azul. [5]

2.3. Dimensões

As nanopartículas de ouro podem assumir cores que variam entre o vermelho, a cor de vinho ou o arroxado, consoante o seu tamanho. Deste modo, nanopartículas com diferentes dimensões apresentam características ópticas diferentes. [11] Por exemplo, o aumento do diâmetro das nanopartículas de ouro esféricas provoca o deslocamento da ressonância de plasmão de superfície para comprimentos de onda maiores (Figura 3). [5] Assim, e de acordo com a finalidade pretendida, é importante controlar o tamanho das nanopartículas durante a sua síntese.

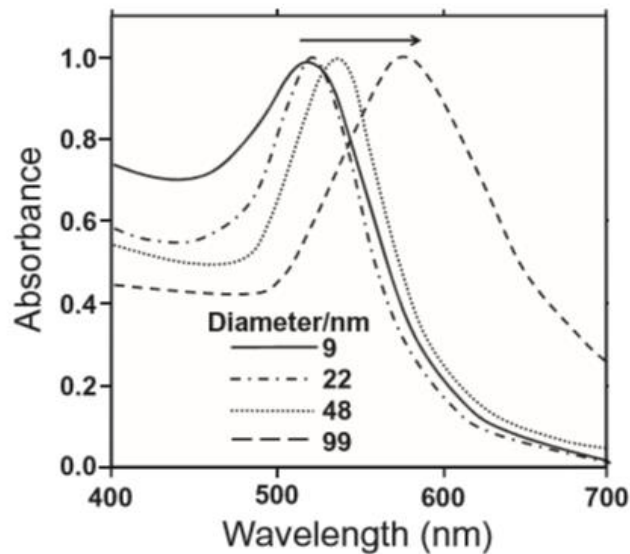


Figura 3: Espectro da luz visível de nanopartículas de ouro esféricas de vários tamanhos diferentes. [5]

A diminuição do tamanho das nanopartículas provoca um aumento na energia de superfície das mesmas, o que facilita a formação de agregação de nanopartículas. Assim, após a formação das nanopartículas das dimensões desejadas é necessário estabilizar a superfície das mesmas através da adição de um agente dispersante, como por exemplo o citrato ou um polímero. No entanto, quando a concentração de nanopartículas é muito elevada, não se consegue obter uma estabilização eficaz, porque a acção protectora do substrato orgânico (por exemplo, o citrato ou o polímero), não é suficientemente forte para evitar a agregação. [5]

As propriedades físicas das nanopartículas podem mudar de acordo com a sua agregação, até mesmo num colóide com nanopartículas de dimensões idênticas.

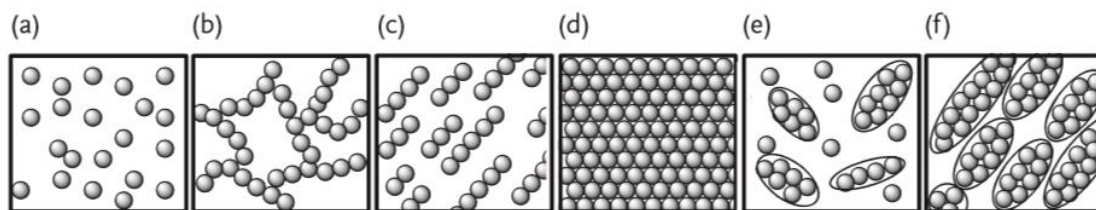


Figura 4: Diagramas das diferentes formas estruturais de nanopartículas. [5]

Nos diagramas da Figura 4, encontram-se descritos os diferentes estados de agregação das nanopartículas. Na estrutura em que as nanopartículas se encontram dispersas aleatoriamente (Figura 4.a), as propriedades ópticas são significativas, devido aos plasmões de superfície das nanopartículas. Por outro lado, as propriedades electrónicas exibem-se na estrutura fractal (Figura 4.b) onde é possível observar ligações entre as nanopartículas devido, por exemplo, ao seu bombardeamento com electrões. Na estrutura com as nanopartículas posicionadas de forma orientada ocorrem deslocamentos da banda de ressonância dos plasmões, o que altera as propriedades ópticas das nanopartículas, traduzindo-se numa alteração de cor das mesmas (Figura 4.c). A estrutura em que as nanopartículas se encontram compactadas umas às outras (Figura 4.d),

é, de todas as estruturas, a que mais facilmente aquece, quando submetida a uma fonte de aquecimento, como por exemplo, a radiação de infravermelhos. Desta forma, esta última estrutura de nanopartículas é a indicada para a realização de experiências de hipertermia de nanopartículas, ou seja, onde a temperatura das nanopartículas é elevada relativamente à temperatura ambiente. Por fim, as estruturas discretas ou ordenadas de outra forma (Figura 4.e e Figura 4.f) apresentam propriedades físicas dinâmicas, electrónicas e magnéticas. [5]

2.4. Forma

O formato das nanopartículas, assim como o tamanho destas, determina também a natureza da banda de ressonância de plasmão de superfície.

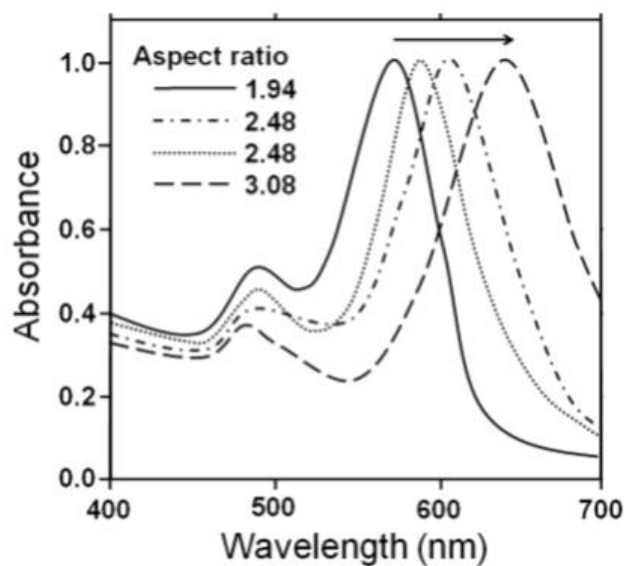


Figura 5: Espectro visível de *nanorods* de ouro com diferentes *aspect ratio*. [5]

Na Figura 5 é possível observar alterações no espectro de absorção na região do espectro visível de várias nanopartículas em forma de bastão (isto é, *nanorods*) com diferentes *aspect ratio*. O diâmetro das *nanorods* de ouro utilizadas variou entre os 5-20 nm, enquanto que o comprimento variou entre 20-150 nm. [5] O *aspect ratio* descreve a relação entre a maior e a menor dimensão de uma partícula da seguinte forma, [12]

$$\text{Aspect Ratio (AR)} = \frac{L}{T}$$

onde L e T representam a maior e a menor dimensão da partícula, respectivamente, de acordo com a Figura 6.

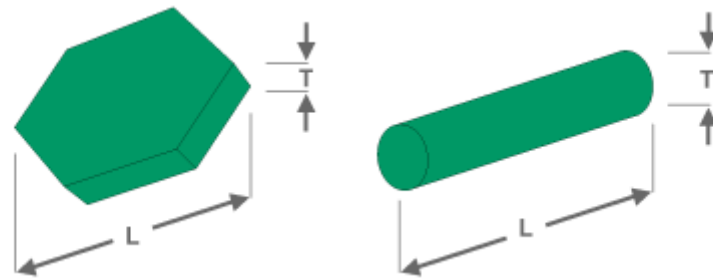


Figura 6: Diagrama com o exemplo de duas partículas com formatos diferentes, onde a maior e a menor dimensão são identificadas, L e T, respectivamente. [47]

É importante salientar que alterações do *aspect ratio* de uma *nanorod* estão relacionadas com alterações nas suas dimensões. Assim, também um aumento do *aspect ratio* provoca alterações na banda de absorção máxima, neste caso deslocando-a para comprimentos de onda superiores. Assim, a composição física das *nanorods* pode mudar facilmente as suas características espectrocópicas.

2.5. Síntese de nanopartículas de ouro

Desde os tempos antigos que se conhecem duas abordagens diferentes para a preparação de nanopartículas (Figura 7). A primeira corresponde ao método *top-down* (de cima para baixo) em que uma força externa aplicada num sólido provoca a sua desintegração em partículas menores. A segunda abordagem corresponde ao método *bottom-up* (de baixo para cima) em que são produzidas nanopartículas a partir de átomos de gás ou líquido à base de transformações atômica ou condensações moleculares. [5]

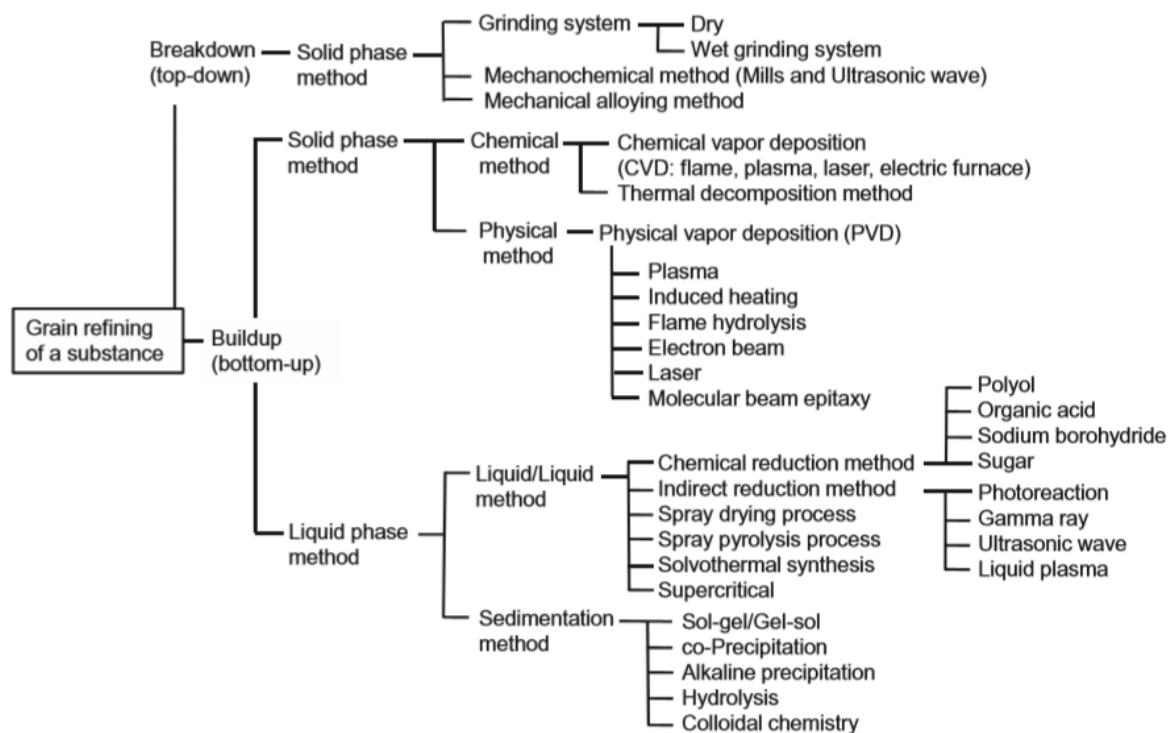


Figura 7: Métodos típicos de síntese de nanopartículas para as abordagens *top-down* e *bottom-up*. [5]

O método *top-down*, que divide uma substância sólida, pode ser subdividido em moagem seca e em moagem húmida. Na moagem seca a substância sólida é moída devido a um embate, a uma compressão, a atrito e à utilização de ferramentas como o moinho de cisalhamento, entre outros. Uma vez que a condensação de partículas pequenas ocorre simultaneamente com a pulverização, devido ao aumento de energia à superfície das partículas durante os processos de refinamento, o que provoca a agregação das partículas provocando o seu aumento, é difícil a obtenção de partículas inferiores a 3 μm . Por outro lado e comparativamente ao método a seco, na moagem húmida de um substrato sólido, é possível prevenir a agregação das nanopartículas formadas, sendo possível a obtenção de nanopartículas altamente dispersas. Além do método de moagem, existe ainda o método mecanoquímico e o método da liga mecânica, que também são métodos *top-down*. [5]

A abordagem *bottom-up* divide-se em métodos de fase gasosa e métodos de fase líquida. Por sua vez, os métodos de fase gasosa dividem-se em métodos químicos e físicos. O método de deposição de vapor químico (CVD) que envolve uma reacção química, enquanto que o método de deposição física de vapor (PVD), recorre ao arrefecimento do material evaporado. Apesar das partículas resultantes dos métodos de fase gasosa apresentarem menos impurezas orgânicas comparativamente aos métodos de fase líquida, exigem a utilização de equipamentos de vácuo complicados, de elevados custos e de baixa produtividade. Os métodos de fase líquida dividem-se em métodos de líquido/líquido e em métodos de sedimentação. A redução química de iões metálicos é um exemplo típico de um método de líquido/líquido, cuja principal vantagem é a fácil produção de partículas de várias formas, tais como, *nanorods*, *nanowires*, *nanoplates*, *nanoprisms* e *nanoshells*. Com o método de redução química é possível ajustar a forma e o tamanho das nanopartículas alterando, por exemplo, ou o agente redutor, ou o tempo de reacção ou a temperatura. Este método utiliza equipamentos de fácil manuseamento e tem a capacidade de produzir grandes quantidades de nanopartículas com um baixo custo e num curto período de tempo. [5]

De forma geral, o método de redução química é o mais utilizado ao nível académico para a síntese de nanopartículas de ouro, envolvendo geralmente o uso de agentes redutores, como o citrato de sódio, o borohidreto de sódio, hidrazinas, formaldeídos, hidroxilaminas, álcoois saturados e insaturados ou açúcares. O método por redução com citrato (método de *Turkevich*) é um método de redução directa, sendo também um dos métodos mais utilizados para a produção de nanopartículas de ouro e um dos mais simples. [13] Inclui apenas três materiais de partida, o ácido tetracloreáurico (HAuCl_4) que é a fonte de ouro na reacção química, o citrato de sódio e água destilada. [14] Resumidamente, num balão de fundo redondo equipado com um condensador adicionam-se 50 mL de (III) tri-hidrato de cloreto de ouro (HAuCl_4) (0,2 mM) até à ebulição (cerca de 90°C), sob agitação magnética de um magneto. Posteriormente, a esta solução adicionam-se 5 mL de citrato de sódio (4 mM), mantendo-se a ebulição durante 10 minutos; após esse período é desligado o aquecimento, mas a agitação é prolongada por mais 15 minutos. Deste processo resultam nanopartículas de ouro esféricas. Relativamente às variações da coloração das nanopartículas de ouro durante este processo de síntese é possível observar que a principal alteração de cor ocorre aquando a adição do citrato de sódio HAuCl_4 , em que é possível observar uma alteração da cor de amarelo pálido para vermelho escuro (Figura 8).



Figura 8: Coloração das nanopartículas de ouro obtidas pelo método de *Turkevich*.

Além do método de redução química, outros métodos de redução são conhecidos para a síntese de nanopartículas, tais como, a foto-redução com raios gama, ondas de ultrassons e o plasma líquido. Estes métodos que não recorrem a uma substância química para a redução tem a vantagem de não adicionarem impurezas estranhas às nanopartículas. Para além destes métodos, são também conhecidos os métodos de secagem por pulverização, de pulverização por pirólise, de síntese solvotérmica e o método supercrítico. [5]

A técnica geral do método de sedimentação é um processo sol-gel, que é utilizado sobretudo para o fabrico de nanopartículas de óxido de metal. Este procedimento transforma uma solução de um alcóxido de metal (de forma química geral $M(OR)_x$, em que o R corresponde a um grupo alquila e o x corresponde ao estado de oxidação do metal) num colóide por meio de uma reacção de hidrólise, seguida de uma policondensação para um gel (ou rede integrada), constituído por partículas discretas ou por polímeros de rede. [5]

2.6. Aplicações

A variedade de aplicações das nanopartículas de ouro tem vindo a aumentar rapidamente e incluem as seguintes áreas:

1. **Electrónica** - as nanopartículas de ouro podem ser utilizadas como tinta condutora na impressão de *chips* electrónicos. Com a redução das dimensões dos constituintes electrónicos, as nanopartículas tornaram-se um dos componentes fundamentais para a construção de *chips*. [15]

2. **Terapia fotodinâmica** – A absorção da radiação de infravermelho próximo (do inglês, *Near Infra Red*, NIR), que varia entre 700 e 1400 nm, [16] por nanopartículas de ouro (nomeadamente, *nanorods*) provoca um aumento de temperatura das mesmas. Tal acontece sempre que se faz incidir luz de comprimento de onda semelhante àquele que as nanopartículas absorvem, dando-lhes a capacidade de erradicarem tumores especificamente. Por exemplo, quando se faz incidir um *laser* de NIR num tumor que contém *nanorods* com absorção máxima no domínio do NIR [5], estas como absorvem a luz milhões de vezes mais que as células orgânicas envolventes [17], aquecem provocando destruição do tumor. Este tratamento é conhecido como terapia por hipertermia. [18]

3. Veiculação de agentes terapêuticos – As nanopartículas de ouro podem ser revestidas com agentes terapêuticos. A grande razão entre a área de superfície e o volume das nanopartículas de ouro permite que a sua superfície seja revestida por centenas de moléculas (incluindo moléculas terapêuticas, marcadores tumorais, entre outras). [19]

4. Sensores – As nanopartículas de ouro são utilizadas numa variedade de sensores. Por exemplo, um sensor de colorimetria com base em nanopartículas de ouro pode identificar se os alimentos estão apropriados para consumo. Outro método, como a espectroscopia de Raman amplificada por superfície (do inglês, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS) baseia-se no facto das nanopartículas de ouro serem consideradas substratos e permitirem a medição das energias vibracionais das ligações químicas. Esta estratégia pode também ser utilizada para a detecção de proteínas, poluentes e outras moléculas. [20] A superfície das nanopartículas pode ser funcionalizada com inúmeras moléculas químicas e bioquímicas que permitam a ligação a moléculas orgânicas como os anticorpos, sendo possível utilizá-las como biossensores. [21]

5. Sondas - As nanopartículas de ouro também dispersam a luz e podem produzir uma interessante variedade de cores visíveis na microscopia de campo escuro. As cores dispersas são actualmente utilizadas para aplicações em imagiologia biológica. Além disso, as nanopartículas de ouro são relativamente densas, o que as torna úteis como sondas na microscopia electrónica de transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscope*, TEM). [22]

6. Diagnóstico – As nanopartículas de ouro são também utilizadas como biomarcadores no diagnóstico de doenças cardíacas, cancro e agentes infecciosos. É frequente existirem também em imunoensaios, como por exemplo, nos testes de gravidez comuns utilizados em casa. [23]

7. Catálise - As nanopartículas de ouro são utilizados como catalisadores em várias reacções químicas. A superfície de uma nanopartícula de ouro pode ser utilizada para oxidação selectiva ou em certos casos, pode provocar a reacção oposta, ou seja, uma reacção de redução (óxidos de azoto, NO_x). Têm sido feitos esforços no sentido de utilizar as nanopartículas de ouro como *fuel cells*. Uma *fuel cell* é um dispositivo que converte energia química de um combustível em electricidade através de uma reacção química com oxigénio ou outro agente oxidante. Estas tecnologias seriam úteis sobretudo na indústria automóvel. [24]

Capítulo 3

Métodos de caracterização das nanopartículas

A obtenção de imagens de nanomateriais é essencial para a nanociência e para a nanotecnologia. Actualmente existe uma variedade de instrumentos de alta tecnologia que permitem ver objectos à nanoescala. Na verdade, foi com a invenção destes instrumentos que abriram realmente as portas para o mundo nano. Uma vez que os cientistas foram capazes de observar, analisar, entender e imaginar formas de manipular objectos à nanoescala. [25]

De forma geral, existem dois tipos fundamentais de métodos de caracterização de nanopartículas: imagiologia por microscopia e análise por espectroscopia.

3.1. Microscopia

Um microscópio óptico utiliza luz visível, ou seja, radiação electromagnética, e um sistema de lentes para ampliar. O microscópio óptico é o tipo de microscópio mais antigo e mais simples. Este apresenta um limite de resolução que é imposto pelo comprimento de onda da luz visível, uma vez que de forma geral, a resolução é cerca de metade do comprimento de onda utilizado na medição. Deste modo, como o comprimento de onda da luz visível varia entre 400 e 700 nm, a resolução do microscópio óptico é de cerca de 200 nm. Assim, para que dois objectos sejam distinguíveis no microscópio óptico, é necessário que estes estejam separados por pelo menos 200 nm. Um objecto inferior a este limite não é distinguível. Este fenómeno é conhecido como o limite de difracção da luz visível.

De modo a superar as limitações impostas pelo limite de difracção da luz visível, foram criados microscópios que utilizam outros tipos de feixe, como é o caso do microscópio electrónico, que utiliza electrões (Figura 9). Existem diversos tipos de microscópios electrónicos, tais como o microscópio electrónico de transmissão (TEM) ou o microscópio electrónico de varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscope*, SEM). Os microscópios electrónicos têm um poder de resolução e ampliação muito superior relativamente aos microscópios ópticos, devido ao comprimento de onda do electrão ser muito menor do que o do fotão da luz visível.

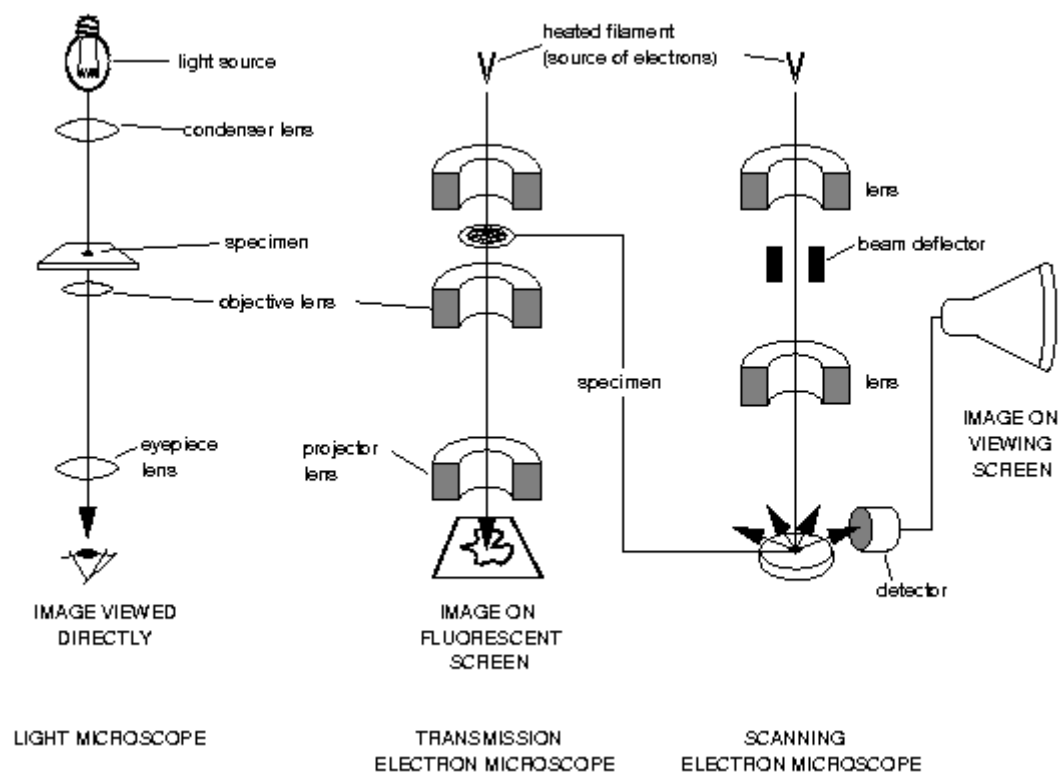


Figura 9: Microscópio óptico, microscópio electrónico de transmissão e microscópio electrónico de varrimento (da esquerda para a direita, respectivamente). [45]

A obtenção de imagens com resolução ao nível atómico da geometria e electrónica da estrutura das superfícies foi possível com a criação do microscópio electrónico de varrimento por efeito túnel (do inglês, *Scanning Tunnelling Microscope*, STM). Este microscópio é utilizado para a visualização de átomos. [26]

3.1.1. Microscópio electrónico de varrimento por tunelamento

O STM é uma ferramenta fundamental na nanociência e na nanotecnologia. É utilizado em pesquisas onde são necessárias imagens à escala atómica de superfícies metálicas e semicondutoras, fornecendo perfis tridimensionais da rugosidade das superfícies, permitindo observar defeitos nestas e determinar as dimensões e a conformação das moléculas.

O STM é constituído por uma ponta condutora muito fina terminando em poucos átomos, com um comprimento de cerca de 3 nm. Uma ponta condutora que termine num único átomo fornecerá a melhor resolução (Figura 10). Esta pode ser, por exemplo, de metal, normalmente de tungsténio. É colocada muito próxima (a menos de 0,1 nm) da superfície condutora ou semicondutora a ser analisada: quando estas se aproximam muito, mas sem se tocarem, ocorre uma polarização (diferença de voltagem) entre os dois átomos, um da ponta e outro da superfície, permitindo a transferência de electrões, ou seja, de uma corrente, da superfície para a ponta metálica. Esta corrente de tunelamento pode ser medida e corresponde à função da densidade electrónica (ou de electrões) na superfície. A densidade electrónica é a probabilidade de encontrar um electrão num determinado lugar. Existe uma alta densidade electrónica em torno de átomos e ligações entre moléculas.

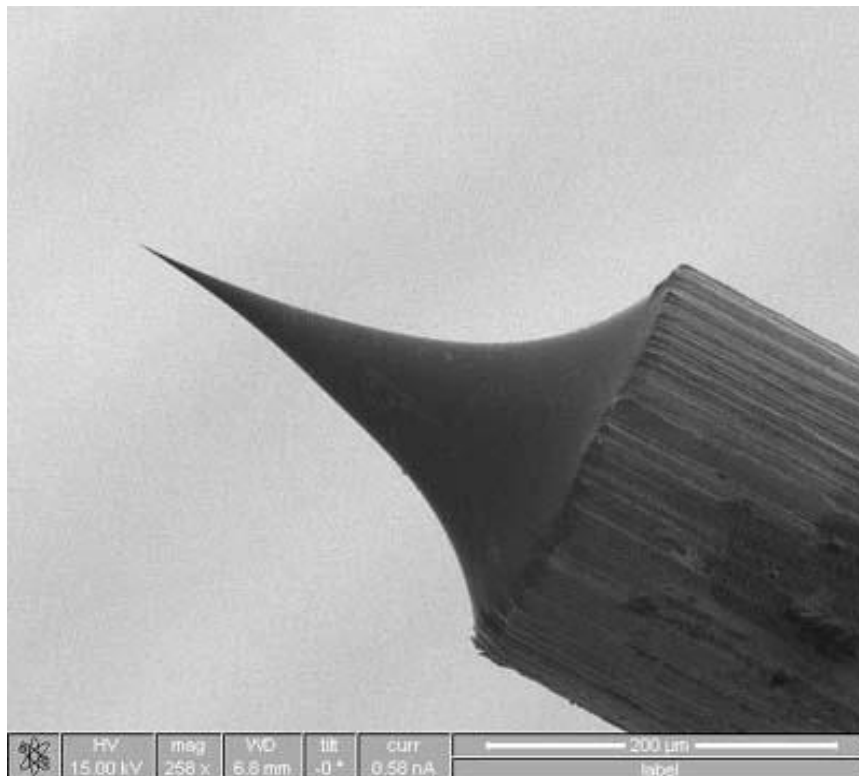


Figura 10: Imagem de uma ponta de tungstênio de um STM obtida através de um SEM. [46]

As variações de corrente à medida que a ponta metálica, que é controlada por um piezomotor, passa linha por linha sobre a superfície permitem recriar a imagem da superfície em questão. Como tal, o STM tem a capacidade de criar imagens detalhadas de uma amostra em 3D com resolução ao nível atômico, pois as pequenas alterações na distância entre a ponta e a superfície traduzem-se em grandes alterações na corrente de tunelamento (Figura 11). Isto significa que a resolução é tão elevada que é possível ver e distinguir átomos individualmente uns dos outros na superfície. [27]

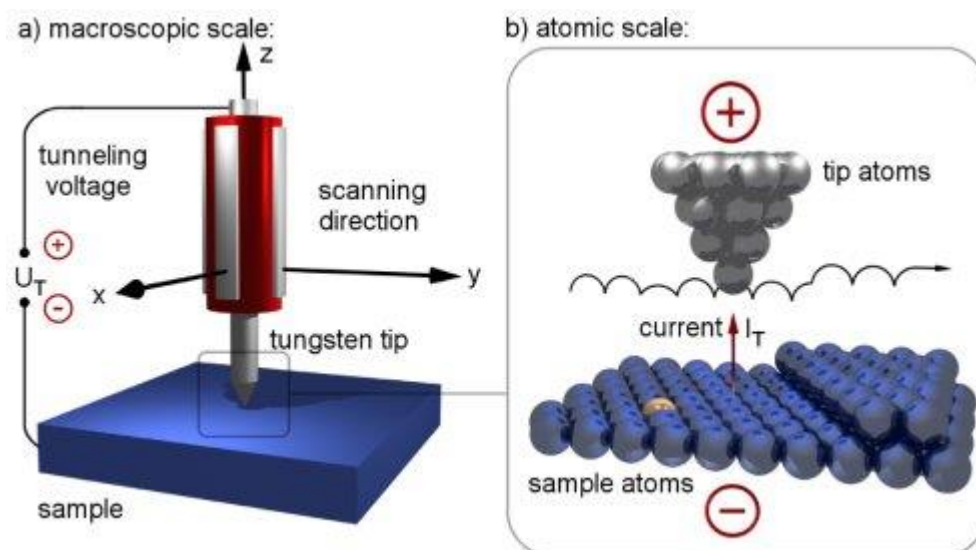


Figura 11: Funcionamento do STM. [49]

Uma maneira de utilizar o STM sobre uma superfície é manter uma corrente de tunelamento constante de tipicamente nA, ou seja, 10^{-9} A. Ao manter esta corrente constante, a ponta mantém uma determinada distância da superfície da amostra. Ao percorrer os átomos da superfície a ponta sobe quando percorre um átomo da superfície da amostra (Figura 12) e baixa quando se encontra entre dois átomos.

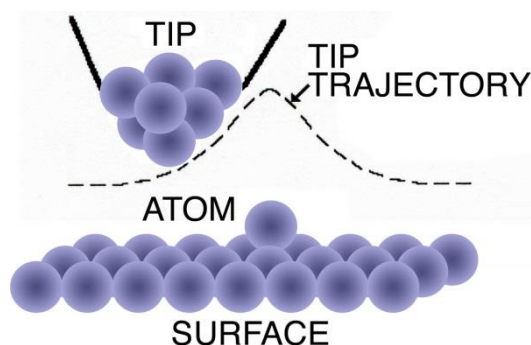


Figura 12: Movimento da ponta sobre a superfície. [27]

O movimento da ponta pode ser transformado num mapa de cor da superfície, onde cada cor corresponde a uma altura específica. As superfícies são digitalizadas através de pequenos movimentos de 0,1 nm da ponta, o que confere uma representação muito precisa da superfície. Para que a técnica funcione é necessário que à medida que a ponta percorre a superfície o fluxo de tunelamento seja induzido. Assim, a superfície deve ser condutora ou semicondutora. Para digitalizar superfícies que não são electricamente condutoras, estas podem ser revestidas por uma camada muito fina de material condutor, como por exemplo o ouro. Isto, no entanto, implica que esta técnica seja menos adequada nalguns estudos, como por exemplo, para estudar moléculas biológicas como o DNA ou as proteínas (que não são condutoras). Para estes tipos de amostras existem outras técnicas mais adequadas, tal como a utilizada no microscópio de força atómica (do inglês, *Atomic Force Microscope*, AFM). [25]

3.1.2. Microscópio de Força Atómica

O AFM não mede a corrente de tunelamento, mas sim a força de interação (atractiva ou repulsiva) entre a ponta e a superfície e, portanto, não requer que a superfície seja condutora. Foi desenvolvido especificamente para recriar imagens de materiais isoladores.

Este microscópio, contrariamente ao STM, funciona no ar e não em vácuo. Além disso, algumas versões deste tipo de microscópio funcionam mesmo em água.

Neste tipo de microscópio a ponta encontra-se na extremidade livre de um braço de suporte muito flexível (também conhecido por *cantilever*); um sistema óptico detecta a deflexão de um feixe de laser que faz ricochete nas “costas” do *cantilever*, reportando assim as flutuações do *cantilever*, que são proporcionais à força aplicada. A ponta do *cantilever* move-se continuamente sobre a superfície da amostra e as deflexões do *cantilever* são monitorizadas constantemente. De modo a manter a força aplicada constante, existe um circuito de feedback que altera continuamente a altura

da ponta do *cantilever* sobre a superfície. O movimento vertical da ponta é registado para criar um mapa topográfico da superfície da amostra (Figura 13).

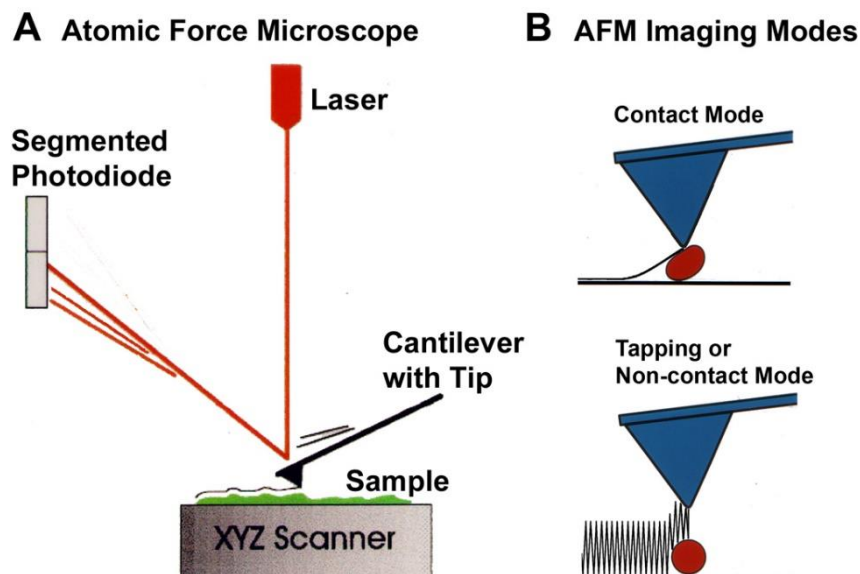


Figura 13: Diagrama do funcionamento geral do AFM (A); Diagrama dos modos dinâmicos de funcionamento do AFM (B). [50]

A ponta do *cantilever* é muito afiada e com um raio de curvatura nas dezenas de nanómetros. Se a superfície em análise for maleável, a ponta do *cantilever* pode penetrá-la correndo-se o risco de a danificar e degradar a resolução espacial da micrografia resultante. Deste modo, surgiram modos dinâmicos de funcionamento, onde a ponta do *cantilever* não se arrasta simplesmente pela superfície, oscilando verticalmente enquanto digitaliza a superfície (Figura 13.B). Assim, é possível reduzir os danos induzidos pela ponta do *cantilever* nas amostras, sendo deste modo possível a análise de amostras compressíveis e maleáveis, tais como biomoléculas e células.

Por outro lado, a ponta do *cantilever* pode ser utilizado com a intenção de “riscar” e remover algumas moléculas da superfície ou mesmo para deixar impresso alguma marca. A esta técnica dá-se o nome de Nanolitografia *Dip Pen* (do inglês, *Dip Pen Nanolithography*, DPN). [25]

3.2. Métodos espectroscópicos

A espectroscopia é o termo geral para a ciência que lida com os vários tipos de interações (absorção, dispersão, etc) entre a radiação e a matéria. [28] Através dos espectros produzidos na interação da radiação electromagnética com a matéria é possível inferir muita informação.

Os métodos de espectroscopia que são mais relevantes na caracterização de nanomateriais (partículas e superfícies) são os raios-X, absorção e emissão plasmão UV-Visível, dispersão da luz pela ressonância do plasmão e dispersão de Raman amplificada por superfície. [25]

3.2.1. Métodos por Raios-X

Os métodos por raios-X envolvem a excitação de uma amostra com raios-X ou com electrões que resultam na produção de raios-X adicionais. Existem diversos métodos que utilizam raios-X: fluorescência de raios-X (FRX), difracção de raios-X (DRX), etc.

No âmbito dos nanomateriais o método mais importante é o da dispersão de raios-X de pequenos ângulos (SAXS). Na DRX, apenas materiais cristalinos podem ser visualizados, não sendo o caso dos nanomateriais que apresentam um estado aproximadamente policristalino. Enquanto que a SAXS pode analisar partículas da ordem de 1-100 nm. O método pode ser utilizado para analisar pós no estado seco ou em suspensão num meio. O método pode também ser utilizado para medir o tamanho de nanopartículas. [25]

3.2.2. Absorção e Emissão do Plasmão no Ultravioleta-Infravermelho

Como referido no capítulo anterior, as nanopartículas metálicas são caracterizadas por uma absorção de radiação electromagnética resultante na ressonância do plasmão da qual origina soluções com cores diferentes. Por exemplo, a banda de plasmão de uma nanopartícula de prata de 20 nm centra-se nos 395 nm, resultando uma solução amarela, enquanto que em nanopartículas de ouro de também 20 nm esta centra-se nos 520 nm, resultando num colóide de cor vermelha. O efeito da ressonância do plasmão corre em partículas até aproximadamente 50 nm de diâmetro. A absorção da radiação electromagnética pode ser na zona do ultravioleta ao infravermelho do espectro. As partículas podem ser visualizadas pela absorvância em solução com concentrações nanomolares e picomolares. [25]

3.2.3. Dispersão da luz pela ressonância de plasmão

Em nanopartículas metálicas maiores (> 30 nm) observa-se outro efeito, a dispersão da luz. Quando nanopartículas metálicas entre 50-120 nm de diâmetro são iluminadas com luz branca, ou seja fotões, sendo que esta dispersa originando uma cor específica de acordo com a frequência da ressonância de plasmão de superfície (ver Secção 2.2.). Este efeito é designado por dispersão da luz pela ressonância de *plasmão* (do inglês, *Plasmon Resonance Light Scattering*, PRLS). A dispersão de luz varia de acordo com o volume da partícula, mas a luz dispersa pode ser detectada a muito mais baixas concentrações do que a luz absorvida. Por exemplo, a luz dispersa por um colóide de partículas de ouro de 80 nm é detectável até uma concentração de 5 femtomolar ou fM ($\text{fM} = 10^{-15} \text{ M} = 10^{-15} \text{ mol/dm}^3$). Por este motivo as nanopartículas metálicas são materiais interessantes para se utilizarem em técnicas onde se fazem divisões em classes ou grupos (como a técnica de *microarray*). [25]

3.2.4. Dispersão de Raman amplificada por superfície (SERS)

Quando um fotão incide num material com energia muito superior à energia de separação entre os níveis vibracionais/rotacionais das moléculas constituintes do material, o fotão pode ser disperso elasticamente ou inelasticamente por estas. Normalmente, a maioria dos fotões sofre dispersão elástica, em que os fotões emitidos apresentam a mesma energia que os fotões iniciais (dispersão de Rayleigh). Contudo, uma pequena fracção dos fotões sofre dispersão inelástica devido

a uma excitação no átomo ou molécula que incidiu. Neste caso, ocorre a emissão de fótons com energia ligeiramente diferente relativamente à energia dos fótons iniciais (dispersão de Raman). [29]

As superfícies metálicas que apresentam rugosidade à escala nanométrica têm a propriedade de amplificar os sinais de dispersão de Raman das moléculas iluminadas. Este efeito deve-se a factores químicos e electromagnéticos, bem como ao aumento da área de superfície. O que é importante é que o efeito da SERS pode induzir um aumento do sinal até 10^8 vezes. O sinal da SERS depende das características do nano-substrato: o tamanho, a forma, a orientação e a composição da superfície nano-rugosa. Avanços na tecnologia SERS permitirão a detecção ao nível do attomole (10^{-18} mol) e a detecção de uma única molécula. [25]

3.3. Métodos de caracterização não-radiativos e não-electrónicos

Existem diversos métodos para caracterizar nanomateriais que não recorrem à utilização de radiação electromagnética. Estes incluem métodos para determinar o tamanho da partícula, a sua área de superfície e a sua porosidade; os métodos termodinâmicos (como a análise termogravimétrica, do inglês *Thermogravimetric analysis*, TGA) para avaliar a dependência da temperatura do nanomaterial (fusão, etc.); e a espectroscopia de massa para determinar a composição química do nanomaterial. Um método de superfície importante é a microbalança de cristais de quartzo (QCM), que consegue medir alterações de massa muito pequenas (poucos nanogramas por centímetro quadrado). Esta é sensível o suficiente para detectar monocamadas de materiais depositados. Pode ser utilizada para medir a quantidade de metal depositado numa superfície depois da pulverização catódica ou evaporação, ou ainda para medir a quantidade de proteína absorvida sobre uma superfície. Devido a esta grande sensibilidade, a QCM é usada na criação de biossensores. [25]

Capítulo 4

Metodologia

O principal objectivo do trabalho aqui exposto prende-se com a monitorização do processo de síntese de nanopartículas de ouro em tempo real, bem como a sua monitorização quando irradiadas por radiação laser com comprimento de onda de 808 nm. Durante o processo de síntese, parâmetros como a temperatura e cor da solução são fundamentais para garantir determinadas características e qualidade das nanopartículas produzidas. Do mesmo modo, a monitorização da temperatura das nanopartículas submetidas a radiação laser, é importante para perceber a temperatura a que estas se elevam para que ocorra libertação do corante que se encontra no polímero que as reveste.

Assim, neste capítulo, encontra-se apresentada a metodologia utilizada na concretização do objectivo da presente dissertação. Nas páginas que se seguem encontra-se a descrição de todo o material utilizado para a produção do dispositivo apresentado neste trabalho, assim como a calibração dos seus dois componentes principais, um termómetro de infravermelhos e uma *webcam*. Aqui encontra-se também descrita a metodologia utilizada no sentido de colocar o dispositivo a detectar a cor da solução durante as várias etapas da síntese das nanopartículas de ouro, assim como, a temperatura, que também foi medida quando as nanopartículas de ouro foram submetidas a radiação laser.

4.1. Descrição dos componentes do dispositivo

No presente trabalho foram utilizados diversos materiais e *softwares*, os quais se encontram descritos na seguinte tabela:

Materiais	Quantidade	Características
Termómetro de infravermelhos	1	Modelo MLX90614BAA
Arduino	1	UNO Modelo R3
<i>Breadboard</i>	1	Mini
<i>Jumper wires</i>	4	M/M
<i>Interconnector</i>	2	<i>Female header single row</i>
<i>IC socket</i>	5	<i>8 pins low profile</i>
Cabo	1	USB A/B
Resistência	2	4.7 k Ω
Condensador	1	0.1 μ F
<i>Webcam</i>	1	Modelo Q-19 8.0 Megapixel
Cartão preto	1	(8 x 5) cm ²
<i>Softwares</i>		
MATLAB	1	R2012b
<i>Fritzing</i>	1	-

Tabela 1: Materiais e *softwares* utilizados no desenvolvimento do dispositivo.

4.1.1. Webcam

A *webcam* (Figura 14) utilizada no dispositivo desenvolvido possui uma resolução de 8.0 Megapixel (ou 8000K píxeis), bem como um suporte giratório e amovível. Através dela obtém-se imagens coloridas e com alta resolução (640x480 ou superior). Com ela podem obter-se também vídeos com o formato 24-bit RGB. A *webcam* apresenta interface *webcam*-computador realiza-se via *Universal Serial Bus* (USB), compensação automática de cor, focagem manual e é isenta de controladores, isto é, não é necessário instalar controladores, basta ligá-la ao computador e está pronta a funcionar.



Figura 14: *Webcam* utilizada no presente trabalho.

4.1.2. Termómetro de Infravermelhos

O termómetro utilizado neste trabalho é digital e funciona através de radiação infravermelha sem contactar com a amostra. O modelo do termómetro escolhido foi o MLX90614ESF-BAA da *Melexis* (Figura 15). Este apresenta uma gama de absorção que varia entre os 2000 nm e os 15000 nm, que corresponde a radiação infravermelha, e tem a capacidade de medir temperaturas entre os -70 e os 380 °C.

O termómetro resulta da integração de um sensor de infravermelhos com um *chip* dedicado ao processamento de sinal num pequeno recipiente TO-39 que recorre à utilização da tecnologia “*Plug and Play*”, tal como a *webcam* descrita anteriormente. [30] A tecnologia “*Plug and Play*” traduz a habilidade de adicionar um novo componente a um sistema e este funcionar automaticamente sem ser necessário uma configuração técnica. [31]

Como referido, o termómetro de infravermelhos é composto por dois chips fabricados pela *Melexis*, o sensor de infravermelhos MLX81101 e o processador de sinal digital proveniente do sensor, MLX90302. Além disso, possui um amplificador de baixo ruído e um conversor analógico-digital, ADC, (do inglês, *Analog to Digital Converter*) de 17-bit. Apresenta ainda um filtro óptico que corta o fluxo da radiação visível e NIR para proporcionar imunidade à luz ambiente. A tensão de alimentação deste modelo de termómetro é de 3.3 volts.

A temperatura ambiente (ou do próprio termómetro) e a do objecto calculadas pelo termómetro encontram-se disponíveis na RAM (do inglês, *Random-Access Memory*) do seu processador de sinal digital (MLX90302) com uma resolução de 0,01 °C. Estas temperaturas são acessíveis através do SMBus (do inglês, *System Management Bus*) de acordo com o protocolo de barramento em série com dois fios (0,02°C de resolução).



Figura 15: Termómetro de infravermelhos utilizado no presente trabalho. [44]

4.1.2.1. SMBus

O SMBus é uma interface de dois fios através da qual vários chips de componentes de um sistema podem comunicar entre si e com o resto do sistema, baseando-se nos princípios de funcionamento do protocolo I²C (do inglês, *Inter-Integrated Circuit*). O SMBus proporciona o controlo do barramento para que o sistema transmita mensagens de e para os dispositivos em vez de usar linhas de controlo individuais, ajudando a reduzir a quantidade de *pins* e fios no sistema. [32] Esta interface é utilizada pelo termómetro descrito no presente trabalho.

Cada dispositivo conectado ao barramento pode ser acessível através de um endereço único, podendo ser ainda activo ou passivo. Dispositivos que tomam a iniciativa para começar uma transferência no barramento denominam-se activos ou mestres. Por outro lado, os dispositivos que ficam à espera da solicitação de outro para fazer a transferência denominam-se passivos ou escravos. O termómetro MLX90614 apenas pode ser utilizado como dispositivo passivo.

A um segmento SMBus podem ser conectados diversos dispositivos, quer sejam activos ou passivos. Geralmente, um dispositivo activo inicia uma transferência entre ele e um só dispositivo passivo, fornecendo sinais de relógio, mas pode dar início a operações com vários dispositivos passivos simultaneamente. Um dispositivo de barramento passivo pode receber dados fornecidos pelo dispositivo activo, mas também lhe pode fornecer dados. A qualquer momento apenas um dispositivo pode ser o activo. Como tal, o SMBus consegue detectar colisões de informação e possui um método de arbitragem (função *wired-AND*) para prevenir que mais do que um dispositivo tente assumir o controlo do barramento como dispositivo activo. As transferências de informação são feitas em série, sob a forma de 8 bits bi-direccionalmente, podendo atingir a velocidade de 100 kbit/s. [33]

As duas linhas de barramento existentes no termómetro correspondem à linha de dados em série (do inglês, *Serial Data*, SDA) e à linha do relógio em série (do inglês, *Serial Clock*, SCL). A SCL é uma entrada digital que é utilizada como relógio para a comunicação por SMBus. Por outro lado, a SDA pode constituir uma entrada ou saída digital. Ambas as linhas bi-direccionais se ligam a uma fonte de corrente através de resistências (resistências de *pull-up*) ou de uma fonte de corrente ou outro circuito semelhante, de forma a controlar se os seus valores são altos (valor lógico '1') ou baixos (valor lógico '0'). Quando o barramento está livre, ambas as linhas SDA e SCL apresentam o valor lógico 1. [33]

4.1.2.2. Transferência de informação

De acordo com as especificações do SMBus, o *bit* mais significativo (do inglês, *Most Significant Bit*, MSB) vem em primeiro lugar e utiliza níveis específicos e fixos de tensão para definir os valores lógicos '0' e '1' no barramento. Os dados na SDA devem manter o mesmo estado durante os períodos em que o SCL está "alto", podendo mudar de estado somente quando o SCL está "baixo". Cada transferência começa com o *START bit* e termina com o *STOP bit* (Figura 16). [34]

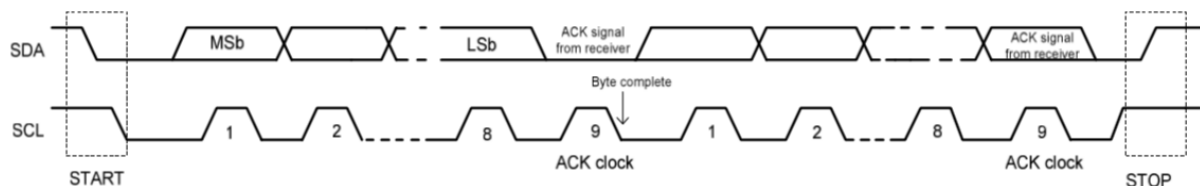


Figura 16: Formato de um *byte* no SMBus. ACK (do inglês, *ACKnowledgement from receiver*); NACK (do inglês, *Not ACKnowledgement from receiver*); MSb (do inglês, *the Most Significant bit*); LSb (do inglês, *the Last Significant bit*); SDA (do inglês, *Serial Data*); SCL (do inglês, *Serial Clock*). [34]

O *STAR bit* provoca uma transição do valor "alto" para "baixo" do SDA, enquanto o SCL está "alto". Por outro lado, o *STOP bit* provoca uma transição do valor "baixo" para "alto" da SDA, enquanto o SCL está "alto".

Cada *byte* (8 *bits*) transferido no barramento deve ser seguido por um bit de reconhecimento, de forma a controlar possíveis erros. Um pulso de reconhecimento relacionado com o relógio é gerado pelo dispositivo activo (relógio ACK). O transmissor quer seja activo ou passivo, liberta a linha da SDA ("alta") durante o ciclo de reconhecimento do relógio. De modo a reconhecer um *byte*, o receptor deve colocar a linha da SDA "baixa" durante o período em que a linha do SCL está "alta" de acordo com as especificações de tempo do SMBus. Um receptor que deseje não reconhecer (NACK) um *byte* deve manter a linha da SDA "alta" durante o pulso de reconhecimento do relógio. Um dispositivo SMBus deve reconhecer (ACK) sempre o seu endereço.

Um dispositivo SMBus passivo pode decidir NACK um *byte*, desde que não seja um *byte* do tipo endereço nas seguintes situações:

- Caso o dispositivo passivo se encontre a executar uma tarefa em tempo real, ou caso os dados solicitados não estejam disponíveis. Após a detecção da condição NACK o dispositivo activo deve gerar uma condição de STOP para abortar a transferência. Note que, como alternativa, o dispositivo passivo pode estender o período do relógio no estado "baixo" dentro dos limites das especificações de forma a concluir as tarefas e continuar a transferência;
- Caso o dispositivo passivo detecte um comando ou dado inválido. Neste caso, o dispositivo passivo deve aplicar a condição NACK ao *byte* recebido. Após a detecção desta condição pelo dispositivo activo, deve ser gerada uma condição STOP pelo mesmo e repetida a transacção;
- Caso o dispositivo receptor activo estiver envolvido na transacção deve sinalizar o fim dos dados para o dispositivo transmissor passivo, gerando um NACK no último *byte* temporizado pelo dispositivo passivo. O dispositivo passivo transmissor deve libertar a linha de dados para permitir que o dispositivo activo gerar uma condição STOP.

4.1.2.3. TO-39 package

O termómetro MLX90614BAA apresenta o formato TO-39 *package* (Figura 17). O termo TO (do inglês, *Transistor Outline*) é utilizado há várias décadas como padrão industrial que rege a construção e as dimensões da embalagem e do microcontrolador condutor de corrente e armazenamento. A embalagem TO é composta sempre por dois componentes: uma TO *header* e um TO *cap*. Enquanto a TO *header* garante que os componentes encapsulados são fornecidos com energia, a TO *cap* garante a transmissão suave de sinais ópticos. Isto inclui os transmissores (por exemplo, díodos de laser), bem como os receptores dos sinais ópticos (por exemplo, fotodíodos). [35]

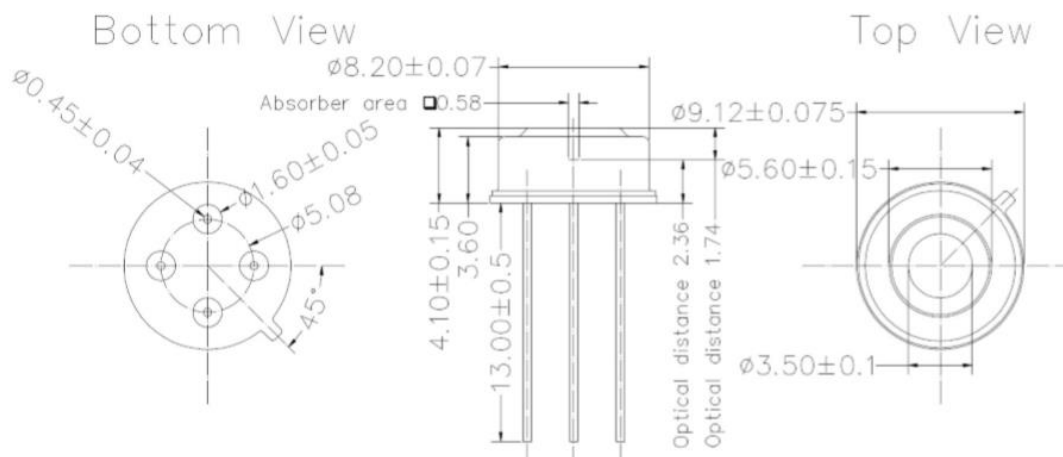


Figura 17: TO-39 *package* do termómetro de infravermelhos MLX90614BAA. [33]

4.1.2.4. Pins do termómetro

O termómetro MLX39614BAA apresenta 4 *pins* (Figura 18): o *pin* 1 possui a entrada do *Serial Clock* (SCL), o *pin* 2 a entrada do *Serial Data* (SDA), ou seja, o *input/output* digital, o *pin* 3 a tensão de alimentação externa (V_{DD}) e, por último, o *pin* 4 constitui o *ground* ou terra (V_{SS}).

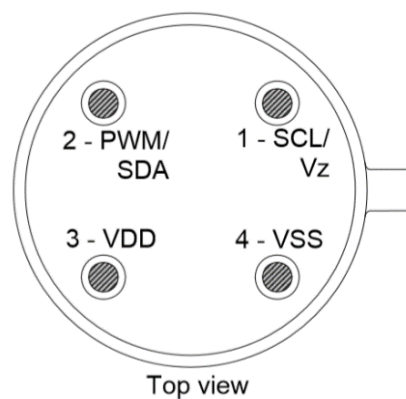


Figura 18: Vista superior dos *pins* do termómetro MLX90614BAA. SDA (do inglês, *Serial Data*); PWM (do inglês, *Pulse Width Modulated*); SCL (do inglês, *Serial Clock*); Vz (do inglês, *Zener Voltage*); VDD (do inglês, *Positive supply voltage*); VSS (do inglês, *Negative supply voltage/ Ground*). [33]

4.1.2.5. Valores máximos dos parâmetros de utilização

Parâmetro	MLX90614ESF-BAA
Tensão de alimentação, V_{DD} (sobretensão)	5 V
Tensão de alimentação, V_{DD} (funcionamento)	3.6 V
Tensão reversa	0.4 V
Intervalo de temperaturas de funcionamento, T_A	-40 ... +85 °C
Intervalo de temperaturas de armazenamento, T_S	-40 ... +125 °C
Sensibilidade da descarga electrostática	2kV
Corrente contínua para o SCL	2 mA
Corrente contínua dissipada, pin SDA	25 mA
Corrente contínua fornecida, pin SDA	
Corrente contínua <i>clamp</i> , pin SDA	
Corrente contínua <i>clamp</i> , pin SCL	

Tabela 2: Valores máximos absolutos dos parâmetros do termómetro de infravermelhos MLX90614ESF-BAA da Melexis. [33]

4.1.2.6. Campo de visão

A distância e as dimensões do alvo, ao qual se pretende medir a temperatura, são fundamentais para a precisão da maioria dos termómetros de infravermelhos. [36] O termo campo de visão (do inglês, *Field of View*, FOV) é utilizado em todos os instrumentos de infravermelhos e representa o ângulo através do qual um detector recebe radiação electromagnética, neste caso, radiação infravermelha. [37] Deste modo, o valor medido por um termómetro de infravermelhos corresponderá à temperatura média de todos os objectos que se encontrem no seu campo de visão.

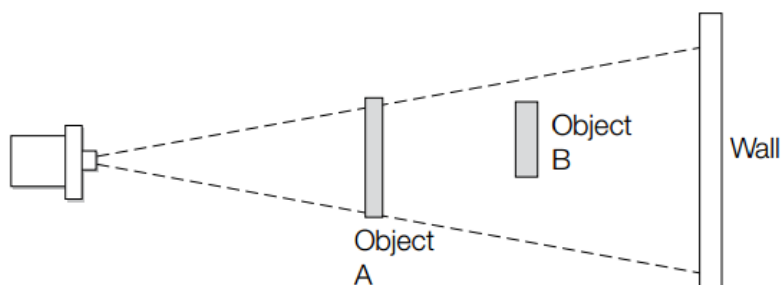


Figura 19: Campo de visão de um instrumento. [36]

Recorrendo ao exemplo da Figura 19, observamos que o objecto A preenche o campo de visão do sensor, logo a única temperatura que o sensor detecta é a do objecto, de modo que a temperatura do objecto será indicada com precisão. Relativamente ao exemplo do objecto B, ou seja, removendo o objecto A, observamos que este se encontra a uma maior distância do termómetro, não ocupando todo o campo de visão, o que permite ao termómetro medir também a temperatura da parede (*Wall*, respectivamente). Deste modo, o termómetro indicará uma temperatura média resultante da influência do objecto B e da parede. Caso se pretenda obter a temperatura do objecto B, deve acontecer uma das seguintes situações:

1. Aproximar o objecto *B* ao termómetro ou vice-versa;
2. Aumentar/substituir o objecto *B* de modo a que este preencha todo o campo de visão do termómetro;
3. Diminuir o compensador de emissividade para compensar a perda de energia devida à emissividade do objecto ser inferior a 1;
4. Arranjar um termómetro com um campo de visão menor.

O campo de visão é descrito por uma relação entre a distância objecto-sensor (*D*), as dimensões do objecto (*S*) e pelo ângulo da FOV (FOV), da seguinte forma:

$$S = \frac{D}{\tan\left(\frac{FOV}{2}\right)} \Leftrightarrow D = S \times \tan\left(\frac{FOV}{2}\right)$$

O modelo do termómetro de infravermelhos utilizado neste trabalho apresenta uma FOV de 90º (Figura 20). [33]

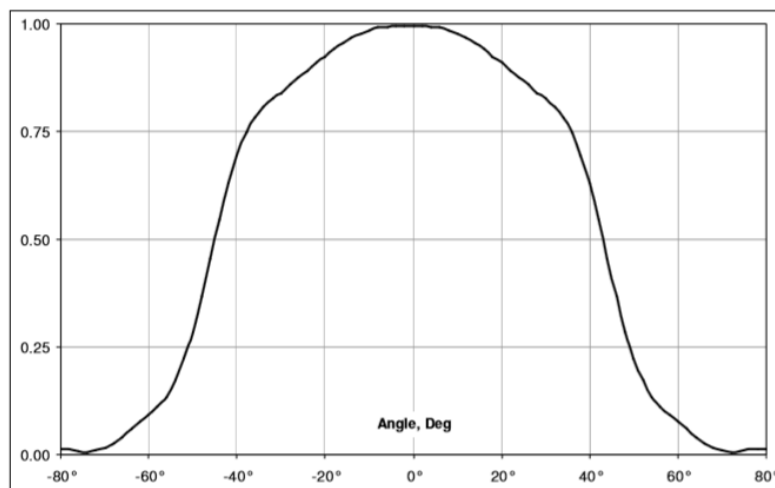


Figura 20: Gráfico do campo de visão (FOV) do termómetro MLX90614BAA. [33]

Logo, sabendo que a $\tan(45^\circ)$ é 1, a distância (*D*) a que se deve colocar o termómetro da amostra é dada por,

$$D = S \times \tan(45^\circ) \Leftrightarrow D = S$$

Ou seja, para que se avalie a temperatura de um objecto com precisão através deste modelo de termómetro de infravermelhos, as dimensões do objecto têm de se igualar à distância objecto-termómetro.

4.1.3. Arduino UNO

O Arduino é uma plataforma *open-source* de prototipagem electrónica com base numa flexível e fácil utilização de *hardware* e *software*. Destina-se a artistas, *designers*, inventores ou para

qualquer pessoa interessada em criar objectos ou ambientes interactivos. [38] O Arduino utilizado no presente trabalho foi o Arduino UNO, nomeadamente, o modelo R3 (ver Figuras 21 e 22).

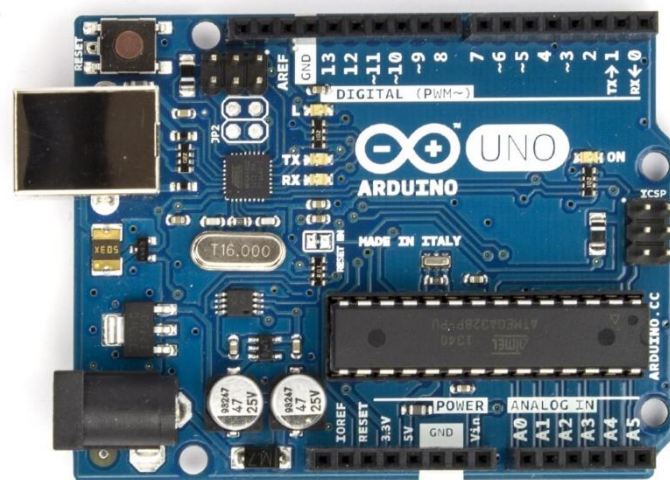


Figura 21: Arduino UNO modelo R3 visto superiormente. [51]

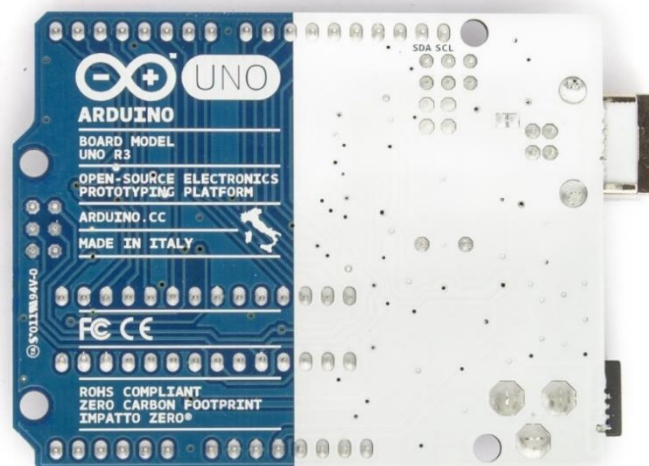


Figura 22: Arduino UNO modelo R3 visto inferiormente. [52]

4.1.4. Montagem dos componentes do dispositivo

Como referido anteriormente, os principais componentes do dispositivo são a *webcam* e o termómetro de infravermelhos MLX90614 e, como tal, é necessário proceder às suas respectivas montagens.

Para a incorporação da *webcam* no dispositivo foi necessário apenas um cabo USB de forma a conectá-la ao computador e, por sua vez, ao MATLAB.

Por outro lado, para a incorporação do termómetro de infravermelhos no dispositivo foram necessários diversos outros componentes de acordo com a informação fornecida pela Melexis [33] (Figura 23) e pela Empresa NanoSatisfi. [39] Assim, ao *Arduino UNO* ligou-se a *mini breadboard* (Figura 24) com o termómetro, as duas resistências, o condensador e 4 *jumper wires* (Figura 25).

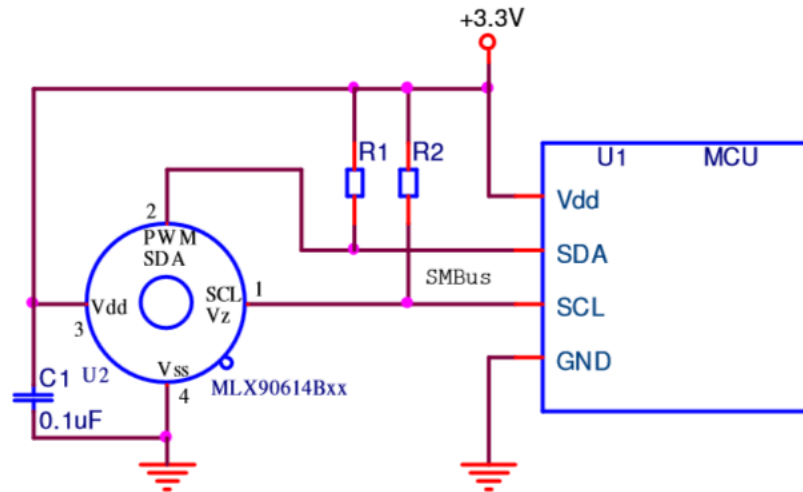


Figura 23: Esquema de montagem do termómetro, das resistências (R1 e R2), do condensador e do *Arduino UNO* (representado por MCU). [33]

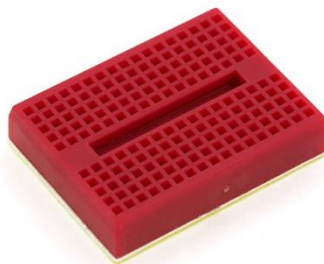


Figura 24: *Mini-breadboard* de dimensões (3.3x4.3) cm² utilizada no presente trabalho. [53]

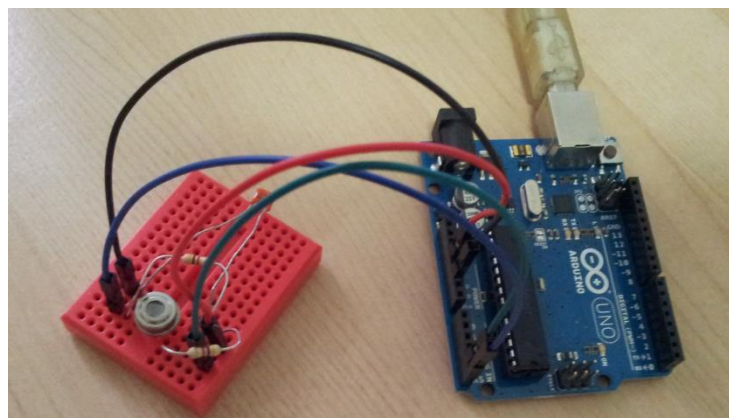


Figura 25: Montagem do *Arduino UNO* à *mini-breadboard* com o termómetro MLX90614.

Como o termómetro MLX90614 é um dispositivo misto com sensores, baixo sinal, parte analógica, parte digital e circuitos I/O, é necessário um condensador de 0,1 µF entre o V_{dd} e o *ground* (V_{ss}), à semelhança da maioria dos circuitos integrados. Este tem a função de manter o ruído da

fonte de alimentação baixo, visto que a restante parte do circuito pode contribuir com muito ruído influenciando o nível de ruído do termómetro. [33]

As resistências entre o SDA, o SCL e a fonte de alimentação (V_{dd}) surgem na montagem para evitar problemas de EMC (do inglês, *Electromagnetic Compatibility*), de ruído, de degradação do nível e dissipação de energia. Como se encontram conectadas à fonte de alimentação estas resistências designam-se de resistências *pull-up* e permitem que os estados dos pins correspondentes apresentem sempre um dos dois valores lógicos possíveis. [40]

Posteriormente, surgiu a necessidade de construir um suporte mais estável para o termómetro, bem como aumentar a sua aproximação ao objecto alvo, de modo a melhorar a sua estabilidade na montagem e evitar danos nos restantes componentes devido às elevadas temperaturas a que são submetidos, respectivamente. Deste modo, colocou-se silicone a unir a mini-breadboard ao Arduino UNO, para aumentar a estabilidade, e acrescentaram-se 5 *IC sockets* e 2 *interconnecters* entre o termómetro e a mini-breadboard para a aproximação ao objecto alvo (Figura 26 e 27).

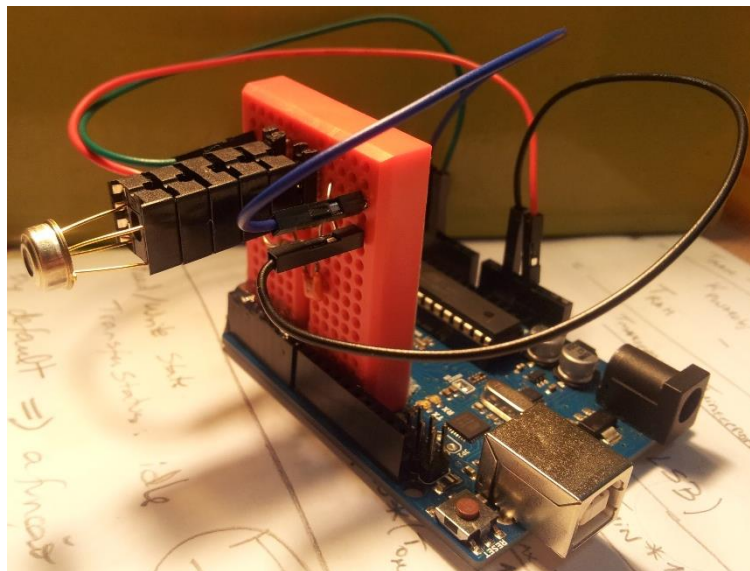


Figura 26: Termómetro MLX90614 e respectiva ligação à mini-breadboard (5 *IC sockets* e 2 *Interconnecters*); Mini-breadboard e respectiva ligação ao Arduino UNO (silicone).

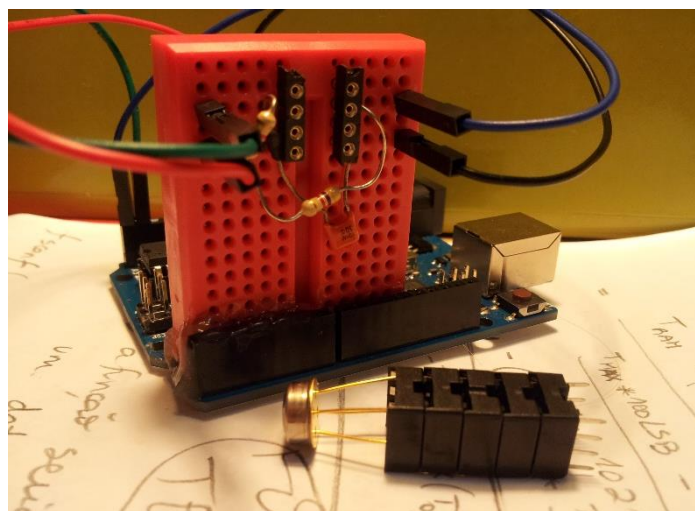


Figura 27: Termómetro MLX90614 e respectivos *IC sockets* desacoplados da mini-breadboard com os 2 *interconnecters*.

4.2. Descrição do Software

Ao longo do presente trabalho foi necessária a utilização de alguns *softwares* de forma a cumprir todos os objectivos propostos. Inicialmente, na fase de preparação e montagem do dispositivo recorreu-se à utilização do *software Fritzing*, mas o principal *software* utilizado foi o MATLAB R2012b. Através deste, construíram-se diversos algoritmos computacionais. Uma parte dos algoritmos foi criada de forma a conseguir-se a captura de imagens (.TIFF) a partir da filmagem da *webcam* em tempo real, às quais foram feitas análises de cor segundo os três canais de cor, vermelho, verde e azul, (do inglês, *Red Green Blue*, RGB) de cada pixel das imagens. Enquanto que a outra parte dos algoritmos criados no MATLAB, foram produzidos e utilizados para se conseguir fazer medições de temperaturas em tempo real, em graus Celsius, recorrendo-se a um termómetro de infravermelhos, apresentando-as sob a forma de um gráfico. Foi ainda utilizado o *Microsoft Office Excel* para o cálculo das rectas de calibração que posteriormente foram introduzidas no algoritmo de implementação do termómetro de infravermelhos.

4.2.1. Fritzing

O *software Fritzing* é uma iniciativa *open source* gratuita que permite aos designers, investigadores, entre outros, documentar e projectar os seus protótipos, sendo possível partilhá-los com outros utilizadores do *software*. O *software* pode ser utilizado para ensinar ou para criar um *layout* de uma placa de circuito impresso (do inglês, *Printed Circuit Board*, PCB). Uma vez construído o circuito na *breadboard*, este pode ser transferido para o *Fritzing*. [41] Desta forma, elaborou-se o respectivo esquema de montagem (Figura 28) utilizado neste projecto, mostrando a ligação estabelecida com os *jumper wires* entre o Arduino UNO e a mini *breadboard* com o termómetro de infravermelhos, as duas resistências e o condensador.

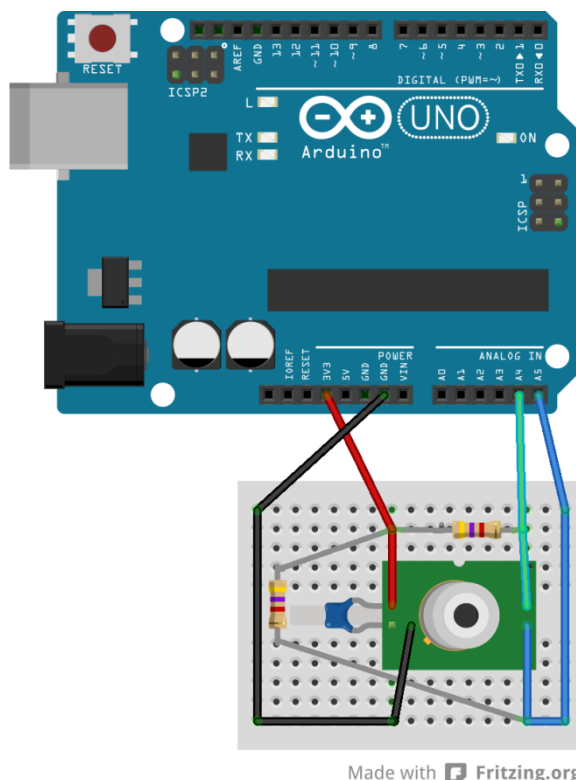


Figura 28: Esquema de montagem do Arduino UNO à mini *breadboard* com o termómetro de infravermelhos e restantes componentes (duas resistências e um condensador).

4.2.2. Interface gráfica do dispositivo (GUI)

O *software* MATLAB possui um tipo de interface do utilizador à qual damos o nome de interface gráfica do utilizador (do inglês, *Graphical User Interface*, GUI) (ver exemplo na Figura 29). Esta apresenta-se sob a forma de janela do tipo “Figura” do MATLAB e nela é possível colocar e manipular de forma interactiva, quer seja através do rato ou do teclado, elementos gráficos como botões, gráficos, imagens, textos, entre outras coisas. Por sua vez, quando se pretende criar uma GUI no MATLAB é necessário saber que esta apresenta dois passos principais: o primeiro passo engloba a parte do desenho do seu *layout*, enquanto que o segundo passo inclui todas as funções associadas a cada elemento gráfico colocado no *layout*, isto é, as funções *callback* que proporcionaram as acções desejadas pelo utilizador. Uma acção particular do utilizador da GUI, como pressionar um botão ou passar o cursor por um componente, acciona a execução do *callback* respectivo. É o criador da GUI que escreve o que se encontra nos *callbacks* que definem o que cada componente executa assim que é seleccionado. [42]

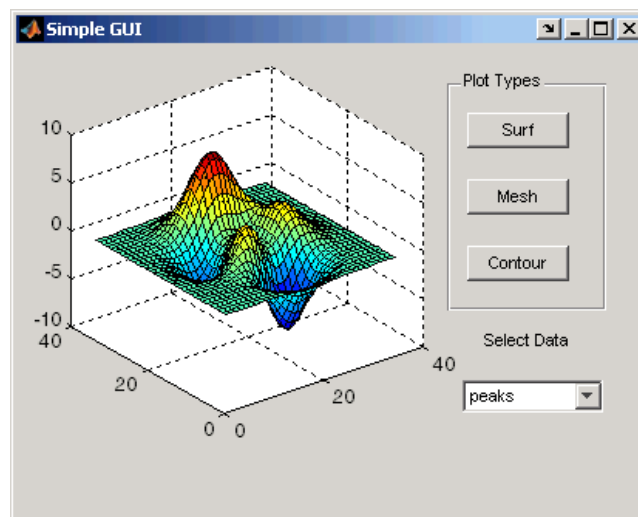


Figura 29: Exemplo de uma Interface Gráfica do Utilizador (GUI). [54]

De acordo com os objectivos propostos no presente trabalho, a GUI criada e testada através do MATLAB R2012b divide-se em três painéis principais (de acordo com a Figura 30 e o Anexo I): o primeiro painel (no canto superior esquerdo), cujo nome é “CAMERA & COLOR”, possui a filmagem da *webcam* (1), a imagem da filmagem (2) e a sua respectiva análise de cor (3), bem como os botões “Iniciar Webcam”, “Color/Temperature”, “STOP” e “Webcam Calibration”; o segundo painel (no canto inferior esquerdo), cujo nome é “TEMPERATURE”, corresponde ao parâmetro da temperatura do dispositivo possuindo o gráfico com a temperatura medida, bem como o botão de calibração do termómetro, “Thermometer Calibration”; finalmente, o terceiro painel (no canto superior direito), cujo nome é “INSTRUCTIONS”, apresenta indicações textuais com os principais passos para uma correcta utilização desta GUI.

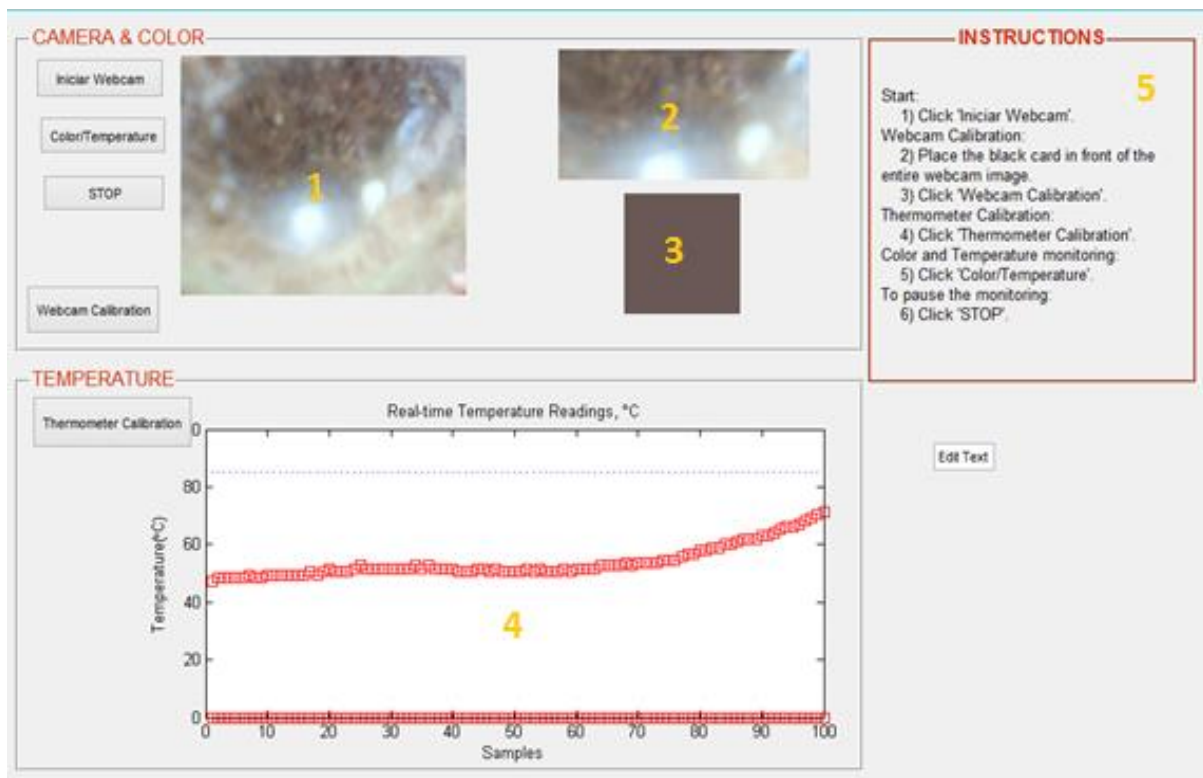


Figura 30: *Layout* da Interface Gráfica do Utilizador no MATLAB desenvolvida para o presente trabalho. De acordo com a Figura, o “1” corresponde ao *output* da *webcam*, o “2” à imagem capturada da filmagem em “1”, o “3” à cor resultante da imagem em “2”, o “4” ao gráfico da temperatura e o “5” ao painel de instruções da GUI para o utilizador.

4.2.3. Algoritmos desenvolvidos para o dispositivo

Os algoritmos foram desenvolvidos e testados num computador com 4.00 GB de RAM, com um processador *Intel® Core™ i5-2410M CPU @ 2.30 GHz*, a correr o sistema operativo *Windows 8.1 Pro*. O código dos algoritmos utilizados para o funcionamento do dispositivo encontram-se nos Anexos II, III, IV, V, VI, VII e VIII. O código descrito no Anexo II (GUI.m), representa a função principal do GUI, ou seja, onde se encontram todos os *callbacks*. Os *callbacks*, que possuem funções, de forma geral, dividem-se em algoritmos de funções para a implementação da *webcam* e em algoritmos para a implementação do termómetro de infravermelhos, respectivamente os Anexos III, IV, V e Anexos VI, VII, VIII.

4.2.3.1. Algoritmos de implementação da *webcam*

A função CAMERA.m (Anexo III) tem a função de iniciar a conexão entre o MATLAB e a *webcam*, retornando o vídeo da filmagem (Figura 30 (1)). A função CAM_Calibration.m (Anexo IV) foi utilizada para a calibração da *webcam*, da seguinte forma: após a colocação de um cartão preto em frente à *webcam* e posteriormente clicando-se no botão “*Webcam Calibration*” (Figura 30), uma imagem do cartão é captada, exibida e analisada relativamente à coloração. A análise da coloração inclui a selecção aleatória de 10 píxeis, cujos valores dos canais RGB ficam guardados, sob a forma de matrizes, para serem utilizados sempre que se realizar uma análise a cor de uma imagem. Os píxeis são escolhidos aleatoriamente da zona central da imagem, de modo a facilitar o

posicionamento da *webcam* pelo utilizador. Por último, e após a remoção do cartão preto, surge a função *ANALY_COLOR.m* (Anexo V). Esta tem a função de captar imagens ciclicamente, escolhendo também aleatoriamente 10 píxeis da zona central de cada, analisando os respectivos valores dos canais RGB, subtraindo-lhes, em seguida, os valores dos canais RGB obtidos na calibração, retornando a cor média calculada nos 10 píxeis.

4.2.3.2. Algoritmos de implementação do termómetro

A função *THERMOMETER.m* (Anexo VI) inicia-se com a instrução de leitura do termómetro conectado à porta USB (denominada COM3), com uma velocidade de transmissão da informação (ou *Baud rate*) de 9600 bits por segundo, guardando os valores por ele devolvidos. A função *THERM_Calibration* (Anexo VII), como o nome indica encarrega-se da calibração do termómetro. Para tal, esta utiliza as rectas de calibração desenvolvidas previamente e que são apresentadas na próxima secção. Por último, a função *THERM_PLOT.m* (Anexo VIII) produz o gráfico da temperatura obtida pelo termómetro e previamente calibrada em função do número de amostras medidas.

4.3. Calibração do Material

A calibração de um equipamento é fundamental para a obtenção de resultados com qualidade a partir do mesmo. A calibração previne variação nos resultados obtidos, garante compatibilidade das medições e prevenção de defeitos. Segundo a definição do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) a calibração corresponde à “operação que, em condições especificadas, num primeiro passo, estabelece a relação entre os valores da grandeza com incertezas de medição provenientes de padrões e as indicações correspondentes com incertezas de medição associadas e, num segundo passo, usa esta informação para estabelecer uma relação para obter o resultado de medição de uma indicação”. Acrescenta também que esta pode ser expressa num enunciado, numa função, num diagrama, numa curva ou numa tabela. Sendo que em alguns casos, a calibração pode consistir numa correcção aditiva ou multiplicativa da indicação com uma incerteza de medição associada (VIM – GUIA ISO/IEC 99:2007 – VERSÃO PORTUGUESA, Capítulo 2: Medição). [43]

Deste modo, sempre que se realizaram medições a partir do dispositivo todos os seus componentes foram previamente calibrados de forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos. Adicionalmente, e de forma a ajudar o utilizador, encontra-se descrito na interface gráfico do dispositivo (MATLAB - GUI) os principais passos a seguir para uma realização correcta do protocolo de calibração (Figura 31).

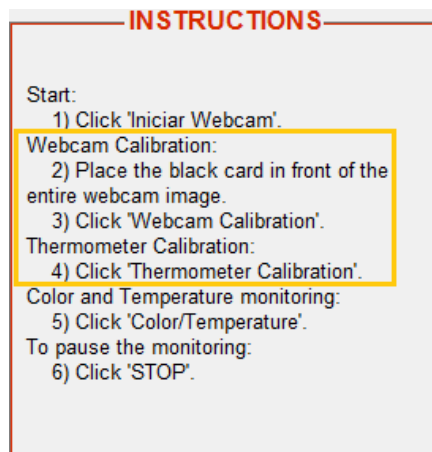


Figura 31: Painel de instruções da Interface Gráfica do Utilizador, com destaque (rectângulo amarelo) para os passos a seguir para a calibração dos componentes.

4.3.1. Calibração da Webcam

A calibração da *webcam*, que se realizou previamente a cada utilização da mesma, baseia-se na informação relativa aos três diferentes canais de cor (RGB) existente em cada pixel da imagem por ela captada.

Segundo o sistema RGB, o preto apresenta o valor 0 nos três diferentes canais de cores (0,0,0), porque o preto é constituído pela ausência total de luz, ou seja, não apresenta cores. Desta forma, o preto foi escolhido como valor de referência para a calibração da *webcam*.

O protocolo de calibração da *webcam* inicia-se com a colocação de um cartão preto na frente da mesma, de forma a cobrir todo o seu campo de visão (Figura 32). Em seguida, clica-se no botão “Webcam Calibration” na GUI do dispositivo. Este botão permite que a *webcam* capte a imagem do cartão preto, escolhendo 10 pixéis aleatoriamente na zona central desta e guardando os respectivos valores dos canais RGB. Posteriormente é calculada a média dos valores RGB dos 10 pixéis sendo guardada como valor de referência para a cor vermelha, verde e azul, respectivamente. Assim, anteriormente a cada cálculo da cor da imagem captada pela *webcam*, ocorre sempre uma subtracção com os valores de referência das três diferentes cores RGB para uma correcta análise/detecção de cor por parte do dispositivo desenvolvido.



Figura 32: Posicionamento do cartão preto à frente da *webcam* para a realização do protocolo de calibração.

4.3.2. Calibração do Termómetro

O termómetro MLX90614 foi previamente calibrado pelo fabricante para medir a temperatura de objectos com emissividade 1. [33] Visto que apenas o corpo negro apresenta esta emissividade, é necessário ajustar a calibração do termómetro para medir correctamente a temperatura de objectos com emissividade entre 0,1 e 1. A recalibração adoptada pelo dispositivo dependerá da distância entre o objecto alvo e o termómetro de infravermelhos. Deste modo, no início da utilização do programa no MATLAB é pedido ao utilizador que insira um de cinco valores diferentes para a distância entre o termómetro e o objecto.

Deste modo, foi desenvolvido um protocolo de calibração nos quais foram necessários diversos materiais além do próprio dispositivo: uma placa de aquecimento eléctrica, um copo de precipitação de vidro de 300 mL (diâmetro de $4,0 \pm 0,5$ cm), suporte com garra, tampa de uma caixa de *Petri*, termómetro de mercúrio, água, régua, pipeta e cronómetro. Este protocolo foi criado para 5 distâncias diferentes entre o objecto e o termómetro, nomeadamente, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 cm, e como tal, realizaram-se 5 ensaios diferentes de acordo com cada uma das distâncias.

A montagem do equipamento para a calibração (Figura 33) incluiu a colocação do termómetro de mercúrio fixo pela garra do suporte sobre o copo de precipitação. Incluiu também o posicionamento do termómetro de infravermelhos a uma dada distância do copo (dependendo da distância do ensaio em questão), de forma que a sua FOV incluísse o mesmo. Para melhorar o ajuste da FOV foi necessário a utilização de uma tampa de uma caixa de *Petri* de forma a criar altura ao copo de precipitação.

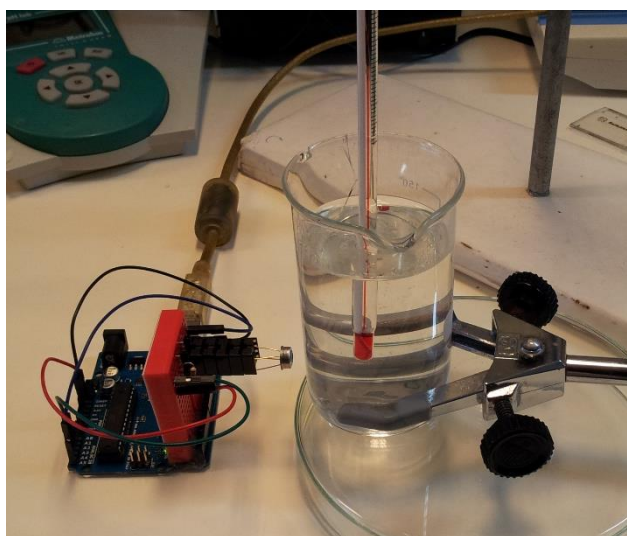


Figura 33: Montagem do equipamento para executar a calibração do termómetro de infravermelhos.

Concluída a montagem do equipamento para a calibração do termómetro, procedeu-se ao aquecimento da água até à ebulição com a placa de aquecimento eléctrica. Colocada a água em ebulição no copo, deu-se início ao cronómetro, bem como à aquisição de temperaturas em graus Celsius pelo dispositivo e paralelamente à anotação destas juntamente com as temperaturas indicadas pelo termómetro de mercúrio. Cada um destes procedimentos teve a duração de 82 minutos, em que nos primeiros 26 minutos fizeram-se anotações de temperatura de 30 em 30

segundos, passando estas a ser de 1 em 1 minutos até aos 50 minutos, terminando-se até aos 82 minutos com medições de 2 em 2 minutos.

Posteriormente, recorreu-se ao *software Microsoft Office Excel*, onde os dados tabelados referentes aos dois termómetros foram colocados graficamente em função do tempo e em função um do outro, sendo criada uma recta de calibração para cada umas das 5 diferentes distâncias objecto-termómetro, respectivamente.

4.4. Utilização do dispositivo no processo de síntese das nanopartículas de ouro

O processo utilizado para a síntese das nanopartículas de ouro dividiu-se em 4 métodos principais: o método “*Seed*”, a 2ª redução da solução “*Seed*”, o método “*Growth*” e, por último, o método “*Seed Growth*”. É importante referir que o objectivo final das nanopartículas produzidas nesta parte do trabalho seria a sua posterior utilização para hipertermia por radiação laser, cujo comprimento de onda é de 808 nm e como tal, estas deveriam apresentar absorção ao nível deste comprimento de onda.

O método “*Seed*” corresponde ao método de *Turkevich* para a síntese de nanopartículas de ouro, que se encontra descrito no Capítulo 2 do presente trabalho, que se realizou num recipiente metálico preenchido com areia (com o objectivo de manter a temperatura constante). A solução “*Seed*” resultante deste método sofreu uma 2ª redução com um agente redutor mais potente, o borohidreto de sódio (NaBH_4). Esta 2ª redução foi concluída em 2 horas.

O método “*Growth*” corresponde à produção de uma solução de crescimento para as nanopartículas, ou seja, nesta solução as nanopartículas aumentam de dimensões e a sua forma é modelada, porque, lembrando, pretende-se a obtenção de nanopartículas com absorção aos 808 nm e as nanopartículas esféricas provenientes do método “*Seed*” são pequenas demais para possuírem esta característica. Assim, este método surge com o intuito de aumentar as nanopartículas, o que provoca alterações dos seus formatos esféricos para cilíndricos (passando a designar-se *nanorods*), permitindo que estas absorvam comprimentos de onda maiores (entre os 600-800 nm, como pretendido). É importante referir que este método resulta da adição imediata de outros agentes redutores e modeladores ao HAuCl_4 , que não podem ser divulgados no presente trabalho (fase de patenteamento).

O método “*Seed Growth*” tem uma duração de 15 minutos e resulta da junção de 5 gotas da solução resultante do método “*Seed*” após a 2ª redução, à solução do método “*Growth*” sob efeito de agitação magnética, da qual resultam aglomerados de nanopartículas aproximadamente esféricas (espécie de floreados) e também *nanorods*.

Nestes 4 métodos do processo de síntese das nanopartículas de ouro ocorreu em certa altura alterações de cor, como tal, em todas elas o dispositivo foi utilizado para analisar a cor da solução com as nanopartículas. Relativamente à temperatura, o mesmo não foi necessário, pois apenas no método “*Seed*” se efectuaram registos da mesma, por ser o único método onde é necessária a monitorização da temperatura.

4.5. Utilização do dispositivo na hipertermia das nanopartículas de ouro

De forma a garantir que as nanopartículas utilizadas nesta parte do trabalho se encontravam na banda de absorção dos 808 nm (tal como a radiação laser utilizada), as nanopartículas sintetizadas anteriormente foram substituídas por *nanorods* comerciais. Contudo, a estas *nanorods* foi-lhes adicionado um corante lipossolúvel (*Sudan III*, que apresenta uma cor vermelha) de forma a que quando irradiadas pelo laser fosse possível observar a libertação do corante, confirmando a ocorrência de hipertermia das mesmas. Assim, recorreu-se à utilização do dispositivo desenvolvido no presente trabalho, nomeadamente ao termómetro de IR, para se tentar descobrir a que temperatura as *nanorods* submetidas pela radiação laser sofrem hipertermia.

Para uma boa visualização da libertação do corante das *nanorods* aquando a incidência da radiação laser, as *nanorods* cobertas com o polímero com corante foram incorporadas em *cuvetes* com uma largura de $(1,2 \pm 0,05)$ cm e uma altura de $(4,4 \pm 0,05)$ cm preenchidas com agar no seu interior (Figura 34), designadas de fantasmas.

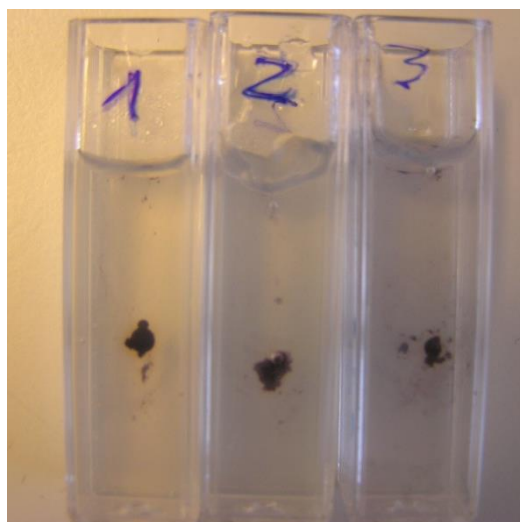


Figura 34: Algumas *cuvetes* de plástico transparente com *nanorods* em agar.

Seleccionada uma das *cuvetes* e captada uma imagem microscópica das suas *nanorods*, procedeu-se à realização de duas medições de temperatura durante a sua exposição a radiação laser de 808 nm: na primeira medição fez-se incidir a radiação durante 10 minutos, registando-se a temperatura graficamente através da GUI do dispositivo e captando-se uma imagem microscópica das *nanorods* da *cuvete*, na segunda medição fez-se incidir a radiação laser durante 20 minutos, voltando a registar-se da mesma forma os resultados.

Capítulo 5

Resultados

Neste capítulo encontram-se os resultados do trabalho desenvolvido a partir da metodologia descrita no capítulo anterior, bem como breves considerações sobre os mesmos. Os resultados obtidos encontram-se divididos em três secções principais: a calibração do termómetro de infravermelhos, o processo de síntese de nanopartículas de ouro e a hipertermia de nanopartículas de ouro. É importante referir, que apesar de não existir uma secção onde se aborde a calibração da *webcam*, esta está presente nas duas últimas secções deste capítulo.

5.1. Calibração do termómetro de infravermelhos

Como referido no Capítulo 4, foram realizados 5 ensaios experimentais diferentes com a duração de 82 minutos de forma a criar rectas de calibração para o termómetro IR que incorpora o dispositivo desenvolvido no presente trabalho. A cada ensaio experimental foram anotadas as temperaturas do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em graus Celsius. O número de ensaios experimentais deve-se ao número de vezes que se fez variar a distância entre o copo de precipitação com a água e o termómetro IR. Seguem-se então os resultados obtidos graficamente para as distâncias 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, e 2,5 cm, bem como um gráfico final com as 5 rectas de calibração obtidas para cada distância, respectivamente.

Para a distância de 0,5 cm, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 35.

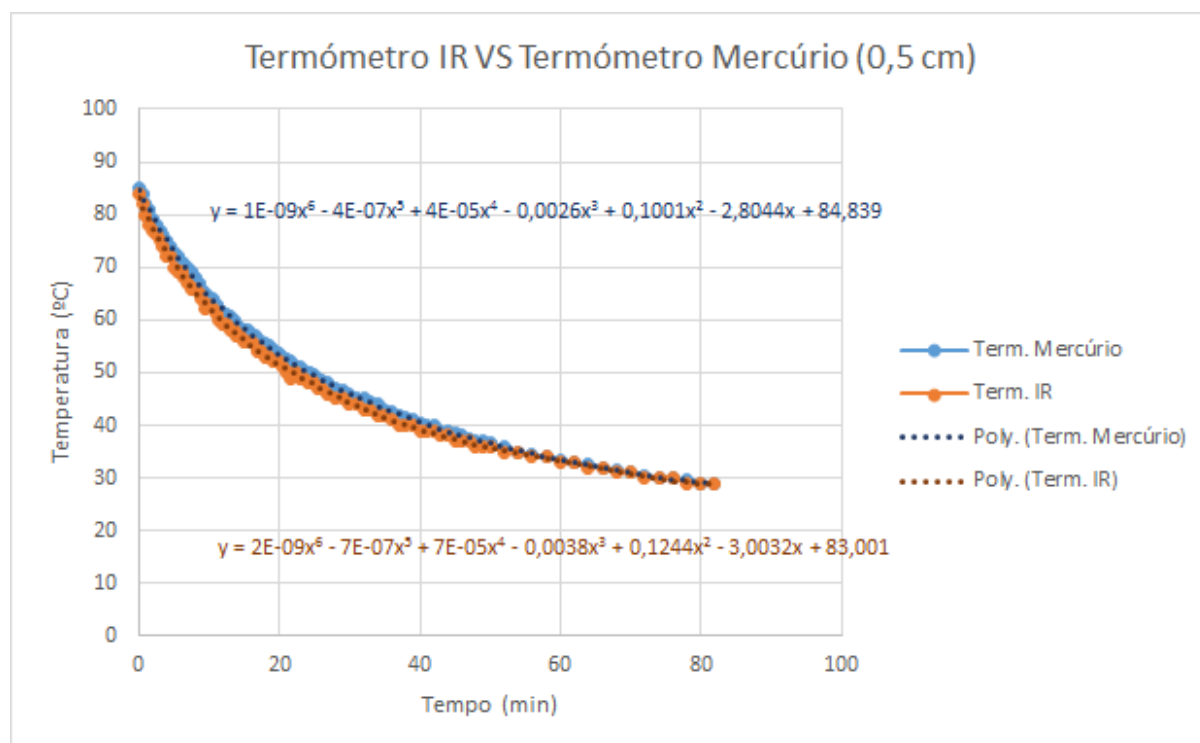


Figura 35: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 0,5 cm.

Para a distância de 1,0 cm, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 36.

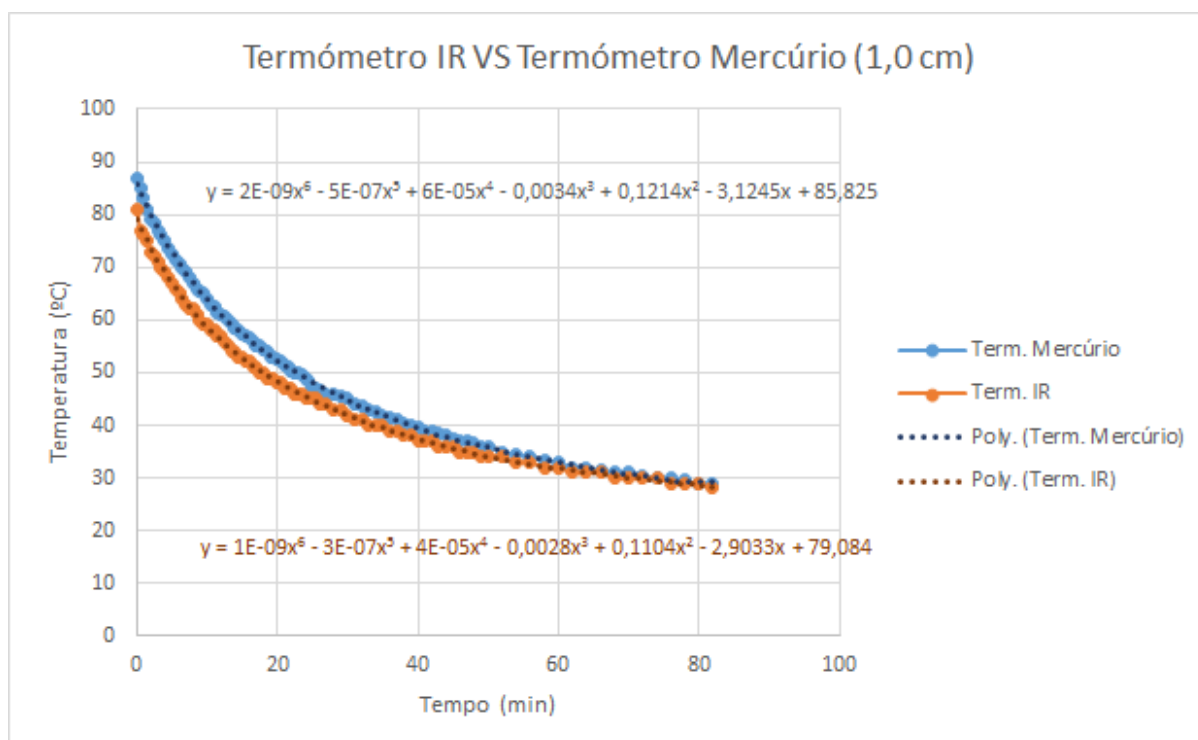


Figura 36: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 1,0 cm.

Para a distância de 1,5 cm, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 37.

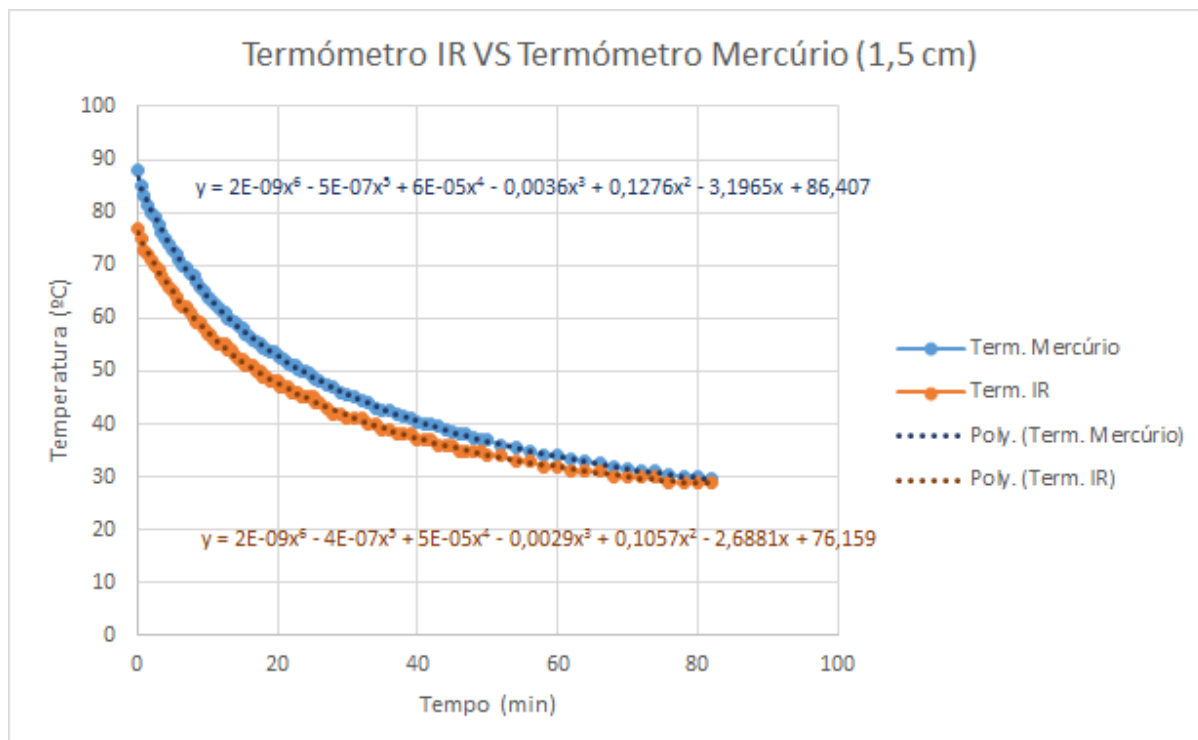


Figura 37: Gráfico da variação da temperatura do termómetro IR e do termómetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termómetro IR de 1,5 cm.

Para a distância de 2,0 cm, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 38.

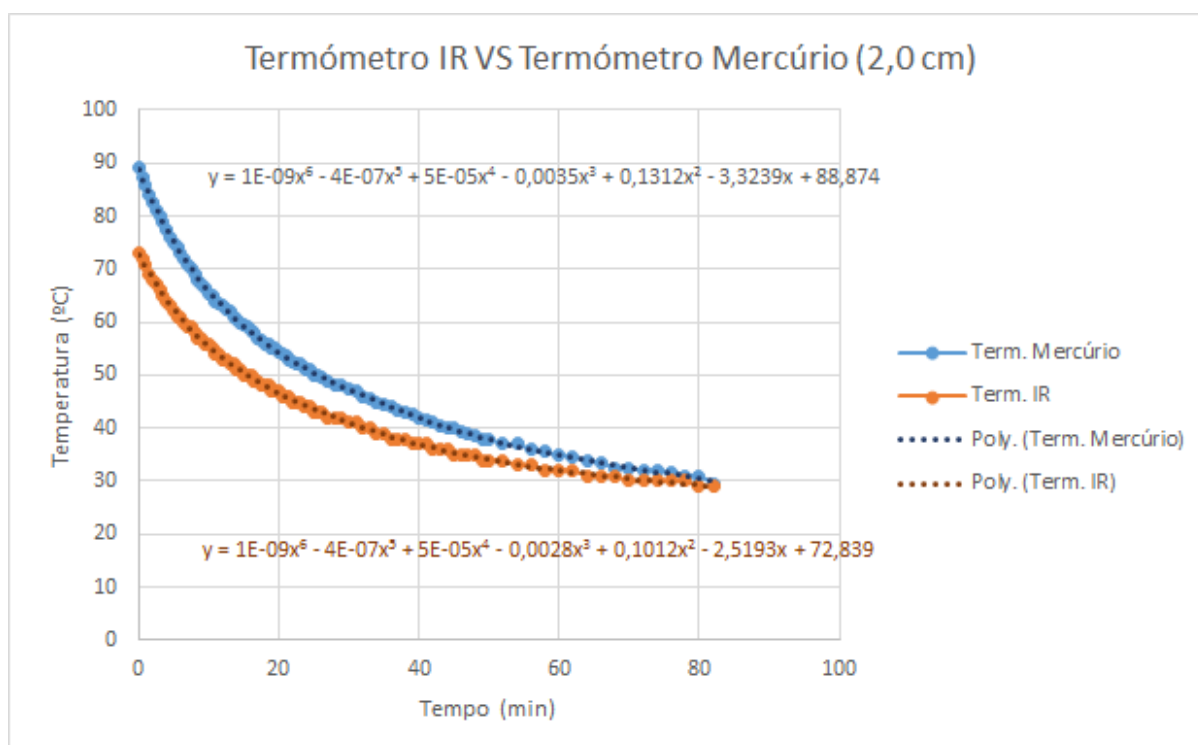


Figura 38: Gráfico da variação da temperatura do termômetro IR e do termômetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termômetro IR de 2,0 cm.

Para a distância de 2,5 cm, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 39.

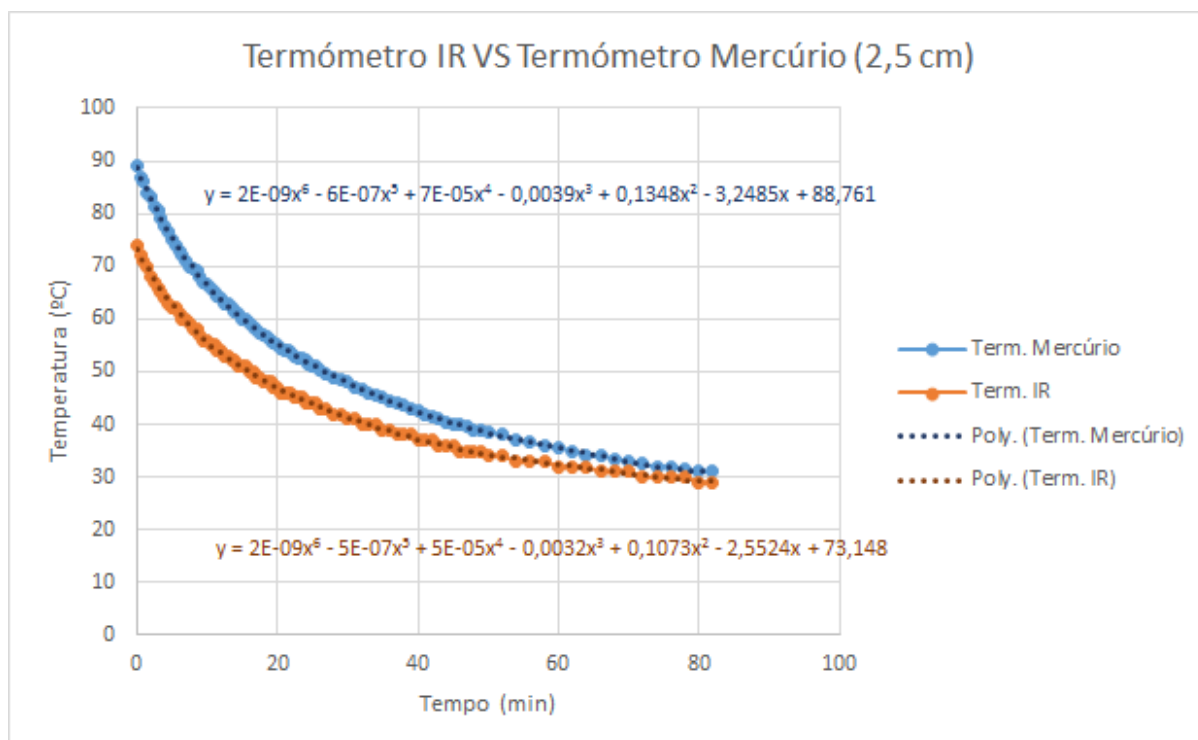


Figura 39: Gráfico da variação da temperatura do termômetro IR e do termômetro de mercúrio em função do tempo para distância copo-termômetro IR de 2,5 cm.

Finalmente, criaram-se as rectas de calibração para cada distância considerada, as quais se encontram apresentadas na Figura 40. Estas rectas podem ser descritas em função do termómetro de mercúrio (x), sendo que o termómetro de infravermelhos é representado pelo y :

Para a distância de 0,5 cm: $y = 0,9581x + 0,5947$

Para a distância de 1,0 cm: $y = 0,8830x + 2,4929$

Para a distância de 1,5 cm: $y = 0,8418x + 3,3087$

Para a distância de 2,0 cm: $y = 0,7571x + 5,4848$

Para a distância de 2,5 cm: $y = 0,7624x + 5,0783$

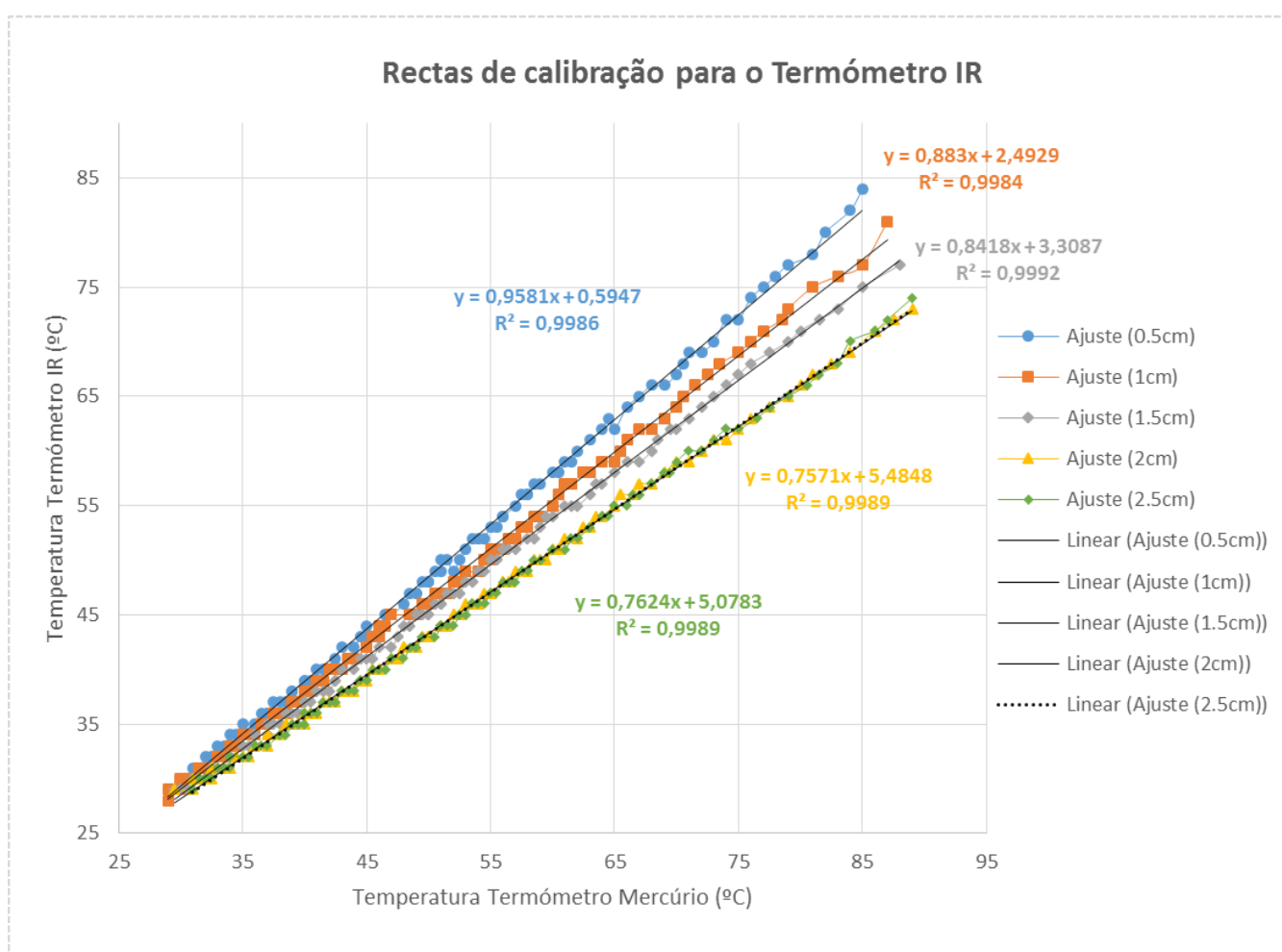


Figura 40: Gráfico com as rectas de calibração criadas para as 5 distâncias, respectivamente.

5.2. Processo de síntese de nanopartículas de ouro

O processo de síntese das nanopartículas de ouro utilizado foi dividido em quatro partes principais: método “Seed”, método “Seed” (2ª redução), método “Growth” e método “Seed Growth”.

5.2.1. Método “Seed”

Para monitorizar a temperatura e a coloração da solução do método “Seed” através do dispositivo desenvolvido foi necessário montar todos os seus componentes de acordo com o local de realização do método (recipiente metálico com areia) (Figura 41).



Figura 41: Montagem dos componentes do dispositivo para a monitorização do método "Seed".

Após a montagem do dispositivo, acedeu-se ao seu GUI no computador de forma a verificar se a montagem da *webcam* se encontrava correctamente, isto é, se a sua filmagem focava a região do balão onde se iria encontrar a solução de nanopartículas de ouro com o agitador magnético (Figura 42).

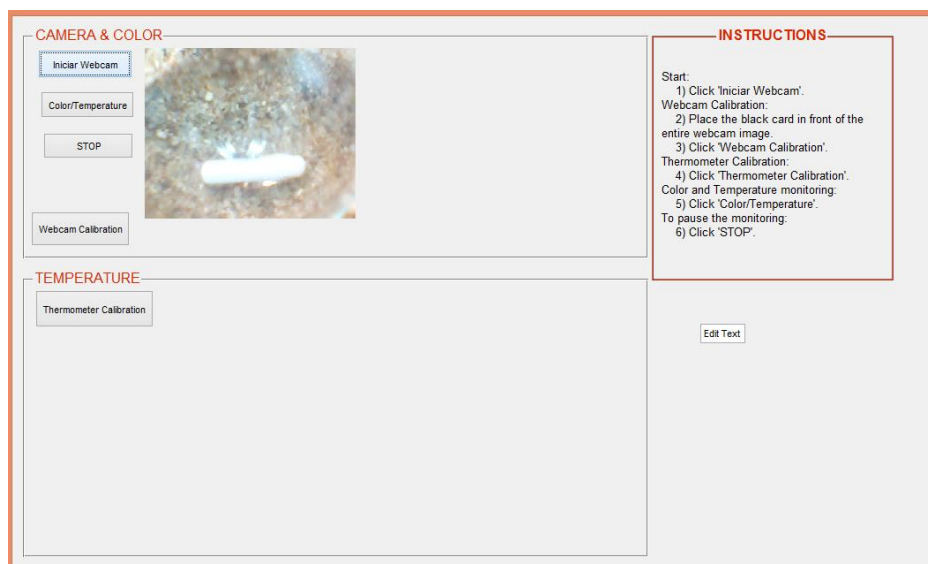


Figura 42: Visualização da filmagem da *webcam* do dispositivo na GUI previamente à realização do método “Seed”.

Colocado o HAuCl_4 no balão, observou-se imediatamente que a areia apresentava uma grande contribuição para análise da cor da solução. Como tal, procedeu-se à introdução de papel branco entre o balão e a areia, como demonstrado na Figura 43.



Figura 43: Introdução do papel entre o balão e a areia.

De seguida, e antes de se dar início à monitorização da solução, tanto o termómetro como a *webcam* foram calibrados de acordo com o protocolo de calibração criado para cada um (Figura 44 e Figura 45, respectivamente).

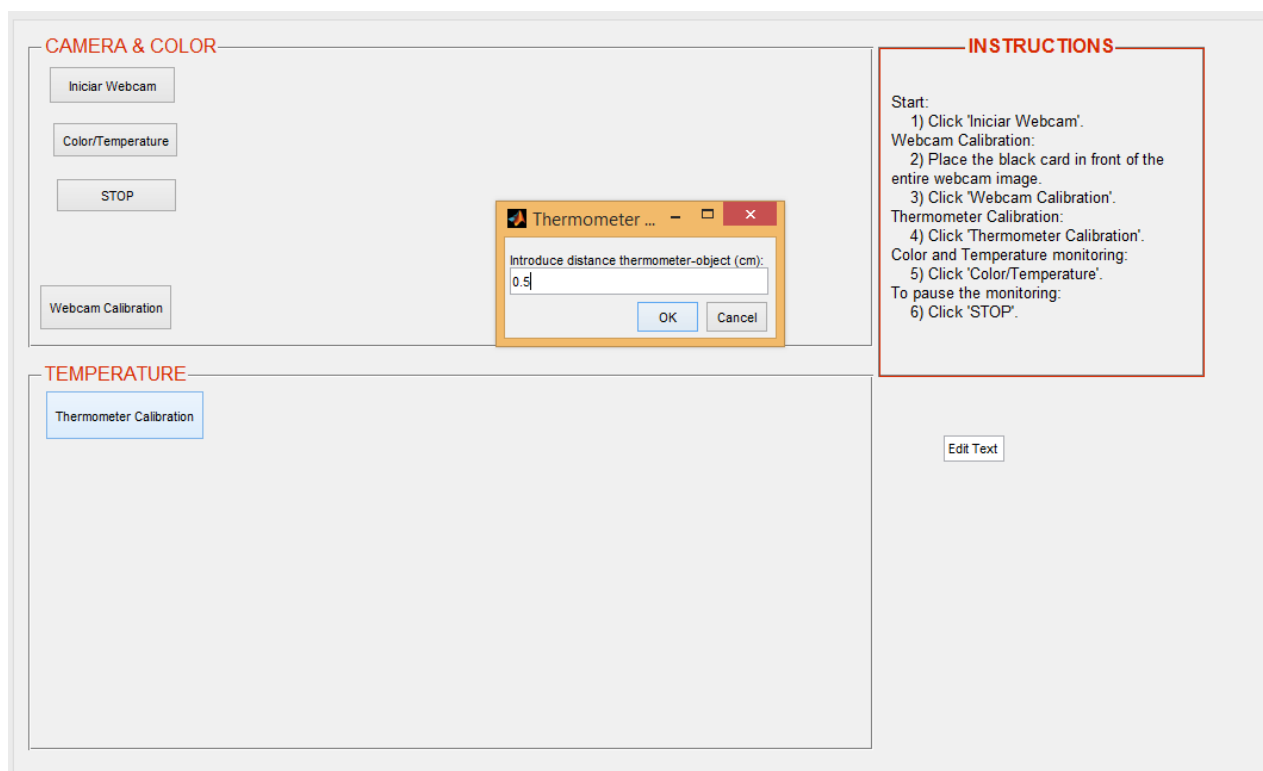


Figura 44: Janela de calibração do termómetro IR da Interface Gráfica do Utilizador do dispositivo onde o utilizador introduz a distância termómetro-objecto, neste caso 0,5 cm.

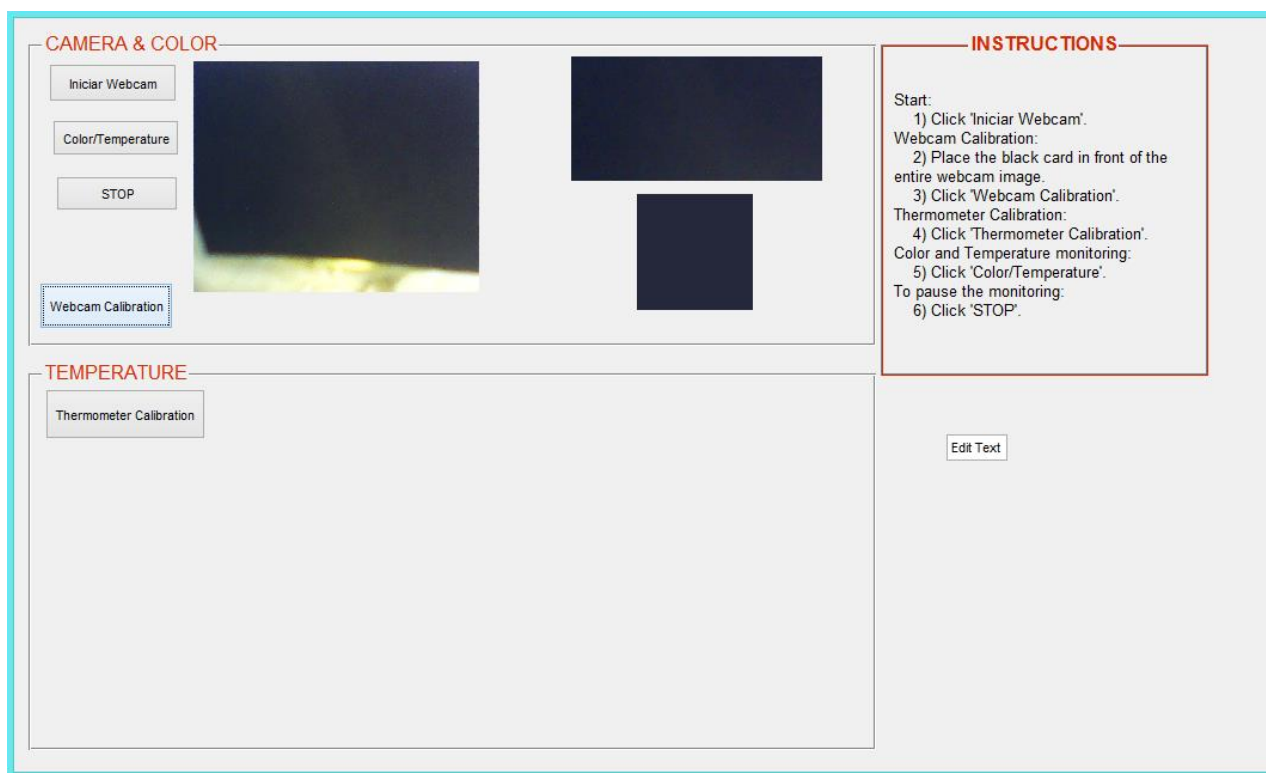


Figura 45: Calibração da *webcam* com o cartão preto.

Concluída a calibração do dispositivo, deu-se início à monitorização da coloração e da temperatura da solução do método “Seed” ao clicar-se no botão “Color/Temperature” existente na GUI (Figura 46). É importante referir que o valor das temperaturas lidas pelo termómetro IR também foram apresentadas na *Command Window* do MATLAB (Figura 47) para além de poderem ser visualizadas graficamente na GUI.

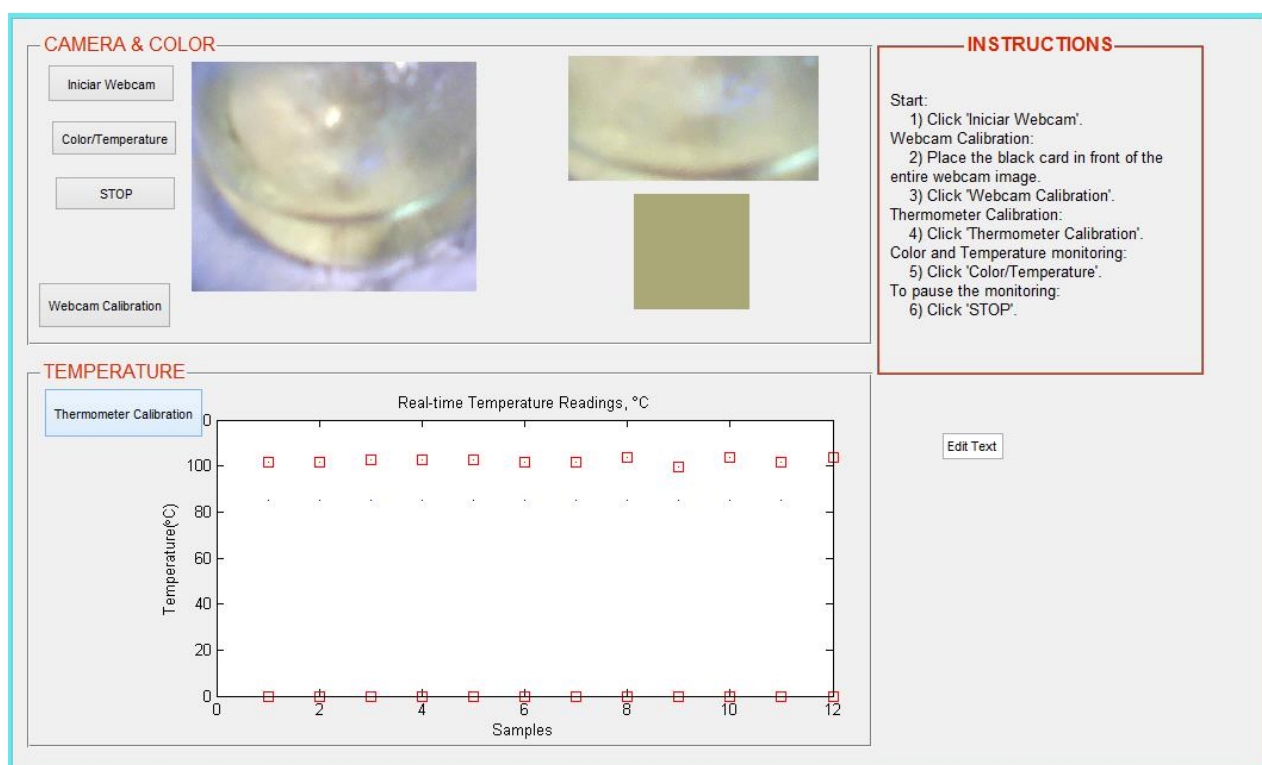


Figura 46: GUI em funcionamento durante o método "Seed". Observações: Os quadrados vermelhos existentes na parte superior do gráfico da temperatura correspondem aos valores de temperatura medidos pelo dispositivo. Por sua vez, os quadrados vermelhos existentes na parte inferior do gráfico da temperatura correspondem aos valores das posições vectoriais em que as temperaturas imediatamente acima estão a ser guardadas. Os pontos pretos, correspondentes ao valor 85°C, correspondem ao valor de temperatura mínima necessário atingir para que ocorra a ebulição da solução de nanopartículas de ouro durante o método “Seed”.

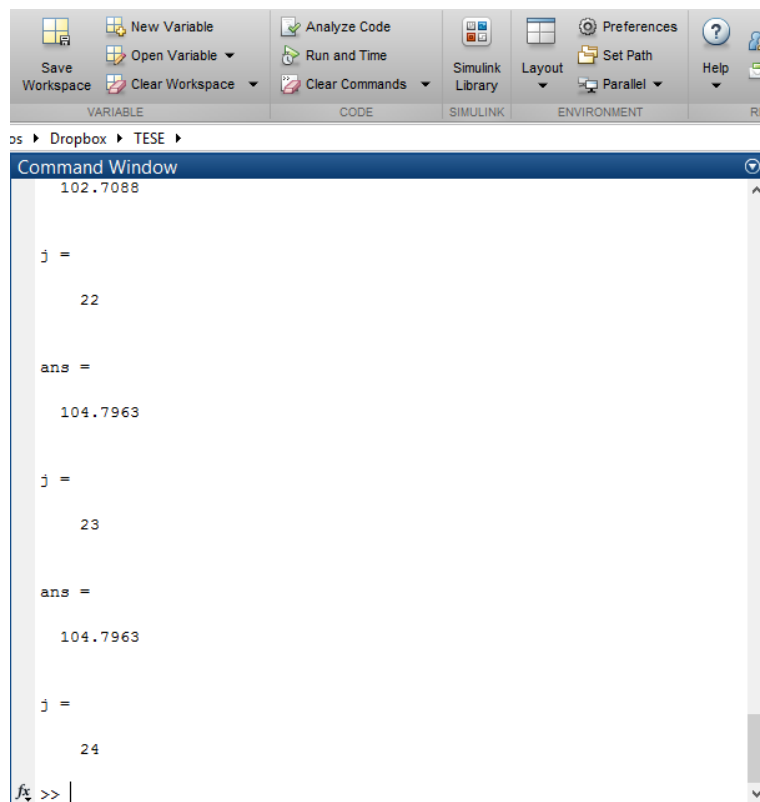


Figura 47: Command Window do MATLAB apresentando as temperaturas lidas pelo termómetro IR (correspondente ao valor de “ans”).

Atingido o ponto de ebulição do HAuCl_4 (aproximadamente $96,0 \pm 1,0$ °C medidos pelo termómetro IR e $90,0 \pm 0,5$ °C pelo termómetro de mercúrio), adicionou-se o citrato de sódio ao balão, obtendo-se de imediato uma alteração de cor de amarelo translúcido para vermelho escuro (Figura 48). Após 10 minutos, a solução foi removida, verificando-se que esta apresentava uma tonalidade de vermelho diferente consoante a luz que nela incidia (Figura 49).

A solução “Seed” resultante deste método foi constituída maioritariamente por nanopartículas de ouro esféricas com absorção nos 500-600 nm (valor medido através de um espectrofotómetro).

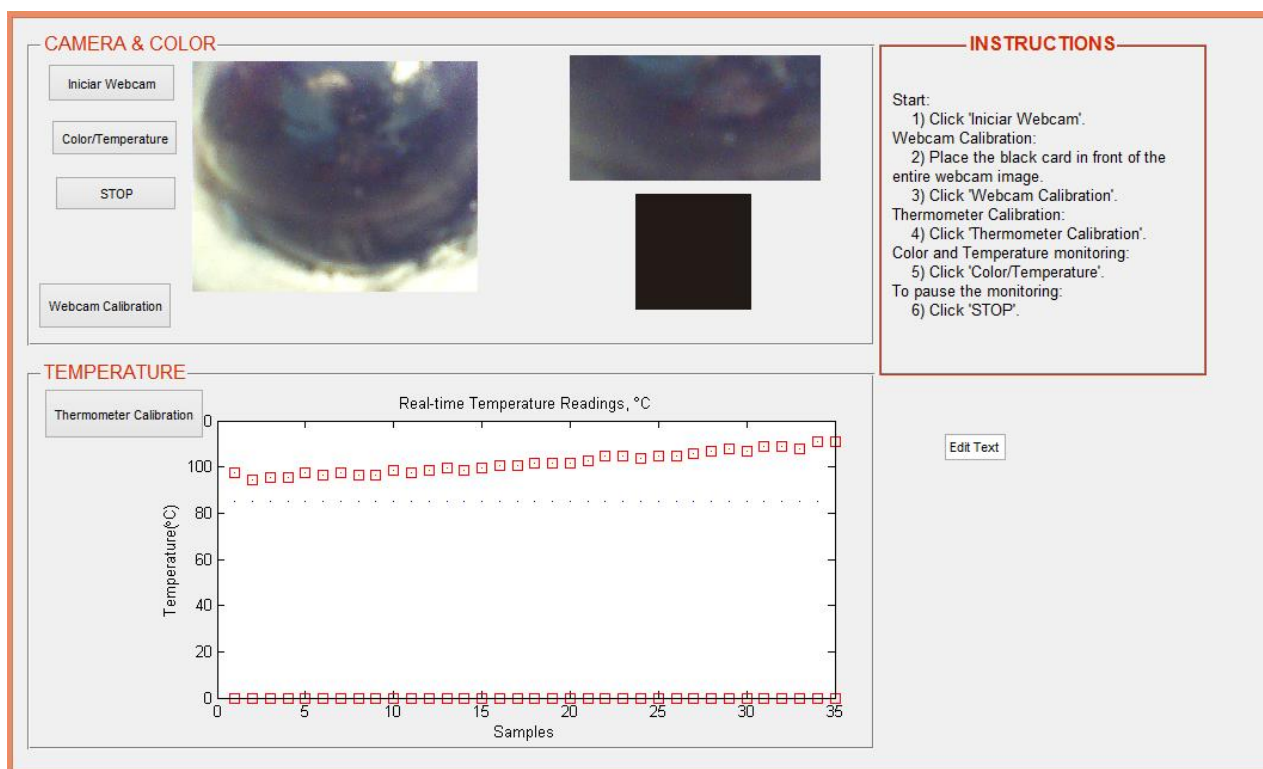


Figura 48: GUI com a monitorização da solução "Seed" resultante do método.



Figura 49: Fotografia do balão com a solução "Seed" resultante.

5.2.2. Método “Seed” (2ª redução)

À solução “Seed” obtida anteriormente adicionou-se um segundo agente redutor num meio arrefecido com gelo e sob agitação magnética durante 2 horas. Como tal, através do dispositivo foi possível detectar ligeiras alterações na cor da solução ao longo da reacção. Neste método, apesar de ser em gelo, a temperatura não foi monitorizada, pois foi referido que o gelo é necessário apenas para a solução não estar quente.

De acordo com a Figura 50, iniciou-se o GUI do dispositivo de forma verificar se a montagem da *webcam* se encontrava correcta (tal como efectuado para o método “Seed”) (Figura 51).



Figura 50: Montagem da *webcam* para monitorizar a adição do 2º redutor na solução “Seed” obtida anteriormente.

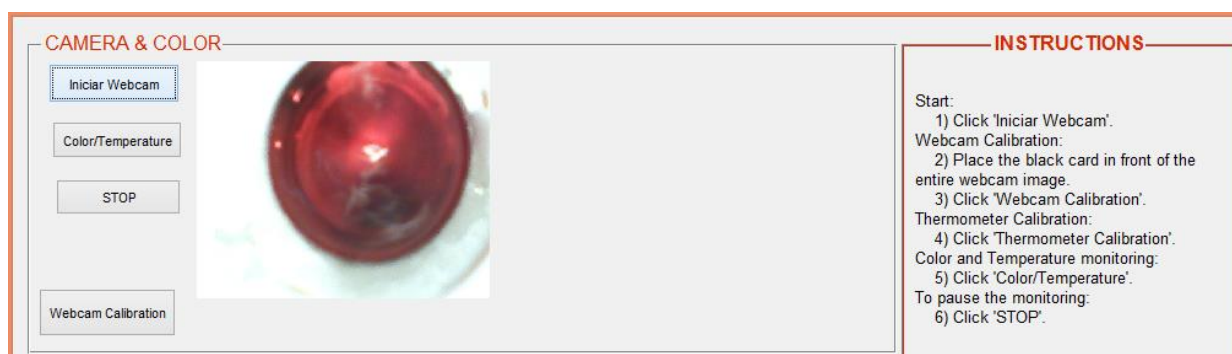


Figura 51: Visualização da solução “Seed” em gelo sob agitação magnética (excluindo o segundo painel da GUI).

De seguida, e antes de se dar início à monitorização da solução, procedeu-se à calibração da *webcam* de acordo com o seu protocolo de calibração (Figura 52 e Figura 53).



Figura 52: Calibração da *webcam* (excluindo o segundo painel da GUI).

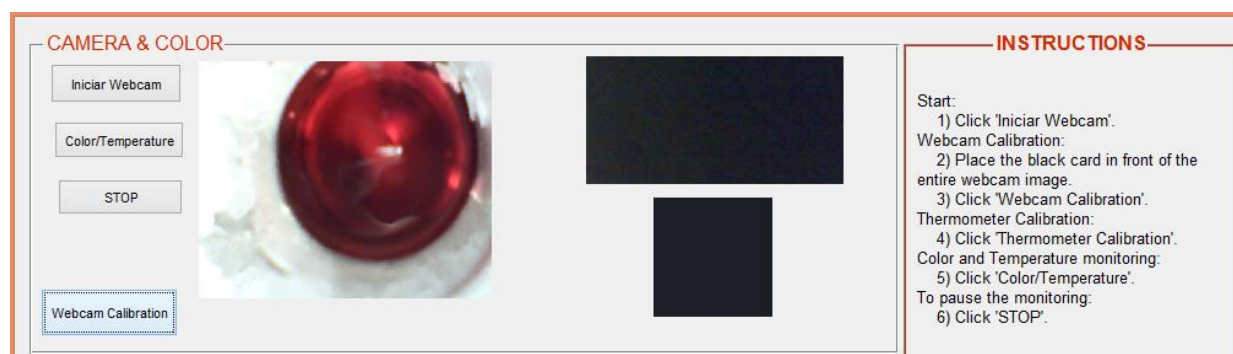


Figura 53: Remoção do cartão preto de calibração do campo de visão da *webcam* (excluindo o segundo painel da GUI).

Concluída a calibração da *webcam* do dispositivo, deu-se início à monitorização da coloração da solução ao clicar-se no botão “Color/Temperature” existente na GUI (Figura 54).

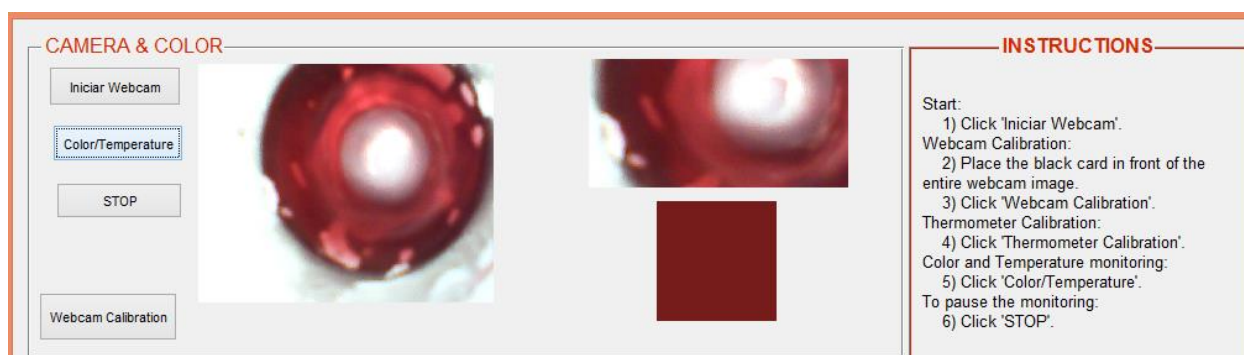


Figura 54: Início da análise da cor da solução, ou seja, após o “click” no botão “Color/Temperature” (excluindo o segundo painel da GUI).

Em seguida, adicionou-se o borohidreto de sódio (NaBH_4) à solução “Seed” colocada em gelo e imediatamente foi possível observar uma alteração da cor da solução (Figura 55).

Ao longo da reacção de 2 horas detectou-se uma alteração contínua da cor da solução através do dispositivo, sendo que no final desta foi possível observar que a cor vermelha inicial da solução sofreu um aclaramento de tonalidade significativo, tornando-se numa solução com a coloração vermelho claro (Figura 56).

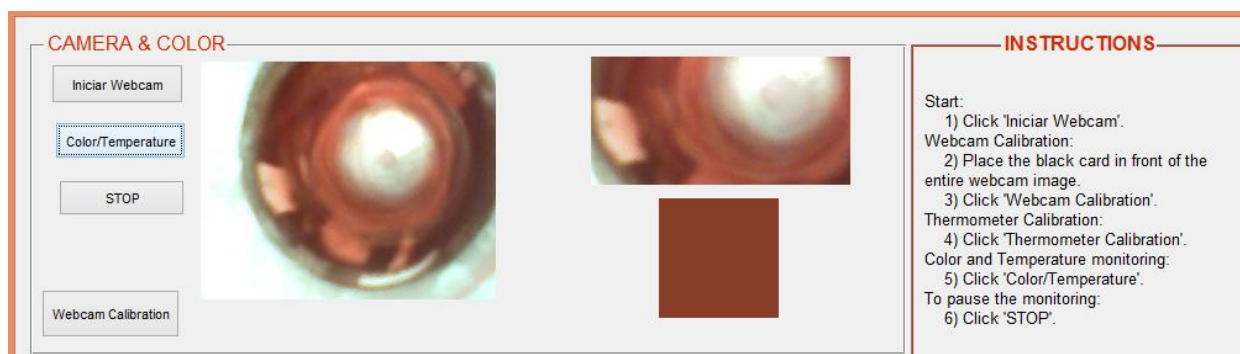


Figura 55: Imediatamente após a adição do 2º agente redutor na solução "Seed" (excluindo o segundo painel da GUI).

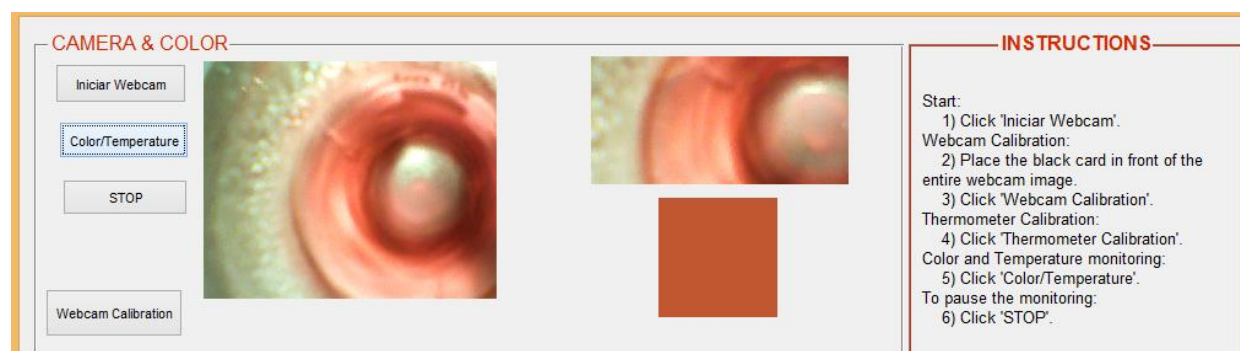


Figura 56: Solução "Seed" com o 2º agente redutor após as duas horas (excluindo o segundo painel da GUI).

5.2.3. Método "Growth"

Durante o método "*Growth*", o parâmetro importante a observar foi a coloração, visto que a reacção foi realizada à temperatura ambiente (26°C). Como tal, procedeu-se apenas à montagem da *webcam* do dispositivo, de acordo com o posicionamento do copo de precipitação sobre a placa de agitação magnética onde se deu a reacção do método (Figura 57).



Figura 57: Montagem da *webcam* do dispositivo para a monitorização do método "*Growth*".

Colocado o HAuCl_4 no copo de precipitação juntamente com o agitador magnético, iniciou-se a GUI do dispositivo de forma verificar a montagem da *webcam* procedendo-se, de seguida, à realização do protocolo de calibração da *webcam* (Figura 58) e (Figura 59).

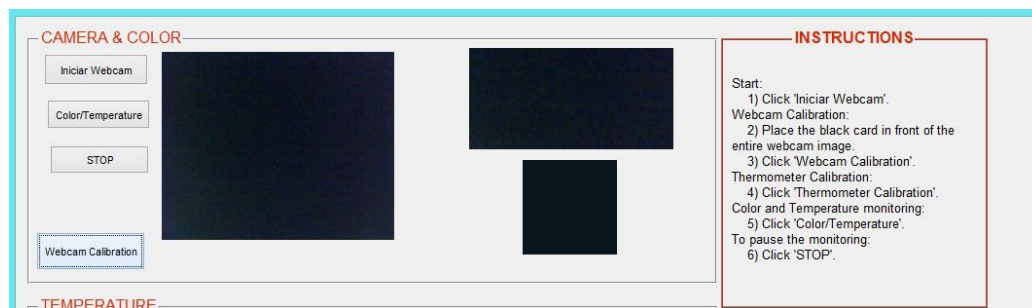


Figura 58: Calibração da *webcam* (excluindo o segundo painel da GUI).

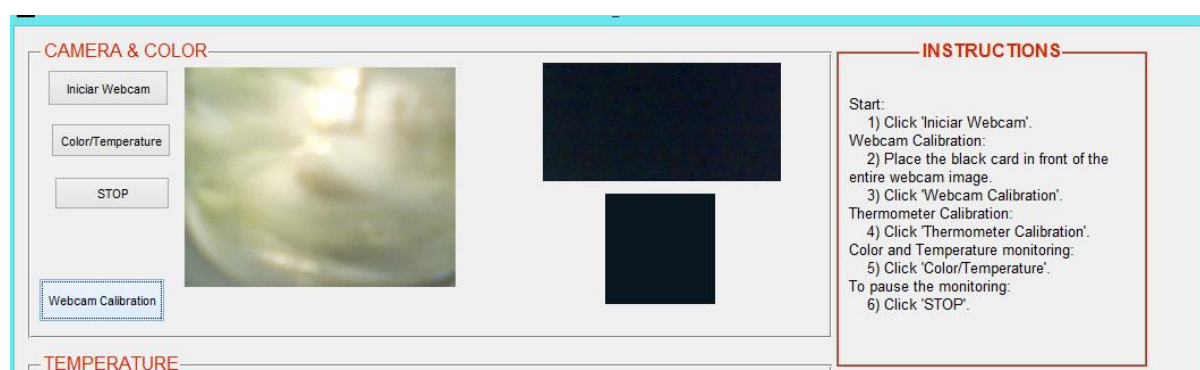


Figura 59: Remoção do cartão preto de calibração do campo de visão da *webcam* (excluindo o segundo painel da GUI).

Concluída a calibração do dispositivo, deu-se início à monitorização da coloração da solução ao clicar-se no botão "*Color/Temperature*" existente na GUI (Figura 60).

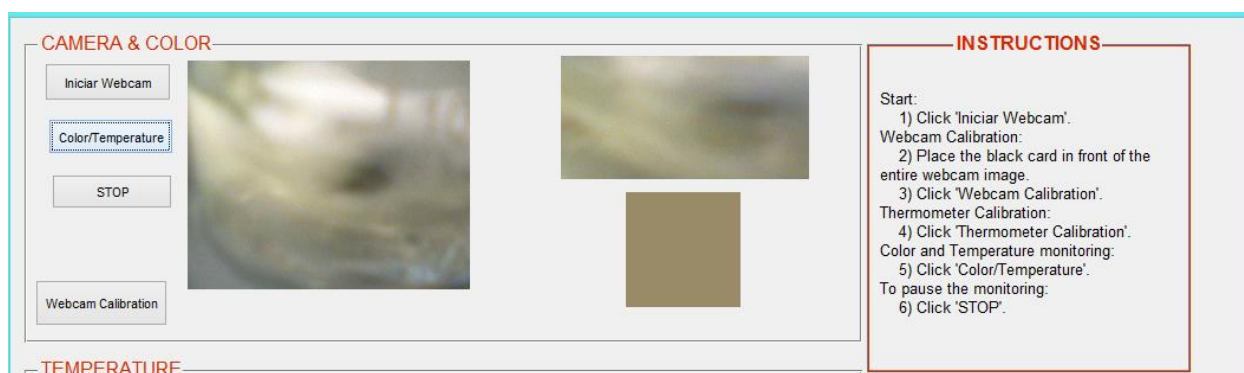


Figura 60: GUI em funcionamento durante o método "*Growth*" após a adição de HAuCl_4 no copo de precipitação (excluindo o segundo painel da GUI).

Pouco tempo depois adicionaram-se os agentes redutores e modeladores à solução, concluindo-se a reacção. Posteriormente foi possível observar a “olho nu” uma alteração de cor por parte da solução de amarelo muito claro para castanho esverdeado (Figura 61). No entanto, através do dispositivo esta alteração de cor variou de castanho claro (Figura 60 acima) para castanho escuro (Figura 62 abaixo).

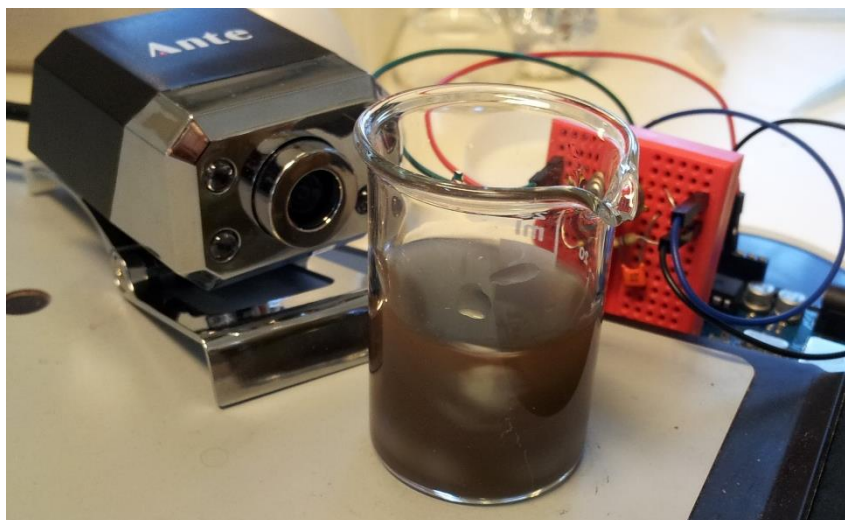


Figura 61: Resultado final da reacção do método "Growth" onde se observa a solução da cor castanho esverdeado.

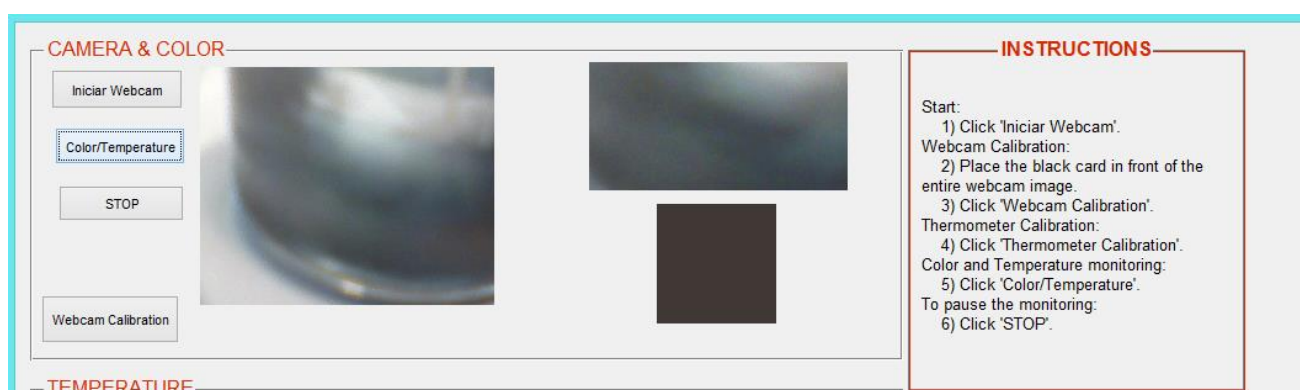


Figura 62: Coloração da solução "Growth" obtida pelo dispositivo no final da realização do método "Growth" (excluindo o segundo painel da GUI).

5.2.4. Método "Seed Growth"

Relativamente ao método "Seed Growth", é importante referir que se realizou à temperatura ambiente e de forma contínua com o método "Growth" descrito anteriormente. Isto é, mantendo o mesmo posicionamento da *webcam* e utilizando o mesmo copo de precipitação onde se encontrava a solução "Growth", a mesma GUI e o mesmo equipamento. Sendo que, após a adição das 5 gotas da solução "Seed" (após a 2ª redução) na solução "Growth", resultando na solução "Seed Growth", observou-se uma pequena e imediata alteração na coloração da solução "Growth"

relativamente a esta nova solução (Figura 62 e Figura 63), mantendo-se esta por mais 15 minutos sob agitação magnética.

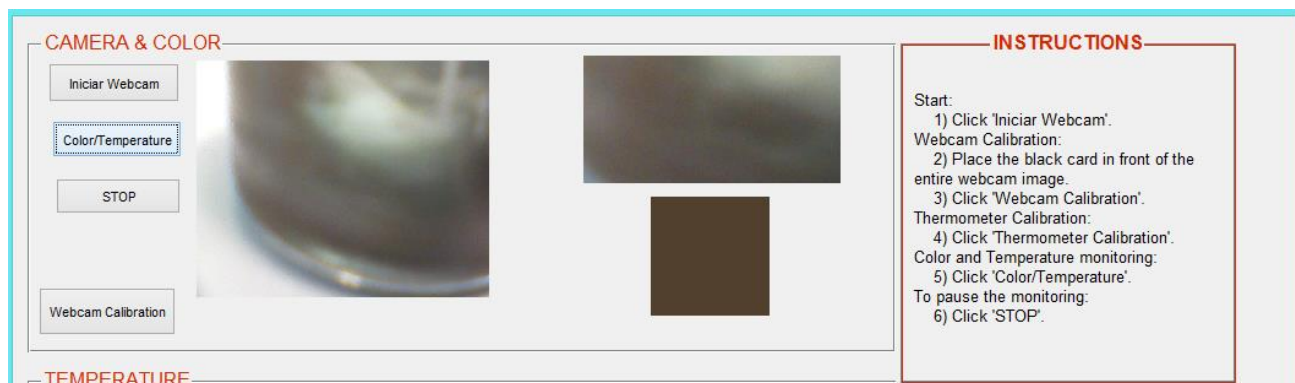


Figura 63: GUI em funcionamento durante o método “Seed Growth” após a adição das 5 gotas de solução “Seed” (após 2ª redução) no copo de precipitação com a solução “Growth” (excluindo o segundo painel da GUI).

Passados os 15 minutos de agitação magnética não se verificou uma alteração de cor significativa, mas que devido ao magneto branco presente na solução, esta alteração tornou-se significativa. Por outras palavras, a influência do magneto branco em funcionamento ou não, tornou-se um factor crucial para uma má ou boa análise de cor da solução por parte do dispositivo, respectivamente (Figura 64 e Figura 65).

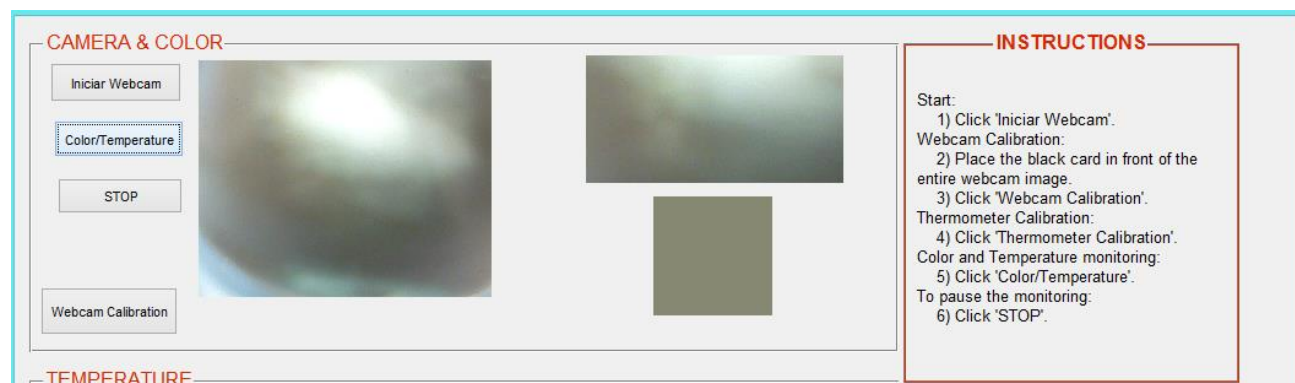


Figura 64: GUI demonstrando a solução "Seed Growth" passados 15 minutos da adição das 5 gotas de solução “Seed” (após 2ª redução) sob agitação magnética (excluindo o segundo painel da GUI).

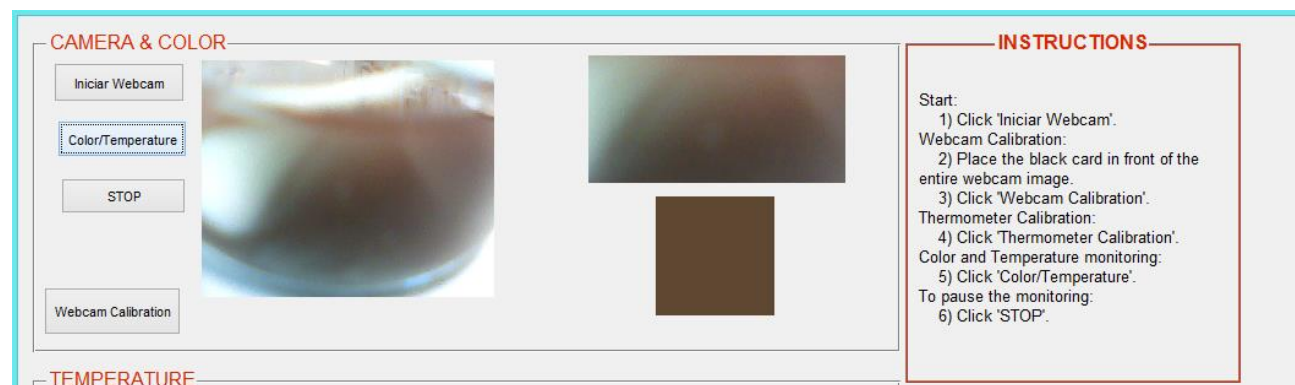


Figura 65: GUI demonstrando a solução "Seed Growth" passados 15 minutos da adição das 5 gotas de solução “Seed” (após 2ª redução) sem agitação magnética (excluindo o segundo painel da GUI).

5.3. Hipertermia de nanopartículas de ouro através de radiação laser

Numa fase posterior foram construídos fantasmas com as *nanorods* de ouro revestidas com o polímero com o corante e procedeu-se à irradiação com o feixe laser com o objectivo de provocar a ruptura das nanopartículas por hipertermia. Nesta experiência, o termómetro IR do dispositivo desenvolvido foi utilizado para quantificar o aumento de temperatura produzido pela radiação laser no interior de um fantoma contendo nanopartículas funcionalizadas (Figura 66).



Figura 66: Imagem microscópica das *nanorods* da *cuvete* seleccionada para a experiência previamente à realização da mesma.

A *cuvete* utilizada possuía um formato de paralelepípedo rectangular com uma largura de $(1,20 \pm 0,05)$ cm e uma altura de $(4,40 \pm 0,05)$ cm. Deste modo, o termómetro foi colocado a cerca de 0,5 cm da *cuvete*, de forma a que a FOV cobrisse toda a largura da *cuvete*, nomeadamente que cobrisse toda a distribuição de *nanorods* no seu interior. Assim, concluída a montagem (Figura 67 e Figura 68), fez-se incidir a radiação *laser* na *cuvete* e registaram-se as respectivas temperaturas através da GUI do dispositivo.



Figura 67: Posicionamento (à direita na imagem) da *cuvete* e do termómetro IR na montagem.

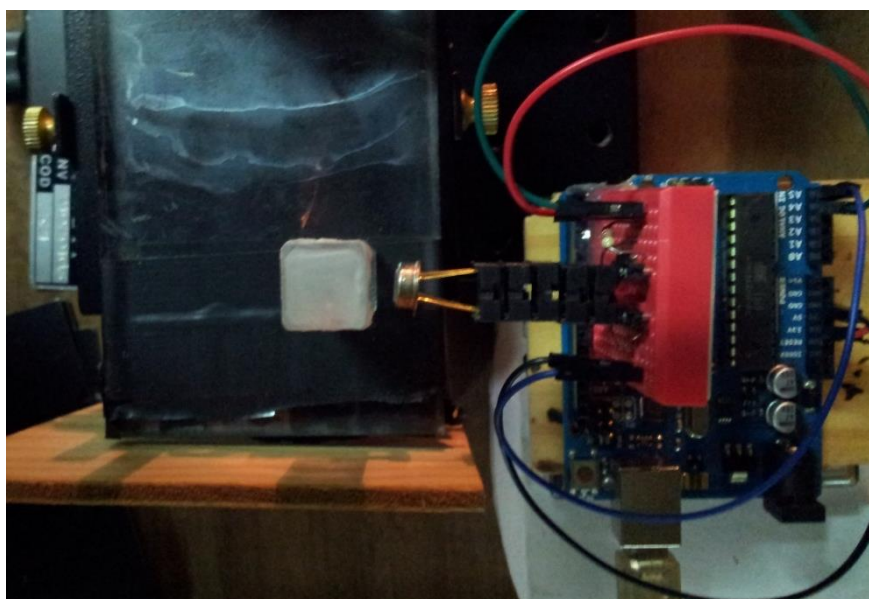


Figura 68: Posicionamento do termómetro IR relativamente à *cuvete* com as *nanorods* (vista superior).

As Figuras 69 e 70 que se seguem apresentam os gráficos resultantes das duas medições de temperatura no interior das *cuvetes*, em que na primeira medição (radiação laser durante 10 minutos) foram atingidos no máximo aproximadamente 38 °C e na segunda (radiação laser durante 20 minutos) aproximadamente 43 °C, respectivamente.

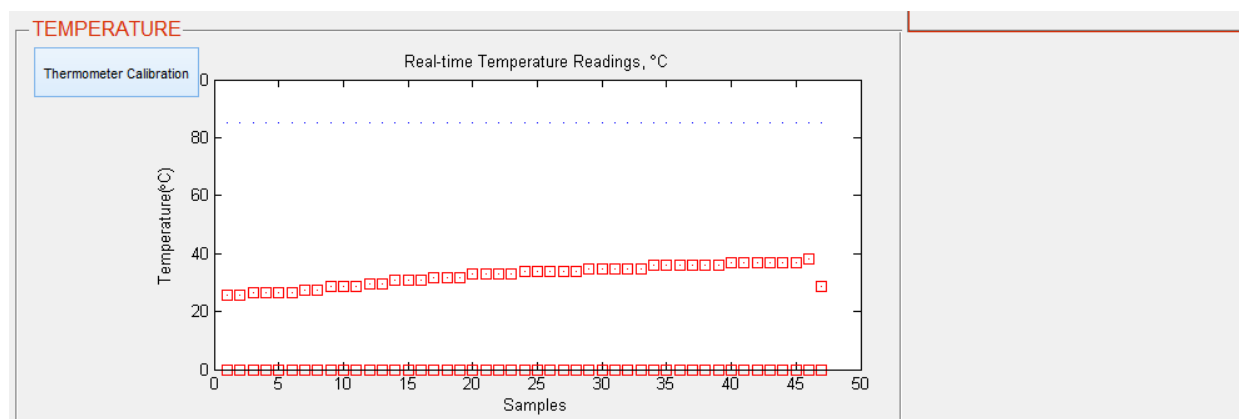


Figura 69: Gráfico resultante da 1ª medição (irradiação durante 10 minutos) em que a temperatura máxima obtida pelo dispositivo foi de 38,0 °C (excluindo o primeiro painel da GUI). Observação: O registo correspondente à *sample 47* (final do gráfico) demonstram a diminuição de temperatura no interior da *cuvete* devido à paragem do funcionamento do feixe *laser*.

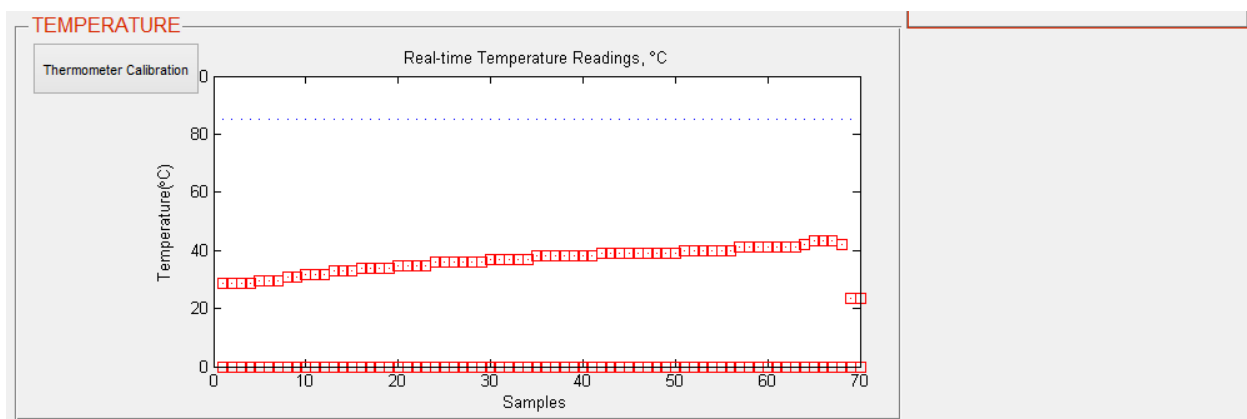


Figura 70: Gráfico resultante da 2ª medição (irradiação durante 20 minutos) em que a temperatura máxima obtida pelo dispositivo foi de 43,2 °C (excluindo o primeiro painel da GUI). Observação: O registo correspondente às *samples 69 e 70* (final do gráfico) demonstram a uma diminuição de temperatura no interior da *cuvete* devido à paragem do funcionamento do feixe *laser*.

De acordo com cada medição foram captadas imagens microscópicas das *nanorods* na *cuvete* após as irradiações (Figura 71 e Figura 72).



Figura 71: Imagem microscópica das *nanorods* após a primeira medição.

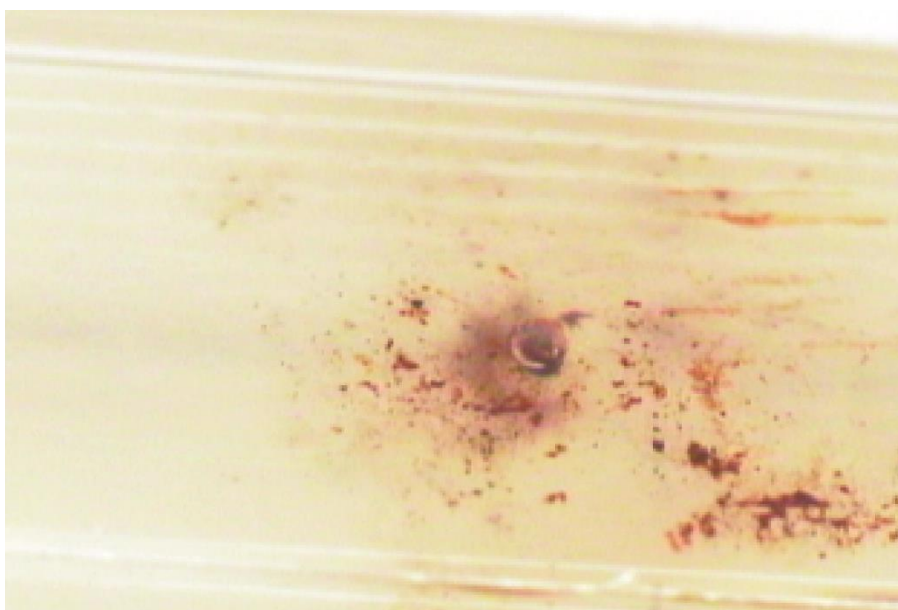


Figura 72: Imagem microscópica das *nanorods* após a segunda medição.

Capítulo 6

Discussão e Conclusão

O trabalho apresentado nesta dissertação tinha como principal objectivo a criação de um dispositivo de monitorização para o processo de síntese de nanopartículas de ouro, bem como a monitorização da sua ruptura/activação por hipertermia através de um feixe laser. Para concretizar este objectivo foi fundamental conhecer o processo de síntese e as características das nanopartículas de ouro, bem como as técnicas de caracterização das mesmas.

Assim, para responder aos objectivos apresentados no início do trabalho, o capítulo que se segue apresenta a discussão e a conclusão do trabalho, incluindo limitações encontradas e perspectivas futuras.

6.1. Discussão

O dispositivo apresentado nesta dissertação teve como principal objectivo a monitorização do processo de síntese de nanopartículas de ouro, bem como a sua ruptura/activação por hipertermia através de radiação laser. Os principais componentes deste dispositivo são uma *webcam* e um termómetro de IR, que realizaram uma análise de cor e medições de temperatura, respectivamente.

A escolha do termómetro de IR teve por base a sua capacidade de funcionamento à distância, isto é, para medir a temperatura de um objecto não necessita estar em contacto com o mesmo, não interferindo de modo algum com o objecto. O facto deste termómetro vir calibrado para realizar medições de temperatura a objectos com emissividade igual a 1 e apresentar uma FOV de 90º fez com que fosse realizado um protocolo de calibração para o mesmo. A FOV de 90º veio a revelar-se uma desvantagem para o dispositivo, pois implica que o termómetro tenha de ser posicionado muito próximo do objecto ao qual se pretende medir a temperatura. Esta desvantagem foi sentida principalmente na aplicação do dispositivo no método “Seed” na síntese de nanopartículas de ouro.

A escolha da *webcam* para incorporar o dispositivo teve por base o seu baixo custo, a sua alta resolução e a sua facilidade de ligação e funcionamento com o *software* MATLAB. Contudo, o ajuste de luz automático que a compõe, veio a revelar-se uma desvantagem na função de análise de cor por parte do dispositivo desenvolvido.

Durante as várias etapas do processo de síntese de NPs de ouro, a GUI do dispositivo revelou ao longo do seu funcionamento uma lentidão exponencial. Tal verificou-se em todas as etapas em que eram utilizados os dois componentes do dispositivo em simultâneo, sobrecarregando a memória do *software* MATLAB, o que indica que a memória do mesmo não está a ser libertada correctamente. Na experiência de hipertermia das NPs de ouro foi apenas utilizado o termómetro de IR e como tal esta lentidão não se verificou.

6.1.1. Calibração dos componentes do dispositivo

O ajuste automático de luz da *webcam* contribuiu para que fosse criado um protocolo de calibração para a mesma, visto que a coloração da sua filmagem dependia da luminosidade em seu

redor. Na realização deste protocolo, foi importante que o dispositivo detectasse que o cartão preto era, de facto, preto e não cinzento, por exemplo. Apesar de nas imagens dos resultados obtidos a calibração da *webcam* detectar a cor preta ou próximo dela (Figuras 44, 52 e 58), nem sempre isso aconteceu devido à reflexão de luz por parte do cartão preto. Assim, por diversas vezes o protocolo de calibração teve de ser repetido várias vezes anteriormente à utilização da *webcam* no dispositivo para por exemplo, melhor ajustar a inclinação do cartão preto de forma a que não reflectisse tanta luz directamente para a *webcam*. Contudo, o protocolo de calibração da *webcam* compensou o seu ajuste automático de luz.

Relativamente ao termómetro de IR MLX90614, como referido anteriormente, possuía uma calibração de origem para objectos com emissividade igual a 1 (corpo negro). Contudo, este foi utilizado para efectuar medições a objectos com emissividade inferior a 1. Assim, para se obter valores de temperatura correctos, procedeu-se à criação de rectas de calibração que seriam introduzidas na GUI do dispositivo.

Durante a experiência de criação das rectas de calibração surgiram algumas dificuldades. Nomeadamente, a passagem de pessoas junto do termómetro de IR durante as experiências e a colocação de água a cerca de 100°C no copo de precipitação. É certo que as pessoas emitem radiação infravermelha e, por isso, sempre que alguém passava junto do termómetro de IR, este captava alguma dessa radiação alterando a temperatura média que registava. A importância da temperatura no copo de precipitação era fundamental para que não ocorresse extrapolação na calibração do termómetro. A água utilizada deveria atingir o valor da temperatura máxima medida pelo termómetro aquando a sua utilização. Este valor foi de 105 °C (atingido nas medições feitas no método “Seed”), mas este valor de temperatura veio a revelar-se inalcançável no copo de precipitação, porque ao passar-se a água a ferver para o copo, esta arrefecia rapidamente impedindo medições a tão elevadas temperaturas. O maior valor de temperatura conseguido no copo foi de 89°C medido pelo termómetro de mercúrio e 84°C medido pelo termómetro de IR.

6.1.2. Processo de síntese de nanopartículas de ouro

Em todos os métodos de síntese das NPs de ouro utilizou-se a *webcam* do dispositivo para realizar a análise de cor da solução. Do mesmo modo, em todos eles foi utilizada agitação magnética produzida através de um magneto branco incorporado nas soluções, constituindo este a principal fonte de ruído existente na análise de cor das mesmas. De forma a diminuir a influência da cor do magneto branco na análise de cor das soluções foram adoptadas duas medidas. A primeira medida correspondeu à duplicação dos reagentes utilizados nos vários métodos. Por sua vez, a segunda medida baseou-se no cuidado em não colocar a zona central das soluções, onde predomina fortemente a presença do magneto, no centro da imagem visualizada pela *webcam*. As Figuras 54, 62, 63 e 65 ilustram alguns exemplos da interferência do magneto branco na determinação da cor das soluções.

A montagem do dispositivo para a realização do método “Seed” (Figuras 41 e 43) foi a montagem mais complicada de todo o trabalho desenvolvido, isto porque, neste método se atingem as maiores temperaturas e onde existiu um recipiente com areia em redor do balão com a solução e uma placa de aquecimento eléctrico debaixo de toda a montagem. Relativamente ao momento de adição do citrato de sódio ao HAuCl_4 em ebulição, verificou-se uma diferença nos valores de temperatura medidos pelos dois termómetros (90°C e 96°C para o termómetro de mercúrio e para o de IR, respectivamente). Pensa-se que esta diferença de 6°C se deveu ao facto de o balão com a

solução se encontrar sobre a areia quente, sendo que esta terá contribuído para o aumento de temperatura medido pelo termómetro de IR. A diferença de 6 °C entre os termómetros pode, ainda, ter-se devido a falhas na realização do protocolo de calibração do termómetro de IR, como referido na secção anterior.

Na análise da cor da solução “Seed” não foi apenas o magneto a interferir na mesma, mas também a condensação que ocorreu no interior do balão, impedindo que a *webcam* visualiza-se a solução nitidamente, como é ilustrado, por exemplo, na Figura 43 e, apesar menos perceptível, na Figura 46. Através da comparação das Figuras 48 e 49, onde se encontram imagens da solução “Seed” resultante do método, poderia concluir-se que a análise de cor feita pelo dispositivo estava incorrecta. Contudo, é importante destacar que o facto do balão com a solução estar sobre a areia impediu a passagem de luz na mesma, alterando deste modo a percepção de cor por parte do dispositivo e até mesmo a do olho humano. A determinação de cor de uma solução de NPs de ouro é fortemente dependente da quantidade e cor da luz que a atravessa.

A utilização do termómetro de IR no método em que se adiciona o 2º agente redutor à solução “Seed” pode ser questionável, isto é, contrariamente ao método anterior, em que foi necessário conhecer a temperatura da solução para lhe ser adicionado o citrato de sódio na altura certa, neste método o parâmetro temperatura não foi preciso ser conhecido. Visto que apenas era pedido que a solução “Seed” arrefecesse após a realização do método anterior.

Ao comparar as Figuras 51 e 55, relativas ao método de adição do 2º agente redutor, é possível observar que o dispositivo conseguiu detectar o aclaramento de cor da solução ao longo das duas horas, estando de acordo com o que na realidade aconteceu. Contudo, é importante referir que no final do método o gelo envolvente ao copo estava praticamente todo derretido, o que permitiu uma maior passagem de luz para a solução contribuindo consideravelmente para a detecção do aclaramento da cor.

No método “Growth”, que se realizou à temperatura ambiente de 26°C, recorreu-se apenas à utilização de um dos componentes do dispositivo, a *webcam*. As dificuldades sentidas na monitorização deste método centraram-se principalmente na reflexão de luz por parte do copo de precipitação onde decorria a reacção, na presença do magneto branco na solução e no baixo volume da mesma no copo de precipitação.

Através dos resultados obtidos no método “Seed Growth” ficou bem evidenciada a interferência do magneto branco e a reflexão de luz por parte do copo de precipitação na detecção da cor da solução. As Figuras 63 e 64, que se distanciam temporalmente em apenas 15 minutos, através da análise do dispositivo apresentam cores bastante diferentes, contudo na realidade a solução apresentava uma cor praticamente idêntica. Desta forma, evidencia-se mais uma vez a interferência do magneto branco e da reflexão de luz por parte do copo de precipitação na análise de cor das soluções. Além disso, ao comparar-se as Figuras 63 e 65 ou as Figuras 64 e 65, observa-se a diferença de cor analisada pelo dispositivo quando o magneto se encontra a girar e quando este se encontra parado.

6.1.3. Hipertermia de nanopartículas de ouro através de radiação laser

Nesta experiência foi utilizado apenas um dos componentes do dispositivo, nomeadamente, o termómetro de IR. O facto de se prescindir da utilização da *webcam* nesta experiência, deveu-se à

saturação da imagem da mesma, por causa da luz infravermelha proveniente do *laser*. Sendo que, através da filmagem da *webcam*, o fantoma seria um borrão cor de rosa.

Através do termómetro de IR foi possível obter a temperatura média do fantoma submetido à radiação laser. Na primeira medição, em que o fantoma foi irradiado durante 10 minutos, a temperatura máxima medida foi de aproximadamente 38°C. Na segunda medição, em que o fantoma foi irradiado durante 20 minutos, esta foi de aproximadamente 43°C. Observou-se que quanto mais tempo o fantoma era submetido à radiação laser, maior era a sua temperatura.

A radiação laser utilizada para a realização desta experiência apresentou um comprimento de onda de 808 nm, ou seja, é radiação laser de IR. Deste modo, para que a radiação do laser não interferisse nas medições feitas pelo termómetro sensível a radiação de IR, houve o cuidado de garantir que este não seria sensível ao comprimento de onda da radiação laser. Visto que o termómetro de IR MLX90614 é sensível entre os 2-15µm (2000-15000 nm), ou seja, o espectro de absorção do termómetro varia entre 2000-15000 nm, foi garantido que o termómetro não absorveu radiação laser (808 nm) durante a experiência.

Relativamente ao efeito da radiação laser nas *nanorods* de ouro, pode verificar-se que na primeira medição, onde foram atingidos 38 °C, parece não ter ocorrido libertação de corante das *nanorods*. Na segunda medição, verificou-se um aumento da temperatura média para 43 °C, mas não propriamente libertação de corante por parte das *nanorods*. De acordo com a imagem obtida na segunda medição (Figura 72) verificou-se que as *nanorods* sofreram activação, parecendo também que ocorreu a formação de uma bolha de ar, contudo, o processo de activação terá de ser melhorado.

A temperatura obtida pelo termómetro de IR dos fantasmas, resultou da temperatura média das *nanorods* e da restante área em seu redor (o agar e a estrutura da *cuvete*), porque a FOV de 90º do termómetro inclui as contribuições dos vários aglomerados de *nanorods*, do agar e da *cuvete*. Deste modo não se consegue inferir a temperatura das *nanorods* em particular, mas sim apenas a temperatura média do conjunto nanopartículas, agár e *cuvete*.

Além de tudo isto, a presente experiência foi centrada na aplicação clínico destes nanossistemas. Isto é, caso estas *nanorods* fossem utilizadas na veiculação de fármacos no interior do corpo humano (simulado pelo agár). Deste modo, seria ideal que as *nanorods* sofressem ruptura por hipertermia a temperaturas não muito superiores que 37 °C, que corresponde à temperatura do corpo humano, para que o paciente não sofresse destruição das suas células musculares e, consequentemente, destruição tecidual.

6.2. Limitações e Perspectivas Futuras

O termómetro de IR apresenta uma FOV de 90º o que pode ser considerada uma limitação, pois implica que o termómetro seja colocado muito próximo do objecto ao qual se pretende medir a temperatura. Por exemplo, durante o método “*Seed*”, em que são atingidas temperaturas ao redor dos 100 °C, o indicado teria sido afastar o termómetro do tacho com areia quente, porque este se encontra acoplado ao Arduino através de uma camada de silicone. Contudo, o afastamento não pode acontecer, pois o objectivo era medir a temperatura da solução “*Seed*” e para isso o termómetro teria de ficar mesmo muito próximo do balão com reacção.

Na hipertermia das *nanorods* de ouro verificou-se a impossibilidade de medição da temperatura exacta das mesmas quando submetidas à radiação laser. Por isso, sugere-se um estudo

profundo sobre as propriedades do agár, nomeadamente, sobre a sua capacidade de condução de calor, de forma a que seja possível inferir a temperatura das *nanorods* no fantoma.

Outra limitação encontrada no trabalho foi a utilização de uma *webcam* com ajuste de luz automático. Este ajuste automático de luz em certas montagens do dispositivo tornou a realização do protocolo de calibração da *webcam* uma tarefa complicada de realizar correctamente. Para o protocolo de calibração ser realizado correctamente o cartão preto deve ser posicionamento no campo de visão da *webcam*, de forma a que não reflecta demasiada luz para a mesma.

De forma a contribuir para a evolução do trabalho desenvolvido podem ser sugeridas diversas melhorias. Relativamente à GUI desenvolvida pode sugerir-se a introdução de uma secção onde fosse indicado o valor numérico em graus Celsius da temperatura lida pelo termómetro. Da mesma forma, poderia ser acrescentada à GUI uma secção com os valores numéricos dos canais RGB da cor retornada pelo dispositivo. Além disso, poderia ser introduzida a colocação de um *threshold* de temperatura com aviso sonoro para ser utilizado, por exemplo, no método “*Seed*” onde é necessário conhecer o momento em que a solução atinge aproximadamente os 95°C. Poderia também introduzir-se uma ferramenta na GUI que permitisse ao utilizador escolher a porção da imagem à qual pretendia que fosse realizada análise de cor. Desta forma, poderia contornar-se facilmente a zona branca da imagem correspondente ao magneto branco, eliminando o seu ruído na análise de cor da solução.

Futuramente, poderia colocar-se o dispositivo a funcionar por tempo indefinido. Isto é, de acordo com a oitava linha do código do Anexo VI, é dada a instrução de funcionamento limitado ao termómetro. Este funcionamento encontra-se limitado, porque o termómetro regista valores de temperatura num vector de dimensão finita, que sempre que estiver todo preenchido a GUI cessa. Relativamente aos dados fornecidos pelo dispositivo (temperatura e cor), seria interessante que fossem guardados no disco rígido do computador. Os dados ao serem guardados, permitiria ao utilizador realizar uma análise posteriormente, se assim o desejasse, visto que actualmente o dispositivo apenas guarda a última imagem captada pela *webcam*.

6.3. Conclusão

Em suma, pode concluir-se que o dispositivo conseguiu monitorizar o processo de síntese de NPs de ouro, bem como a sua activação por hipertermia mediada pelo feixe laser de infravermelhos. No entanto, existem diversas melhorias que se poderiam implementar ao dispositivo para facilitar a sua utilização e melhorar a sua apresentação da informação medida. Nomeadamente, facilitar a montagem dos componentes do dispositivo e a análise da cor através do desenvolvimento de uma ferramenta de selecção de porções da imagem às quais se analisaria a cor. Adicionalmente, para facilitar a realização do método “*Seed*”, poderia ser introduzido ao dispositivo um *threshold* sonoro de temperatura (aproximadamente 95 °C) para se conhecer o momento da adição do citrato de sódio à solução. De forma a melhorar a apresentação da informação disponibilizada pelo dispositivo, poderiam ser introduzidas secções na GUI com os valores numéricos da temperatura e dos canais RGB. Finalmente, e para tornar possível uma posterior análise à informação monitorizada pelo dispositivo, poderiam ser criados ficheiros onde esta seria guardada.

Bibliografia

- [1] M. C. Roco, M. Morrison, I. Malsch, K. Yamamoto, J. J. P. v. d. Beuken, X. F. Walboomers, J. A. Jansen, A. del Campo, I. J. Bruce, C. Shipbaugh, P. Antón, G. Bloom, B. Jackson, R. Silbergliitt e E. Schuler, *Biomedical Nanotechnology*, 1ª ed., N. H. Malsch, Ed., Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, 14 Abril, 2005, pp. xi-xiii.
- [2] M. Hosokawa, K. Nogi, M. Naito e T. Yokoyama, Edits., *Nanoparticle Technology Handbook*, 1ª ed., Oxford: Elsevier Science, Outubro, 2007, pp. 5-26.
- [3] G. L. Hornyak, J. J. Moore, H. F. Tibbals e J. Dutta, *Fundamentals of Nanotechnology*, 1ª ed., Boca Raton, Florida: CRC Press, 22 Dezembro, 2008, pp. 4-5.
- [4] S. Ramakrishna, M. Ramalingam, T. S. S. Kumar e W. O. Soboyejo, *Biomaterials a Nano approach*, 1ª ed., Boca Raton, Florida: CRC Press, 14 Junho, 2010, pp. 123-125.
- [5] S. Horikoshi and N. Serpone, Eds., *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications*, 1ª ed., Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, pp. 1-7.
- [6] C. A. Foss, Jr. e D. L. Feldheim, Edits., *Metal Nanoparticles Synthesis, Characterization and Applications*, New York: Marcel Dekker, 2002.
- [7] J. A. Creighton, C. G. Blatchford e M. G. Albrecht, "Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength," *Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, vol. 75, nº 0, pp. 790-798, 1979.
- [8] L. F. e. D. Sutherland, "Nano You," [Online]. Available: http://nanoyou.eu/attachments/501_EXPERIMENT%20C2_Student%20background%20reading.pdf. [Acedido em 22 Maio 2014].
- [9] L. Filipponi e D. Sutherland, "Nano you," Setembro 2010. [Online]. Available: http://nanoyou.eu/attachments/188_Module-1-chapter-5.pdf. [Acedido em 22 Maio 2014].
- [10] L. Filipponi e D. Sutherland, "Nano you," January 2010. [Online]. Available: http://nanoyou.eu/attachments/188_Module-1-chapter-4-proofread.pdf. [Acedido em 22 Maio 2014].
- [11] P. R. da Costa, "Biblioteca Digital de Teses e Dissertações," 2012. [Online]. Available: http://www.bdtcdn.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=273. [Acedido em 3 Junho 2014].
- [12] B. Nikoobakht e M. A. El-Sayed, "Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method," *Chemistry of Materials*, vol. 15, nº 10, pp. 1957-1962, 2003.

- [13] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot e A. Plech, "Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited," *Journal of Physical Chemistry B.*, vol. 110, pp. 15700-15707, 2006.
- [14] M. C. R. Casanova, "Biblioteca Digital: Teses e Dissertações," Setembro 2010. [Online]. Available: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-23062010-164224/pt-br.php>. [Acedido em 6 Junho 2014].
- [15] D. Huang, F. Liao, S. Moles, D. Redinger e V. Subramanian, "Plastic-Compatible Low Resistance Printable Gold Nanoparticle Conductors for Flexible Electronics," *ECS - The Electrochemical Society*, vol. 150, pp. 412-417, 2003.
- [16] "RP Photonics Encyclopedia," RP Photonics, [Online]. Available: http://www.rp-photonics.com/infrared_light.html. [Acedido em 23 Julho 2014].
- [17] C. Liu, C. C. Mi e B. Q. Li, "Energy absorption of gold nanoshells in hyperthermia therapy," *IEEE Transactions on NanoBioscience*, vol. 7, nº 3, pp. 206-214, 2008.
- [18] T. Stuchinskaya, M. Moreno, M. J. Cook, D. R. Edwards e D. A. Russel, "Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 10, pp. 822-831, 2011.
- [19] S. D. Brown, P. Nativo, J.-A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham e N. J. Wheate, "Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin," *Journal American Chemical Society*, vol. 132, nº 13, pp. 4678-4684, 2010.
- [20] M. E. Ali, U. Hashim, S. Mustafa, Y. B. Che Man e K. N. Islam, "Gold Nanoparticle Sensor for the Visual Detection of Pork Adulteration in Meatball Formulation," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2012, p. 7, 2011.
- [21] M. Arruebo, M. Valladares e Á. González-Fernández, "Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2009, p. 24 páginas, 2009.
- [22] S. D. Perault e W. C. W. Chan, "In vivo assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, nº 25, pp. 11194-11199, 2010.
- [23] G. Pench, U. Pisch, O. Adams, M. Hakim, N. Shehada, Y. Y. Broza, S. Bilan, R. Abdah-Bortnyak, A. Kuten e H. Haick, "Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles," *Nature Nanotech*, vol. 4, pp. 669-673, 2009.
- [24] D. T. Thompson, "Using gold nanoparticles for catalysis," *Nano Today*, vol. 2, nº 4, pp. 40-43, 2007.
- [25] L. Filipponi e D. Sutherland, "Nano you," Janeiro 2010. [Online]. Available: http://nanoyou.eu/attachments/188_Module-1-chapter-6-proofread.pdf. [Acedido em 22 Maio 2014].

2014].

- [26] Y. Kuk e P. Y. Silverman, "Scanning tunneling microscope instrumentation," *Review of Scientific Instruments*, vol. 60, nº 2, pp. 165-180, 1989.
- [27] "Individual Atom Manipulation," UW MRSEC Education Group, 7 Outubro 2014. [Online]. Available: <http://education.mrsec.wisc.edu/130.htm>. [Acedido em 28 Junho 2014].
- [28] D. A. Skoog, F. J. Holler e S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6 ed., Boston, Estados Unidos da América: Cengage Learning, 2007.
- [29] "Espectroscopia Raman," Núcleo de Pesquisa de Física Aplicada ao Estudo do Patrimônio Artística e Histórico - Instituto de Física da USP, 2013. [Online]. Available: <http://www.usp.br/faepah/?q=pt-br/espectroscopia-raman>. [Acedido em 7 Junho 2014].
- [30] "Comparative table between the MLX90614 and the MLX90615," [Online]. Available: <http://www.melexis.com/Assets/Comparative-table-between-the-MLX90614-and-the-MLX90615-5480.aspx>. [Acedido em 10 Agosto 2014].
- [31] "Definition of: plug and play," The Computer Language Company Inc., [Online]. Available: <http://www.pcmag.com/encyclopedia/term/49389/plug-and-play>. [Acedido em 22 Outubro 2014].
- [32] R. Fan, "SMBus Quick Start Guide," 2012. [Online]. Available: http://cache.freescale.com/files/32bit/doc/app_note/AN4471.pdf. [Acedido em 3 Fevereiro 2014].
- [33] "MLX90614 family," Julho 2008. [Online]. Available: <http://inmotion.pt/documentation/pololu/1061/MLX90614.pdf>. [Acedido em 2 Fevereiro 2014].
- [34] "Application Note: MLX90614 SMBus implementation in PIC MCU," Dezembro 2006. [Online]. Available: <http://www.melexis.com/Asset/MLX90614-SMBus-implementation-in-PIC-MCU-old-261-DownloadLink-5229.aspx>. [Acedido em 26 Fevereiro 2014].
- [35] "TO Headers," SCHOTT AG, 2014. [Online]. Available: http://www.schott.com/epackaging/english/opto/to_headers.html?so=brazil&lang=portuguese. [Acedido em 2 Outubro 2014].
- [36] "Infrared Thermometry Understanding and using the Infrared Thermometer," [Online]. Available: http://www.calex.co.uk/downloads/application_guidance/understanding_and_using_ir.pdf. [Acedido em 8 Março 2014].
- [37] "OVERVIEW instantaneous field of view," Oxford Reference, [Online]. Available: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803100005771>. [Acedido em 20 Abril 2014].
- [38] "What is Arduino?," Arduino, [Online]. Available: <http://arduino.cc/en/Guide/Introduction>. [Acedido em 3 Dezembro 2013].

- [39] “Part 2,” Screencast.com, [Online]. Available: <http://www.screencast.com/users/NanoSatisfi/folders/MLX90614%201/media/d5af72aa-d396-4e19-be96-dac623fe6fb5>. [Acedido em 10 Março 2014].
- [40] “Pull-up Resistors,” Sparkfun Electronics, [Online]. Available: <https://learn.sparkfun.com/tutorials/pull-up-resistors>. [Acedido em 2 Dezembro 2014].
- [41] “Fritzing,” Friends-of-Fritzing, [Online]. Available: <http://fritzing.org/home/>. [Acedido em 25 Novembro 2013].
- [42] “MATLAB GUI,” The MathWorks, Inc., [Online]. Available: <http://www.mathworks.com/discovery/matlab-gui.html>. [Acedido em 12 Março 2014].
- [43] “Vocabulário Internacional de Metrologia,” Novembro 2008. [Online]. Available: <http://www.ipq.pt/backFiles/VIM.pdf>. [Acedido em 17 Novembro 2014].
- [44] “Infrared Thermometer - MLX90614ESF-AAA (5V version),” In Motion, [Online]. Available: <http://www.inmotion.pt/store/infrared-thermometer-mlx90614esf-aaa-5v-version>. [Acedido em 8 Março 2014].
- [45] “Optical Microscope -vs- TEM -vs- SEM,” EMAL: Electron Microbeam Analysis Laboratory, [Online]. Available: http://www.emal.engin.umich.edu/courses/sem_lecturecw/SEM_microscopes.html. [Acedido em 6 Novembro 2014].
- [46] “Electrochemical etching of ultrasharp tungsten STM tips,” University of Michigan: Materials Science and Engineering, 2013. [Online]. Available: www.mse.engin.umich.edu/people/joannamm/projects/electrochemical-etching-of-ultrasharp-stm-tips/electrochemical-etching-of-ultrasharp-tungsten-stm-tips. [Acedido em 6 Novembro 2014].
- [47] “Minerals Technologies,” Minerals Technologies Inc., 2014. [Online]. Available: www.mineralstech.com/Pages/SMI/Pipe.aspx. [Acedido em 21 Julho 2014].
- [48] G. Lisensky, “IEG, Interdisciplinary Education Group,” 6 Fevereiro 2013. [Online]. Available: <http://education.mrsec.wisc.edu/nanolab/gold/>. [Acedido em 3 Maio 2014].
- [49] Y. H. Min, “Atomic-Scale Control of Surface Reactions Using Scanning Tunneling Microscope,” 2012. [Online]. Available: http://library.kaist.ac.kr/thesis02/2012/2012D020097030_S1Ver2.pdf. [Acedido em 27 Outubro 2014].
- [50] “Research on Biological Atomic Force Microscopy,” National Science Foundation, [Online]. Available: <http://web.physics.ucsb.edu/~hhansma/biomolecules.htm>. [Acedido em 8 Novembro 2014].
- [51] “Arduino Uno,” Arduino, [Online]. Available: http://arduino.cc/en/uploads/Main/ArduinoUno_R3_Front.jpg. [Acedido em 16 Janeiro 2014].

- [52] “Arduino Uno,” Arduino, [Online]. Available: http://arduino.cc/en/uploads/Main/ArduinoUno_R3_Back.jpg. [Acedido em 16 Janeiro 2014].
- [53] “Breadboard Mini Self-Adhesive Red,” InMotion, [Online]. Available: <http://www.inmotion.pt/store/breadboard-mini-self-adhesive-red>. [Acedido em 15 Janeiro 2014].
- [54] “Saving and Running a GUI,” The MathWorks, Inc., [Online]. Available: http://matlab.izmiran.ru/help/techdoc/creating_guis/simple_gui_example21a.html. [Acedido em 2 Abril 2014].

Anexo I

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **GUI.fig** que contém uma imagem da Interface Gráfica do Utilizador (GUI) do dispositivo desenvolvido no presente trabalho.

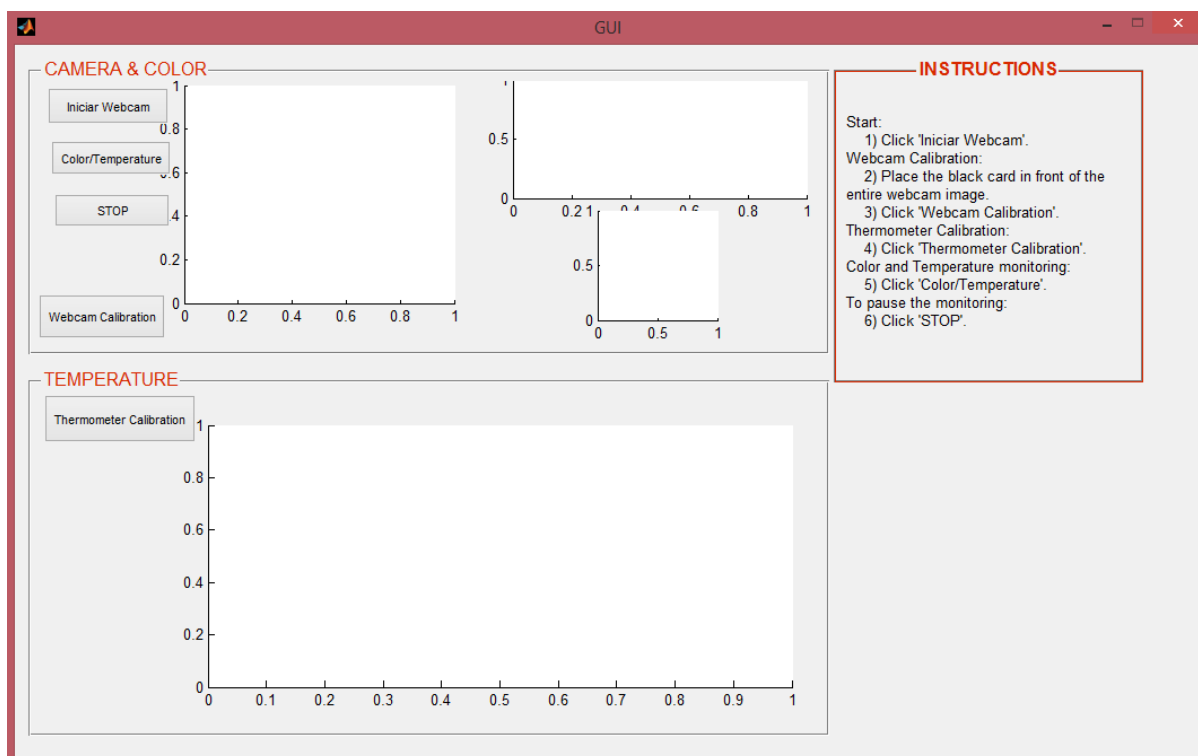


Figura 73: GUI.fig

Anexo II

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **GUI.m** que contém todos os *callbacks* utilizados para a criação da Interface Gráfica do Utilizador (GUI) do dispositivo desenvolvido no presente trabalho.

```
function varargout = GUI(varargin)
% GUI MATLAB code for GUI.fig
%   GUI, by itself, creates a new GUI or raises the existing
%   singleton*.
%
%   H = GUI returns the handle to a new GUI or the handle to
%   the existing singleton*.
%
%   GUI('CALLBACK',hObject,eventData,handles,...) calls the local
%   function named CALLBACK in GUI.M with the given input arguments.
%
%   GUI('Property','Value',...) creates a new GUI or raises the
%   existing singleton*. Starting from the left, property value pairs
%   are
%   applied to the GUI before GUI_OpeningFcn gets called. An
%   unrecognized property name or invalid value makes property
%   application
%   stop. All inputs are passed to GUI_OpeningFcn via varargin.
%
%   *See GUI Options on GUIDE's Tools menu. Choose "GUI allows only one
%   instance to run (singleton)".
%
% See also: GUIDE, GUIDATA, GUIHANDLES

% Edit the above text to modify the response to help GUI

% Last Modified by GUIDE v2.5 04-Nov-2014 13:48:07

% Begin initialization code - DO NOT EDIT
gui_Singleton = 1;
gui_State = struct('gui_Name',       mfilename, ...
                  'gui_Singleton',   gui_Singleton, ...
                  'gui_OpeningFcn', @GUI_OpeningFcn, ...
                  'gui_OutputFcn',  @GUI_OutputFcn, ...
                  'gui_LayoutFcn',  [], ...
                  'gui_Callback',    []);
if nargin && ischar(varargin{1})
    gui_State.gui_Callback = str2func(varargin{1});
end

if nargout
    [varargout{1:nargout}] = gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
else
    gui_mainfcn(gui_State, varargin{:});
end
% End initialization code - DO NOT EDIT

% --- Executes just before GUI is made visible.
function GUI_OpeningFcn(hObject,eventdata, handles, varargin)
% This function has no output args, see OutputFcn.
% hObject    handle to figure
```

```

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
% varargin command line arguments to GUI (see VARARGIN)
set(handles.axes1,'Visible','off')
set(handles.axes2,'Visible','off')
set(handles.axes3,'Visible','off')
set(handles.axes4,'Visible','off')
% Choose default command line output for GUI
handles.output = hObject;

% Update handles structure
guidata(hObject, handles);

% UIWAIT makes GUI wait for user response (see UIRESUME)
% uiwait(handles.figure1);

% --- Outputs from this function are returned to the command line.
function varargout = GUI_OutputFcn(hObject, eventdata, handles)
% varargout cell array for returning output args (see VARARGOUT);
% hObject handle to figure
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)

% Get default command line output from handles structure
varargout{1} = handles.output;

% --- Executes on button press in pushbutton1.
function pushbutton1_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to pushbutton1 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
global VidObj t calib_media_pixels yy y distance arduino
flag_1=1;
flag_2=1;
j=1;
t=0;

while (t==0)
    for flag_1=1
        ANALY_COLOR( VidObj,calib_media_pixels,handles );
        flag_1=0;
        flag_2=1;

        for flag_2=1
            [ y, arduino ] = THERMOMETER( j, handles );
            [ yy ] = THERM_Calibration( distance, y, j, handles );
            yy(j)
            THERM_PLOT( yy, j, handles );
            j=j+1
            flag_2=3;
        end
    end
end
guidata(hObject, handles);

% --- Executes on button press in pushbutton4.
function pushbutton4_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to pushbutton4 (see GCBO)

```

```

% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
global VidObj

%Webcam without preview(), because MATLAB confuses the colors when the
thermometer is turned on
[VidObj, handles]=CAMERA(handles);
guidata(hObject, handles);

% --- Executes on button press in pushbutton5.
function pushbutton5_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to pushbutton5 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
global arduino

fclose(arduino);
guidata(hObject, handles);

% --- Executes on button press in pushbutton6.
function pushbutton6_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to pushbutton6 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
global calib_media_pixels VidObj

[calib_media_pixels] = CAM_Calibration( VidObj, handles );

guidata(hObject, handles);

% --- Executes on button press in pushbutton7.
function pushbutton7_Callback(hObject, eventdata, handles)
% hObject handle to pushbutton7 (see GCBO)
% eventdata reserved - to be defined in a future version of MATLAB
% handles structure with handles and user data (see GUIDATA)
global distance

% answer=inputdlg(prompt,name,numlines,defaultanswer,options);
options.Resize='on';
distance=inputdlg('Introduce distance thermometer-object
(cm):','Thermometer Calibration',1,{'1'},options);

guidata(hObject, handles);

```

Anexo III

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **CAMERA.m** que contém a função CAMERA() que implementa o algoritmo de utilização da *webcam* no dispositivo.

```
function [VidObj, handles]=CAMERA( handles )
%UNTITLED3 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here

try
VidObj= videoinput('winvideo',1,'YUY2_640x480');
VidObj.ReturnedColorspace = 'rgb'; %senao aparecem mal as cores da imagem
handles.VidObj=VidObj;
VidObj=1; % captura de imagens

%Make the aspect ratio of the axes the same as the aspect ratio of the
camera.

vidRes = get(handles.VidObj, 'VideoResolution');
nBands = get(handles.VidObj, 'NumberOfBands');
axes(handles.axes1)
hImage = image( zeros(vidRes(2), vidRes(1), nBands) );
preview(handles.VidObj, hImage)

catch E
    msgbox({'WARNING!',' ',E.message},'CAM INFO')
end
end
```

Anexo IV

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **CAM_Calibration.m** que contém a função `CAM_Calibration()` que implementa o algoritmo de utilização da *webcam* no dispositivo.

```
function [ calib_media_pixels ] = CAM_Calibration( VidObj, handles )
%UNTITLED Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
vid=getsnapshot(handles.VidObj);
imwrite(vid,'vid.tif','tif');
I=imread('vid.tif');
I2=imcrop(I,[120 140 400 200]); %vid.tif --> size:480x640x3
imshow(I2,'parent',handles.axes2)

Px=random('Poisson',100:21:300); %gerar 10 pts entre 100 e 300
Py=random('Poisson',30:15:170); %gerar 10 pts entre 30 e 170

pixels=impixel(I2,Px,Py);
calib_media_pixels=round(sum(pixels/10));
matriz=zeros(255,255,3);

for a=1:255
    for b=1:255
        matriz(a,b,1)=calib_media_pixels(1);
        matriz(a,b,2)=calib_media_pixels(2);
        matriz(a,b,3)=calib_media_pixels(3);
    end
end

imshow(matriz/255,'parent',handles.axes3)
drawnow

end
```

Anexo V

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **ANALY_COLOR.m** que contém a função ANALY_COLOR() que implementa o algoritmo de utilização da *webcam* no dispositivo.

```
function ANALY_COLOR( VidObj, calib_media_pixels, handles )
%UNTITLED4 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here

vid=getsnapshot(handles.VidObj);
imwrite(vid,'vid.tif','tif');
I=imread('vid.tif');
I2=imcrop(I,[120 140 400 200]); %vid.tif --> size:480x640x3
imshow(I2,'parent',handles.axes2)

Px=random('Poisson',100:21:300); %gerar 10 pts entre 100 e 300
Py=random('Poisson',30:15:170); %gerar 10 pts entre 30 e 170

pixels=impixel(I2,Px,Py);
media_pixels=round(sum(pixels/10));
matriz=zeros(255,255,3);

for a=1:255
    for b=1:255
        matriz(a,b,1)=media_pixels(1)-calib_media_pixels(1);
        matriz(a,b,2)=media_pixels(2)-calib_media_pixels(2);
        matriz(a,b,3)=media_pixels(3)-calib_media_pixels(3);
    end
end

imshow(matriz/255,'parent',handles.axes3)

% The result using snapnow or drawnow is the same
%snapnow
drawnow
%drawnow expose

%pause on
%pause(0.01);
%delay(0.01);
end
```


Anexo VI

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **THERMOMETER.m** que contém a função THERMOMETER() que implementa o algoritmo de utilização do termómetro de infravermelhos no dispositivo.

```
function [ y, arduino ] = THERMOMETER( j, handles )
%UNTITLED5 Summary of this function goes here
%   Detailed explanation goes here

% cla(handles.axes4,'reset')
delete(instrfind({'Port'},{'COM3'}));

arduino=serial('COM3','BaudRate',9600);
fopen(arduino);

y=zeros(1,10000);
y(j)=fscanf(arduino,'%d');

end
```

Anexo VII

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **THERM_Calibration.m** que contém a função THERM_Calibration() que implementa o algoritmo de utilização do termómetro de infravermelhos no dispositivo.

```
function [ yy ] = THERM_Calibration( distance, y, j, handles )
%UNTITLED2 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here

yy=zeros(1,10000);

if ~isnumeric(distance) || (str2num(distance{1})==0.5)
    yy(j)=(y(j)-0.5947)/0.9581;
elseif ~isnumeric(distance) || (str2num(distance{1})==1)
    yy(j)=(y(j)-2.4929)/0.883;
elseif ~isnumeric(distance) || (str2num(distance{1})==1.5)
    yy(j)=(y(j)-3.3087)/0.8418;
elseif ~isnumeric(distance) || (str2num(distance{1})==2)
    yy(j)=(y(j)-5.4848)/0.7571;
elseif ~isnumeric(distance) || (str2num(distance{1})==2.5)
    yy(j)=(y(j)-5.0783)/0.7624;
end

end
```

Anexo VIII

Neste anexo apresenta-se o ficheiro intitulado **THERM_PLOT.m** que contém a função THERM_PLOT() que implementa o algoritmo de utilização do termómetro de infravermelhos no dispositivo.

```
function THERM_PLOT( yy, j, handles )
%UNTITLED3 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here

set(handles.axes4,'Visible','on')
title(handles.axes4,'Real-time Temperature Readings, \circC')
xlabel(handles.axes4,'Samples')
ylabel(handles.axes4,'Temperature(\circC)')

%THRESHOLD
y2=85;

plot(handles.axes4,j,yy,'--rs',j,y2)
grid on
drawnow
% axis(handles.axes4,'auto')
hold(handles.axes4,'on')
end
```

Carolina Maria Gomes Bértolo

Janeiro 2015