

Luís André Ferreira dos Reis

Construção de uma célula para Calorimetria Fotoacústica com controlo térmico

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,
área de especialização em Química Avançada**

Orientador

Professor Doutor Luís Arnaut

Co-orientadores

Doutor Fábio Schaberle

Doutor Carlos Serpa

Setembro 2011

Universidade de Coimbra

*“A ambição da Ciência não é abrir a porta do
saber infinito, mas pôr um limite ao erro
infinito!”*

Bertolt Brecht

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Luís Arnaut que aguçou este meu gosto pelas Ciências Experimentais. Recordarei sempre as reuniões do grupo de Fotoquímica na Sala de Seminários do 2º andar, no início deste ano lectivo onde, num ambiente de “cumplicidade científica”, valorizou a partilha do conhecimento, com comentários sempre construtivos e palavras de incentivo.

Agradeço ao Doutor Fábio Schaberle que me ensinou a aplicar, com rigor, o método científico. Agradeço-lhe a disponibilidade infatigável, a paciência com que respondeu às minhas dúvidas e ansiedades, a cumplicidade com que acolheu e valorizou todas as minhas pequenas descobertas; em suma, a orientação atenta e dedicada.

Agradeço ao Doutor Carlos Serpa o facto de ter apoiado as minhas propostas, com um entusiasmo científico contagiante. Acreditou, de imediato, neste projecto tendo, ao longo do processo, incentivado a inovação.

Agradeço, por isso, a todos a oportunidade de ter pertencido a um grupo de investigação coeso e dinâmico; o sentimento de pertença ao grupo estimulou o meu gosto pelas ciências experimentais. Quero ainda agradecer a todos a oportunidade de ver uma parte do meu trabalho experimental reconhecido num artigo publicado.

Agradeço à Doutora Maria da Graça Carvalho, professora no Departamento de Engenharia Química, o facto de me ter tranquilizado e contribuído com sugestões oportunas.

Agradeço ao Professor Manuel Bento, Director Executivo do Centro de Estudos de Fátima, local onde lecciono, o facto de me ter atribuído um horário de trabalho que permitiu a minha deslocação a Coimbra, durante estes dois anos.

Agradeço também aos meus amigos, Dino, pela ajuda preciosa no âmbito dos desenhos técnicos e desenhos 3D, ao Rui Telmo e Joel Reis, pela agradável troca de ideias, sempre saudável entre pessoas que gostam de Ciência.

Finalmente, agradeço à minha família, especialmente à minha mulher e aos meus filhos, sempre presentes, a compreensão, o estímulo, o apoio e o interesse pela investigação que fui levando a cabo.

Índice

	Página
Índice.....	i
Abreviações.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Capítulo 1- Introdução.....	1
Capítulo 2 - Fundamentação Teórica.....	5
2.1 – Teoria da Calorimetria Fotoacústica (PAC).....	5
2.1.1 – Processos fotofísicos de desactivação molecular.....	6
2.1.2 – Relação da fotoacústica com a termodinâmica.....	7
2.1.3 – Relação da fotoacústica com processos quânticos.....	8
2.2 – Propriedades termodinâmicas e acústicas da água.....	11
2.3 – Espectro de absorção da água.....	13
Capítulo 3 – Objectivo.....	15
Capítulo 4 – Experimental.....	16
4.1 – Material e métodos.....	16
4.2 – Procedimento experimental.....	16
Capítulo 5 - Resultados e Discussão.....	17
5.1-Concepção e construção da célula fotoacústica.....	17
5.1.1 – Bloco 1.....	18
5.1.2 – Bloco 2.....	19
5.1.3 – Separador.....	20
5.1.4 – Acoplamento do transdutor piezoeléctrico.....	22
5.2 – Sistema térmico.....	22
5.2.1 – Banho controlador da temperatura.....	23
5.2.2 – Banho externo de pré-arrefecimento.....	23
5.2.2.1 – Propriedades térmicas do banho externo de pré-arrefecimento.....	24
5.2.2.2 - Propriedades térmicas da serpentina.....	25
5.2.3 – Sistema térmico dos blocos (1 e 2) termostáticos.....	30
5.2.4 – O isolamento exterior da célula.....	31
5.2.4.1 – Construção do isolamento exterior da célula.....	31
5.2.4.2 – Eficiência teórica do isolamento exterior da célula.....	31
5.2.4.3 - Eficiência experimental do isolamento exterior da célula.....	37
5.3 – Coeficiente de expansão térmica.....	44

5.3.1 – Espectro Fotoacústico (NIR).....	45
5.3.2 - Coeficiente de expansão térmica da água destilada.....	45
5.3.3 - Coeficiente de expansão térmica de soluções salinas.....	49
Capítulo 6 - Conclusões e trabalho futuro.....	51
6.1 – Conclusões.....	51
6.2 – Trabalhos futuros.....	52
Capítulo 7 – Bibliografia.....	57
Apêndice.....	A
A ₁ – Desenhos Técnicos.....	A1
A ₂ – Artigo Publicado.....	A2

Abreviações

A_s	Área da superfície
C_p	Capacidade Térmica mássica
D_H	Diâmetro hidráulico
h	Coefficiente de transferência de calor por convecção
IC	Internal Conversion
I_A	Intensidade da luz absorvida
I_0	Intensidade da luz incidente
ISC	Inter system Crossing
k	transferência de calor por condução
L_H	Comprimento de entrada hidrodinâmico
L_T	Comprimento de entrada térmico
LPC	Layered Prism Cell
MP	Módulo Peltier
NIR	Near Infrared Radiation
Nu	Número de Nusselt
Nu_D	Número de Nusselt Hidráulico
Nu_L	Número de Nusselt para paredes planas
OPO	Optical Parametric Oscillator
PA	Photoacoustic signal
PAC	Photoacoustic Calorimetry
Pr	Número de Prandtl
q'	Fluxo de calor
Q	Quantidade de calor transferido
Q_v	Caudal volumétrico ou fluxo
Re	Número de Reynolds
Re_D	Número de Reynolds Hidráulico
r_H	Raio hidráulico
T_{front}	Temperatura à frente
T_{back}	Temperatura atrás
$T_{\alpha=0}$	Valor da temperatura para a qual o sinal fotoacústico é nulo
T_S	Temperatura da parede
u_∞	Velocidade fora dos gradientes de temperatura
μ	Viscosidade do fluido

Resumo

Neste trabalho foi apresentado o projecto, construção e testes de certificação de uma célula para Calorimetria Fotoacústica com rigoroso controlo da temperatura. Este controlo é vital para eliminar o sinal fotoacústico por deposição de calor em soluções aquosas (coeficiente de expansão térmica, $\alpha=0$), permitindo quantificar apenas o sinal produzido por mudanças volumétricas. Uma das principais aplicações será no estudo de (des)enovelamento de proteínas. A célula foi construída em aço ($C_p=480$ J/kg K) e foi projectada com canais internos por onde deve passar o fluido termostático vindo de um banho externo para o controlo da temperatura. O corpo da célula foi isolado termicamente do ambiente externo por um sistema constituído por uma borracha elastómera de K Flex ST de baixa condutividade térmica ($k=0,034$ W/m K). Com o intuito de controlar com rigor a temperatura da solução da amostra, foi projectado e construído um sistema de pré-arrefecimento da solução. É constituído por uma serpentina de aço (por onde passa a amostra) imersa num banho termostático de alumínio, ligado em série com o banho controlador da temperatura e a célula. Os valores da temperatura da amostra, medidos na célula, foram iguais aos valores medidos no banho da serpentina, mostrando não haver trocas de calor entre estes dois sistemas, garantindo boa eficiência no controlo da temperatura. O controlo térmico foi estudado para água pura e em diferentes concentrações de sais (NaCl e soluções tampão de fosfato) excitando o overtone da água a 2000 nm (5000 cm⁻¹) e recolhendo o sinal fotoacústico num intervalo de -1°C a 15°C. Os valores das temperaturas para os quais o coeficiente de expansão térmica é zero foram: 3,0 °C para água pura; 2,75°C, 2,53°C e 1,89°C para as concentrações em NaCl de 5 mM, 10 mM e 50 mM, respectivamente; 2,97°C, 2,43°C e 1,92 para as concentrações em tampão fosfato de 5 mM, 10 mM e 50 mM, respectivamente. A relação da força iónica com a temperatura à qual $\alpha=0$, mostrou que a partir de 0,05 M C² de força iónica, a temperatura estabiliza.

Abstract

A cell for time resolved photoacoustic calorimetry (PAC) with temperature control was developed and tested. The temperature control is critical in the study of PAC signal generated only by volume changes, meaning that the photoacoustic signal generated by heat deposition in aqueous solutions (thermal expansion coefficient, $\alpha=0$) must be avoided. One of the main applications of volume changes measurements is in the study of proteins folding/unfolding. The cell was made in steel ($C_p=480$ J/kg K) and designed with internal channels where the thermostatic fluid from an external bath flows controlling the temperature. The cell body was insulated with an elastomeric rubber system K Flex ST with low thermal conductivity ($k=0,034$ W/m K). In order to achieve a rigorous temperature control of the sample solution, a system of pre-refrigeration was built being composed of steel serpentine (where the sample flows) immersed in a thermostatic bath connected with the bath of temperature controller and the cell. Certification of all system were made measuring the sample temperature values in the cell body. These temperatures were the same of that measured in the serpentine bath, ensuring a good efficiency in the temperature control. The thermal control was also studied measuring the photoacoustic signal in pure water and at different salt concentrations (NaCl and Phosphate buffer solutions) exciting the water overtone at 2000 nm (5000 cm⁻¹) with temperature ranging from -1°C to 15°C. The temperature in which the thermal expansion coefficient is zero were: 3.0 °C for pure water; 2.75 °C, 2.53 °C and 1.89°C for NaCl concentrations at 5 mM, 10 mM and 50 mM, respectively; 2.97°C, 2.43°C and 1.92°C for Phosphate buffer solutions at 5 mM, 10 mM and 50 mM, respectively. The relationship between the ionic strength and the temperature given $\alpha=0$, showed that for values of ionic strength higher than 0.05 M C² the temperature to obtain $\alpha=0$ does not change.

Capítulo 1 - Introdução

O fenómeno fotoacústico foi descoberto por A. G. Bell [1] em meados de 1880. Este baseia-se na produção de uma onda acústica (ultrassom) num meio pela interacção dos fotões com a matéria. Um dos processos que pode gerar onda fotoacústica é a absorção de luz pelas moléculas e posterior deposição de calor através da conversão interna (IC) gerando uma onda de pressão. A onda de pressão gerada contém toda a informação sobre as características energéticas e temporais da molécula que produziu o decaimento. A partir daí, a calorimetria fotoacústica resolvida no tempo (PAC) tem sido usada para determinar as energias dos estados excitados, rendimentos quânticos de formação e tempos de vida destes, com importante aplicação na fotoquímica e fotofísica de processos mono e bi-moleculares [2]. A Calorimetria fotoacústica tem demonstrado ser uma técnica experimental versátil e complementar a outras, como a *flash-photolysis*, uma vez que a PAC baseia-se nos decaimentos não-radiativos e tem sensibilidade de detecção o que permite trabalhar com soluções em baixas concentrações.

O desenvolvimento inicial da PAC como técnica espectroscópica foi feito por Ducharme et al. [3], Braslavsky et al. [4] e Peters et al. [5] sendo estes trabalhos rapidamente desenvolvidos por outros autores [6,7,8,9,10]. O principal aspecto de melhoria da técnica deu-se no desenvolvimento da célula fotoacústica.

Em 1979, Ducharme e al. [3] descreveram uma célula fotoacústica como sendo simples de usar, fácil de construir, apresentando boa sensibilidade e boa relação sinal/ruído. Desenvolveram uma célula com o intuito de ser usada em moléculas fotossensíveis onde tentaram obter o melhor sinal sem aumentar a intensidade da fonte de luz ou reduzir o tamanho do porta-amostras. Esta célula foi desenhada para o estudo de sólidos e líquidos e tinha um percurso óptico fixo. O corpo da célula foi produzido em aço inoxidável polido, pois era de fácil limpeza e foi preferido ao alumínio uma vez que é quimicamente inerte. A janela utilizada era de quartzo para permitir um amplo espectro de transmitância. O microfone foi colocado segundo um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz incidente e a uns milímetros de distância do compartimento da amostra para minimizar o espalhamento de luz na direcção do microfone. Braslavsky et al. [4] e Peters et al. [5] usaram e desenvolveram a célula fotoacústica com o mesmo design anteriormente descrito. Em 1989, Melton [6] e posteriormente em 1992, Arnaut

[7] desenvolveram uma célula muito sensível apresentando uma boa relação sinal/ruído. Esta célula permitiu uma resolução melhor dos tempos de decaimento dos transientes e apresentava uma redução dos efeitos de reflexão. Esta nova célula foi baseada na geometria de irradiação frontal. A célula consistia numa janela de quartzo, transparente ao comprimento de onda do laser, e um espelho dieléctrico, com elevada reflectividade ao comprimento de onda do laser, separados por um anel de cobre de espessura variável de 0,05 a 1 mm que determinava o caminho óptico. Através do caminho óptico a solução era passada em fluxo através de uma bomba. O laser incidia perpendicularmente na janela de quartzo atravessando a solução e sendo reflectido pelo espelho dieléctrico fazendo com que o caminho óptico ficasse com duas vezes o tamanho do anel separador. A onda fotoacústica gerada na célula era detectada por um transdutor piezoeléctrico colocado na parte de trás do espelho dieléctrico. A principal vantagem desta geometria é a melhoria na relação sinal/ruído melhorando a capacidade para se trabalhar com soluções diluídas e menores energias de laser, quando comparadas com o método com irradiação perpendicular, melhorando muito a resolução temporal e a capacidade de separar decaimentos consecutivos.

Em 1995, Puchencov [8] introduziu modificações importantes na célula de geometria de irradiação frontal. A solução da amostra é comprimida entre uma janela de quartzo transparente e um espelho dieléctrico com elevada reflectividade. O espaçamento entre a janela transparente e o espelho dieléctrico é definido com teflon para percursos ópticos pequenos ou com espaçadores de aço para percurso ópticos maiores. As principais inovações desta célula são a entrada e saída da solução que se faz pela janela de quartzo e apresenta mecanismos de controlo da temperatura. O corpo da célula é de aço, apresenta cavidades no interior por onde circula um líquido termostático e é isolada com folhas de borracha porosa. A solução da amostra é pré-termostatizada num banho exterior à célula. Em 1998, Autrey [9,10] desenvolveu uma nova geometria para a célula fotoacústica que faz uso de um par de prismas, LPC (*layered prism cell*). Nesta célula, a luz do laser incide lateralmente numa das faces do prisma e chega com um ângulo incidente de 45° na interface prisma/líquido. A luz pulsada do laser é então refractada pela solução gerando uma onda de pressão que será detectada por um transdutor o qual não está na mesma direcção da luz do laser, *Fig.1*.

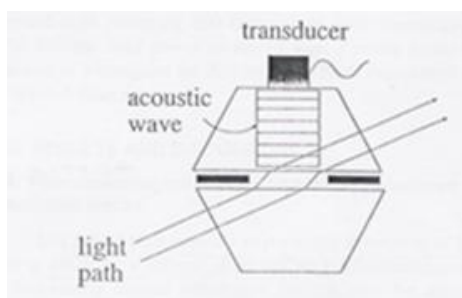


Fig 1 - A luz transmitida atravessa os prismas e gera uma onda fotoacústica paralela ao transdutor. A onda de pressão acústica propaga-se através do prisma com a velocidade do som respectiva até ao transdutor [9,10].

Esta célula proporciona uma boa flexibilidade espectroscópica combinando um aumento da resolução temporal com a isenção de ruído de fundo na célula, dado que o laser não incide na direcção do transdutor.

Do ponto de vista instrumental, para além da melhoria da célula PAC, do desenvolvimento de lasers, OPO (optical parametric oscillator) e osciloscópios para a recolha de dados, que contribuíram para melhorar a qualidade de aquisição de dados, foi muito relevante para o desenvolvimento da PAC a melhoria dos métodos de desconvolução das ondas fotoacústicas. Foram concebidos novos sistemas de análises de dados, tendo-se hoje *software* disponível para análise através da internet [11].

A aplicação desta técnica espectroscópica tem tido algum relevo em diferentes tipos de estudos. Um deles é na determinação do rendimento quântico e tempo de vida do estado tripleto ou da energia do estado tripleto T_1 . Outra aplicação importante da PAC que tem sido desenvolvida é no estudo do enovelamento de proteínas [12,13,14,15] Estes são processos que geram uma onda fotoacústica, PA, por alteração de volume e são a principal aplicação para a qual este trabalho foi desenvolvido. Para estudar a geração de onda PA exclusivamente por alteração volumétrica é necessário achar uma condição em que decaimentos não radiativos, ou deposição de calor, não produzam uma onda PA. Esta condição ocorre para a água a 3,98 °C. Nesta temperatura o coeficiente de expansão térmica é nulo e varia com a concentração de iões na solução. Portanto, próximo desta condição, os parâmetros termoelásticos dependem fortemente da temperatura, especialmente devido ao coeficiente de expansão térmica, obrigando a um controlo rigoroso da temperatura na célula fotoacústica. Para atingir a condição do coeficiente de expansão térmico igual a zero é imperativo que a célula fotoacústica tenha um excepcional controlo da temperatura tanto no que diz respeito à precisão do valor da temperatura do líquido dentro da célula quanto à manutenção dessa temperatura durante a experiência.

Neste projecto, foi desenvolvida uma célula PAC acoplada a um sistema térmico,

que comportasse as características técnicas da geometria de irradiação frontal da célula existente no Laboratório de Fotoquímica. Para um controlo eficiente da temperatura da amostra e do corpo da célula, foi desenvolvido um sistema de banho com serpentina. Foram levadas em conta algumas características que influenciam a prática experimental, tais como, a facilidade na montagem/desmontagem para limpeza e troca de componentes. Para testar a montagem final da célula fotoacústica, várias experiências foram realizadas com água pura e soluções aquosas com diferentes concentrações de sal.

Capítulo 2 - Fundamentação Teórica

2.1 - Teoria da Calorimetria Fotoacústica (PAC)

Os mecanismos de geração de uma onda de pressão por interacção com a radiação dependem, basicamente, da intensidade da radiação. Sigrist [16] descreve cinco mecanismos responsáveis pela geração de ondas acústicas: (1) quebra dielétrica do

geração de onda acústica pela pressão da radiação é muito menor em comparação com os anteriores, pelo que pode ser negligenciado neste contexto.

Além destes efeitos directos da produção de uma onda fotoacústica existem ainda os efeitos produzidos por reacções fotoquímicas que podem gerar ondas fotoacústicas tanto por calor como por variação de volume.

2.1.1 - Processos fotofísicos de desactivação molecular

O início do processo fotoacústico dá-se pela absorção de um fóton por uma molécula:

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (1)$$

Em que ϵ é o coeficiente de absorção molar ($dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), C a concentração ($mol \cdot dm^{-3}$) e l (cm) o caminho óptico dado pelo tamanho da célula. Logo, a intensidade de luz absorvida por uma amostra é determinada pela equação de Beer-Lambert:

$$I_A(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot (1 - 10^{-A(\lambda)}) \quad (2)$$

Após a absorção de um fóton, a molécula passa para um estado excitado n^* e a partir daí iniciam-se os processos de desactivação molecular. Ao absorver um fóton, a molécula sai do seu estado fundamental (maioritariamente singuleto) de energia S_0 sendo excitada para níveis mais altos S_n . Deste último estado, a molécula perde parte da energia no processo não-radiativo de conversão interna (*internal conversion*, IC) com tempos da ordem dos picosegundos até o estado S_1 de energia, ou completamente, voltando para o estado S_0 . A partir do estado S_1 , a molécula pode voltar para o estado S_0 com emissão de um fóton (fluorescência) ou através de IC. Mas também pode ocorrer o processo isoenergético de conversão intersistemas (*inter system crossing*, ISC) ocorrendo a inversão do spin e levando a molécula para um estado de energia tripleto T_n . Todos estes processos são competitivos. No estado T_n a molécula vai para o estado T_1 através de IC podendo voltar ao S_0 por ISC ou emissão de um fóton (fosforescência) ou ainda transferir a sua energia para outra molécula num processo bimolecular.

$$-\frac{d[n^*]}{dt} = k \cdot [n^*] \quad (3)$$

$$[n^*] = [n^*]_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4)$$

As equações (3) e (4) referem-se à velocidade de desaparecimento das moléculas no estado excitado em função do tempo por vários processos competitivos com uma constante cinética de desactivação $k = \frac{1}{\tau}$, em que τ é o tempo de vida do estado excitado. Esta constante inclui as constantes individuais de cada processo competitivo k_i que contribuem para a desactivação. A *tabela 1* apresenta a ordem das constantes cinéticas para cada processo competitivo. A *tabela 2* contém os valores dos rendimentos quânticos de cada processo de desactivação em função das constantes cinéticas.

Tabela 1 – Processos de relaxação radiativos e não radiativos e respectiva escala temporal.

<i>Processo</i>	<i>Transição</i>	<i>Escala de tempo k (s⁻¹)</i>
Fluorescência (k_{fluo})	Radiativa ($S_1 \rightarrow S_0$)	$10^6 - 10^9$
Conversão interna (k_{IC})	Não Radiativa ($S_1 \rightarrow S_0$)	$10^{12} - 10^{14}$
Cruzamento inter-sistemas (k_{ISC})	Não Radiativa ($S_1 \rightarrow T_1$)	$10^6 - 10^{11}$
	Não Radiativa ($T_1 \rightarrow S_0$)	$10^3 - 10^8$
Fosforescência (k_{fos})	Radiativa ($T_1 \rightarrow S_0$)	$10^2 - 10^4$

Tabela 2 – Rendimentos quânticos associados aos processos.

<i>Rendimento Quântico</i>	
Φ	
Fluorescência	$\Phi_{fluo} = \frac{k_{fluor}}{k_{fluo} + k_{IC} + k_{ISC} + k_I[Q]}$
Cruzamento inter-sistemas (<i>ISC</i>)	$\Phi_{ISC} = \frac{k_{ISC}}{k_{fluo} + k_{IC} + k_{ISC} + k_I[Q]}$

2.1.2 - Relação da fotoacústica com a termodinâmica

Numa experiência PAC, quando a luz do laser é absorvida pelo soluto num solvente gera estados electronicamente e/ou vibracionalmente excitados. Do ponto de vista da termodinâmica, a onda de pressão gerada por processos não radiativos de deposição de calor causa uma mudança na entalpia, H , da solução dada por [2,7,10,14],

$$H_{TH} = C_p \cdot V_0 \cdot \rho \cdot \Delta T \quad (5)$$

onde C_p é a capacidade térmica mássica em $(J/kg.K)$, ρ é a densidade da solução em (kg/m^3) , V_0 é o volume irradiado da solução (m^3) e ΔT a variação da temperatura em (K) . O aumento na pressão devido à deposição de calor no solvente é dado por,

$$\Delta P = \frac{\alpha}{k_T} \cdot \Delta T \quad (6)$$

onde α é o coeficiente de expansão térmica $(^{\circ}C^{-1})$ e k_T a compressibilidade isotérmica (Pa^{-1}) . Das equações (5) e (6) pode determinar-se a variação de pressão da solução em função da variação da entalpia, dada por,

$$\Delta P = \left[\frac{1}{\rho \cdot C_p} \cdot \frac{\alpha}{k_T} \right] \cdot \frac{H_{TH}}{V_0} \quad (7)$$

A equação 7 mostra que a variação de pressão fotoinduzida é proporcional ao calor depositado. Portanto, numa experiência fotoacústica, a variação de pressão pode ser determinada conhecendo-se as propriedades termoelásticas do solvente e usando um transdutor calibrado. A amplitude do sinal fotoacústico, PA, é proporcional à variação de pressão fotoinduzida, daí pode escrever-se,

$$PA = K \cdot \Delta P \quad (8)$$

A constante de proporcionalidade, K , depende de factores instrumentais e da geometria da experiência.

Além da onda fotoacústica gerada por processos térmicos, uma onda também pode ser gerada por mudanças de volume molecular durante o processo de excitação e desactivação. Para medir apenas efeitos produzidos por mudança de volume deve-se trabalhar num regime onde o coeficiente de expansão térmico da água seja zero, ou seja $\alpha=0$.

2.1.3 - Relação da fotoacústica com processos quânticos

A cinética de um processo fotoquímico é descrita pela função calor $H(t)$ [18,19,20]. Para uma reacção envolvendo 3 passos consecutivos de primeira ordem,



as concentrações do reagente e das espécies intermediárias consecutivas são dadas pelas equações diferenciais seguintes,

$$v_A = -\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] \quad (10)$$

$$v_B = -\frac{d[B]}{dt} = -k_1[A] + k_2[B] \quad (11)$$

$$v_C = -\frac{d[C]}{dt} = -k_2[B] + k_3[C] \quad (12)$$

que têm soluções dadas por,

$$[A] = [A]_0 \exp(-k_1 t) \quad (13)$$

$$[B] = [A]_0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad (14)$$

$$[C] = [A]_0 k_1 k_2 \left[\frac{\exp(-k_1 t)}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1)} + \frac{\exp(-k_2 t)}{(k_1 - k_2)(k_3 - k_2)} + \frac{\exp(-k_3 t)}{(k_1 - k_3)(k_2 - k_3)} \right] \quad (15)$$

A deposição de calor no meio pode ser descrita em termos das suas velocidades sendo estas proporcionais às concentrações das espécies, onde as constantes de proporcionalidade são as correspondentes constantes de velocidade,

$$v_A = \frac{dH_A}{dt} = H_A(t) = k_1[A] = \phi_1 k_1 \exp(-k_1 t) \quad (16)$$

$$v_B = \frac{dH_B}{dt} = H_B(t) = k_2[B] = \phi_2 \frac{k_1}{k_2 - k_1} [\exp(-k_1 t) - \exp(-k_2 t)] \quad (17)$$

$$\begin{aligned} v_C &= \frac{dH_C}{dt} = H_C(t) = k_3[C] \\ &= \phi_3 k_1 k_2 k_3 \left[\frac{\exp(-k_1 t)}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1)} + \frac{\exp(-k_2 t)}{(k_1 - k_2)(k_3 - k_2)} + \frac{\exp(-k_3 t)}{(k_1 - k_3)(k_2 - k_3)} \right] \end{aligned} \quad (18)$$

As fracções de energia do laser, E_{hv} , depositadas no meio são dadas por,

$$\phi_1 = \frac{E_{hv} - E_B}{E_{hv}}, \text{ para } A \xrightarrow{k_1} B \quad (19)$$

$$\phi_2 = \frac{E_B - E_C}{E_{hv}}, \text{ para } B \xrightarrow{k_2} C \quad (20)$$

$$\phi_3 = \frac{E_C}{E_{hv}}, \text{ para } C \xrightarrow{k_3} D \quad (21)$$

em que $\phi_1 + \phi_2 + \phi_3 = 1$. O calor total depositado no meio, $H(t)$, é a soma das três deposições consecutivas, $H(t) = H_A(t) + H_B(t) + H_C(t)$. A onda fotoacústica experimentalmente observada para este processo, $E(t)$, é a convolução da função resposta instrumental, ou da onda de referência, $T(t)$, com a da função calor $H(t)$, eq.22. A referência é uma substância que liberta para a solução *via* não radiativa toda a energia que recebe do laser, tem um tempo de vida muito menor que a resolução do transdutor e não apresenta variação de volume.

$$E(t) = T(t) \otimes H(t) \quad (22)$$

Como já foi referido, o rendimento quântico e energia do tripleto podem ser obtidos por calorimetria fotoacústica, fazendo um balanço de energia, *fig.2*.

$$\Phi_T E_T = (1 - \phi_1) E_{hv} - \Phi_F E_1 \quad (23)$$

Em que Φ_T e E_T são o rendimento quântico e a energia do tripleto, respectivamente. ϕ_1 é a fracção de energia libertada *via* não radiativa E_{hv} é a energia do fóton incidente, Φ_F e E_1 são o rendimento quântico de fluorescência e a energia do singuleto, respectivamente. O rendimento quântico do oxigénio-singuleto pode ser determinado com,

$$\Phi_\Delta E_\Delta = \Phi_T E_T - \Phi_2 E_{hv} \quad (24)$$

Onde Φ_Δ e E_Δ são o rendimento quântico do oxigénio singuleto e energia, respectivamente, Φ_2 é a fracção de energia libertada *via* não radiativa.

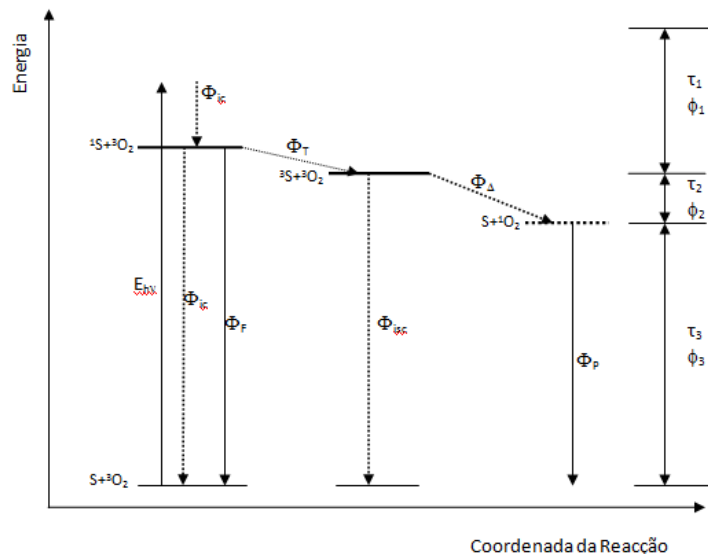


Fig.2 – Esquema cinético de um processo fotoinduzido na presença do oxigénio molecular: — processos radiativos; processos não radiativos. Retirado de [20.]

2.2-Propriedades termodinâmicas e acústicas da água

A água é conhecida por apresentar muitas propriedades físicas, ditas de anómalas, que a distinguem das outras moléculas de massa comparável. Embora seja uma molécula aparentemente simples, a possibilidade de ligações intermoleculares, através de ligações de hidrogénio, confere-lhe algumas características, quase únicas. Apresenta um elevado ponto de ebulição e baixo ponto de fusão permanecendo num grande intervalo de temperatura no estado líquido; apresenta uma elevada capacidade térmica mássica e uma elevada entalpia de vaporização; tem uma elevada tensão superficial e é um bom solvente para a maioria dos compostos, especialmente compostos polares, iónicos e sais, pois têm uma elevada polaridade; a água é uma das poucas substâncias conhecidas cuja forma sólida é menos densa que a líquida. De facto, o volume específico da água varia com a temperatura. O *gráfico 1* mostra a variação do volume específico da água com a temperatura.

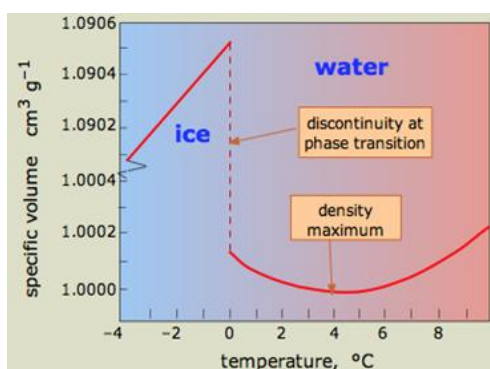


Gráfico 1- Variação do volume específico da água com a temperatura. Retirado de [21]

Observa-se que a água é mais densa no estado líquido e que apresenta uma densidade máxima a 3,98°C, expandindo-se quando sofre um arrefecimento ou aquecimento. Tipicamente explica-se que acima de 3,98°C a expansão é devida ao aumento da energia vibracional nas ligações O-H, que tendem a afastar as moléculas entre si. Entre 3,98°C e 0°C é devida à formação de grandes agregados de ligações de hidrogénio.

O coeficiente de expansão térmica de uma substância, bem como outras propriedades físicas como a compressibilidade isotérmica, são deduzidas a partir das leis da termodinâmica [22]. A partir da equação de estado para a energia interna, U , obtém-se,

$$dU = \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T dV + \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_V dT \quad (25)$$

transformando ¹ $\left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_V$ em $\left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_P$ obtém-se

$$\left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_P = \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_V + \left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \Leftrightarrow \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_P = C_V + \pi_T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \quad (26)$$

$$\left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_P = C_V + \pi_T \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \times \frac{V}{V} \Leftrightarrow \left(\frac{\partial U}{\partial T}\right)_P = \pi_T \cdot \alpha \cdot V + C_V \quad (27)$$

A eq. (27) é de aplicação geral para sistemas fechados e de composição constante. C_V é a capacidade térmica a volume constante e $\alpha = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P$ é o coeficiente de expansão térmica de uma substância. Por outro lado, da variação da entalpia com a temperatura a pressão constante obtém-se a compressibilidade isotérmica. Também a entalpia é uma função de estado e a equação de estado H pode ser escrita em função de T e P ,

$$dH = \left(\frac{\partial H}{\partial P}\right)_T dP + \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_P dT \quad (28)$$

Quando o volume é constante, a entalpia em função da temperatura pode ser escrita transformando ² $\left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_P$ em $\left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_V$. Fazendo variar a entalpia com a temperatura a volume constante,

$$\left(\frac{dH}{dT}\right)_V = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_P + \left(\frac{\partial H}{\partial P}\right)_T \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V \Leftrightarrow \left(\frac{dH}{dT}\right)_V = C_P + \left(\frac{\partial H}{\partial P}\right)_T \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V \quad (29)$$

$$\text{A diferencial}^3 \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V = -\frac{\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P}{\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T} \Leftrightarrow \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V = -\frac{\left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_P \times \frac{V}{V}}{\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T \times \frac{V}{V}} = \frac{\alpha}{K_T} \quad (30)$$

A compressibilidade isotérmica é dada por $K_T = -\left(\frac{\partial V}{\partial P}\right)_T \times \frac{1}{V}$. O sinal negativo nesta definição assegura que K_T é positivo, porque um aumento de pressão implica uma variação de pressão, dP , positiva, e portanto uma diminuição do volume, dV , negativo. A razão $\frac{\alpha}{K_T}$ é conhecida como coeficiente térmico de pressão.

Kell [23] tem tabelado valores da densidade, do coeficiente de expansão térmica, da compressibilidade isotérmica da água líquida e da velocidade do som à pressão de 1

¹ Seja a função $df = \left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)_y dx + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)_x dy$, a regra é $\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)_z = \left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)_y + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)_x \left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_z$

² Seja a função $df = \left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)_y dx + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)_x dy$, a regra é $\left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)_z = \left(\frac{\partial f}{\partial x}\right)_y + \left(\frac{\partial f}{\partial y}\right)_x \left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_z$

³ $\left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z = -\left(\frac{\partial x}{\partial z}\right)_y \left(\frac{\partial z}{\partial y}\right)_x$ e $\left(\frac{\partial x}{\partial y}\right)_z = \frac{1}{\left(\frac{\partial y}{\partial x}\right)_z}$

atm num largo intervalo de temperatura. Relativamente à densidade da água, refere que a variação da densidade abaixo de 4°C é negativa, positiva entre 0°C e 4°C e negativa acima de 4°C a 100°C, sendo máxima a 4°C. Mostra, ainda, o efeito da temperatura na compressibilidade isotérmica, na velocidade do som e na capacidade térmica mássica. Kell apresenta à temperatura de 4°C valores nulos para o coeficiente de expansão, valores negativos abaixo de 4°C e positivos acima de 4°C. Putintsev [24] refere que uma parte da energia fornecida a um corpo é gasta no aumento da energia interna, U , excitando os vários tipos de movimentos de uma molécula (parte vibracional) e a outra parte da energia é gasta para alterar a configuração molecular que conduz a uma diminuição na interacção molecular (parte configuracional). Sugere que o coeficiente de expansão térmica pode ser dividido numa componente vibracional, α_{vib} , e noutra configuracional, α_{con} , de modo que, $C_V = C_{\text{vib}} + C_{\text{con}}$ e $\alpha = \alpha_{\text{vib}} + \alpha_{\text{con}}$. Putintsev apresenta uma tabela onde os valores de α_{vib} , e de α_{con} têm sinais opostos. A 277,13 K, os valores de α_{vib} e α_{con} são simétricos de modo que α total é nulo.

2.3 - Espectro de absorção da água

A molécula da água é uma molécula de geometria angular, tem três átomos e tem três graus de liberdade vibracionais fundamentais activos no infravermelho.

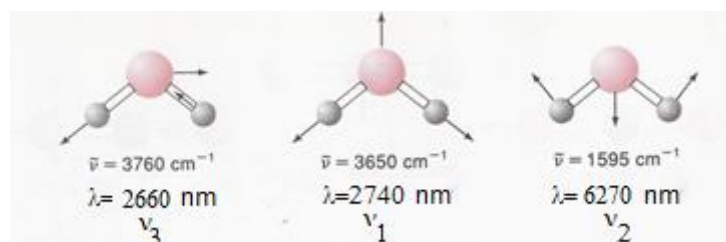


Fig.3-Modos vibracionais fundamentais da água: a) alongação assimétrica, ν_3 ; b) alongação simétrica, ν_1 e c) deformação angular ν_2 . Retirado de [25].

A água tem um pequeno momento de inércia de rotação que dá origem a um espectro vibracional-rotacional. Na água líquida, as rotações tendem a ser restringidas devido a ligações de hidrogénio. Observam-se bandas de absorção da água na região do infravermelho próximo (NIR) desde os 800 nm aos 2500 nm. As duas bandas a 6900 cm^{-1} (1450 nm) e 10300 cm^{-1} (970 nm) são devidas a combinações de bandas envolvendo alongações assimétricas e simétricas [26]. O pico a 5150 cm^{-1} (1940 nm) resulta da combinação da alongação assimétrica com a de deformação angular. Na água

líquida, observam-se combinações de bandas a 5620 cm^{-1} (1780 nm), a 8310 cm^{-1} (1200 nm), a 11800 cm^{-1} (847 nm) e a 13000 cm^{-1} (770 nm) [25,26,35].

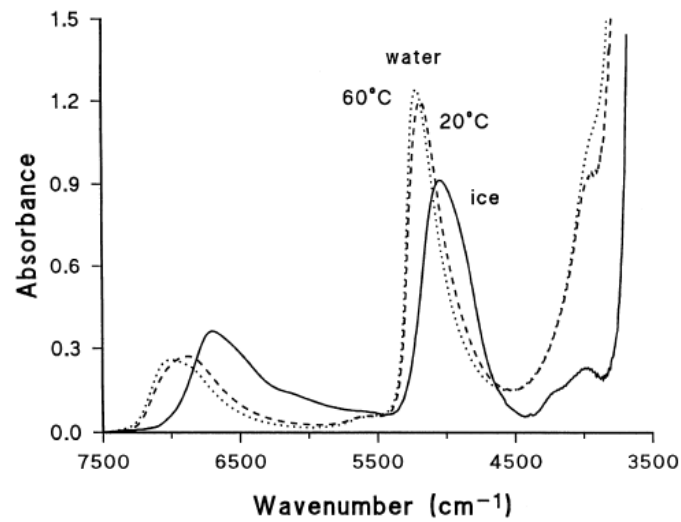


Gráfico 2- Absorção em função do número de onda para a água. O pico máximo para a água a 20°C observa-se a 1940 nm (5150 cm^{-1}). Retirado de [26].

Capítulo 3 - Objectivo

Pretendeu-se construir uma célula para calorimetria fotoacústica com uma arquitectura funcional, com geometria de irradiação frontal, e que permitisse um rigoroso controlo termostático da amostra. A célula deve permitir estudar amostras que originem variações de pressão causadas por alteração de volume. Outros objectivos no desenvolvimento da célula foram o de controlar o percurso óptico, garantir hermeticidade, facilidade na montagem/desmontagem para limpeza e troca de componentes, e ser multifuncional.

Objectivos específicos

- i) Construção e isolamento de um banho de pré-arrefecimento. Antes de entrar na célula, a amostra deve ser pré-arrefecida numa serpentina em contacto com um fluido termostático, no interior de um banho de pré-arrefecimento colocado no exterior da célula, devidamente isolado do meio ambiente.
- ii) Construção e desenvolvimento de uma célula que permita controlar, com eficiência, a temperatura da amostra no interior da célula.
- iii) Desenvolvimento de um sistema de isolamento na superfície exterior da estrutura metálica da célula, para reduzir as trocas de calor entre o interior da célula e o meio ambiente.
- iv) Teste do sistema usando um modelo experimental conhecido. As substâncias utilizadas foram água e sais.

Capítulo 4 - Experimental

4.1 - Material e métodos

A célula PA foi montada conforme o desenho técnico em apêndice. As janelas de quartzo utilizadas na célula fotoacústica são transparentes nas regiões UV-Vis-NIR. O percurso óptico foi definido através de um separador de cobre com 127 μm de espessura. As soluções foram bombeadas com a bomba Kloehn VersaPump 6, 48k, 6 cm stroke, à velocidade de 0,03 ml/s. A temperatura foi variada utilizando o banho termostático Julabo model F30-C. O controle de temperatura foi feito através dos termômetros, Thermocouple thermometer Delta OHM HD 2108.1 com uma precisão de $\pm 0,05$ °C e Xplorer GLX Pasco (temperature sensor model PS-2125) com uma precisão de $\pm 0,5$ °C. Para excitação das soluções, foi usado o laser Nd:Yag EKSPLA model NL301G a 355 nm, com do pulso de 8 ns, acoplado ao OPO (*optical parametric oscillator*) EKSPLA model PG 122/SH com saída a 2000 nm e frequência de disparo de 10Hz. O transdutor piezoelétrico utilizado é da marca Panametrics A311S com frequência de 10 MHz. O sinal acústico foi amplificado com o pré-amplificador Panametrics modelo 5676 e recolhido com o osciloscópio Tektronics modelo DSA 601 (digitizing signal analyser) com médias de 200 (solução de de tampão fosfato) a 400 disparos (solução de cloreto de sódio).

4.2 - Procedimento experimental

Nas experiências, foram utilizadas água destilada e soluções salinas de NaCl e tampão fosfato nas seguintes concentrações: i) 5 mM , ii) 10 mM , iii) 50 mM de NaCl e com soluções de tampão de fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): i) 5 mM a pH=6,41, ii) 10 mM a pH=6,28, iii) 50 mM a pH=6,19.

Capítulo 5 - Resultados e Discussão

5.1 -Concepção e construção da célula fotoacústica

A célula fotoacústica foi projectada, *fig.4*, para ser utilizada em calorimetria fotoacústica resolvida no tempo (PAC) baseada na geometria de irradiação frontal. A principal característica deste novo projecto em relação à célula em uso corrente no laboratório foi a implementação de um sistema para variação e controlo da temperatura. Ainda foram feitas melhorias como a redução no tempo de uma experiência, versatilidade na montagem e desmontagem, multifuncionalidade no sentido de poder ser aplicada em diferentes equipamentos, a variação do percurso óptico, a hermeticidade de modo a evitar vazamentos e perda de solução. O corpo da célula PA é constituído por a) dois blocos de aço inox; b) um separador de cobre que define o percurso óptico; c) um espelho dieléctrico e janela de quartzo; d) um transdutor piezoeléctrico.



Fig.4– Célula PAC projectada.

Do vasto conjunto de materiais disponíveis no mercado, selecionei, inicialmente, dois para a construção da célula PAC: o alumínio e o aço inox. Esta escolha foi feita com base na facilidade de encontrar estes materiais no mercado a preços competitivos bem como às suas características térmicas. Finalmente, a célula foi projectada em aço inox (cromo-níquel), isenta de carbono, de modo a não interferir com estruturas orgânicas que possam vir a ser estudadas e sendo de fácil limpeza (metal que não mancha). O aço inox é um material que apresenta uma capacidade térmica mássica de $480 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$, portanto mais baixa que o alumínio que apresenta o valor de $875 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Esta propriedade física permite ao aço absorver ou libertar energia térmica mais rapidamente,

diminuindo o tempo de espera, quando se pretende estudar amostras em diferentes temperaturas.

5.1.1 – Bloco 1

Este bloco tem uma cavidade na estrutura de aço que vai conter o espelho dielétrico ou janela de quartzo, *fig.6*. É oco pois funciona como sistema termostático. No seu interior, circula um líquido termostático que determina a temperatura da amostra. A célula tem duas condutas metálicas no topo do bloco, *fig.5*; uma conduz o fluido termostático para o interior do bloco, enquanto que a outra conduz o fluido para o exterior. O desenho técnico do bloco1 pode ser analisado na *fig. 7* com as dimensões em milímetros.

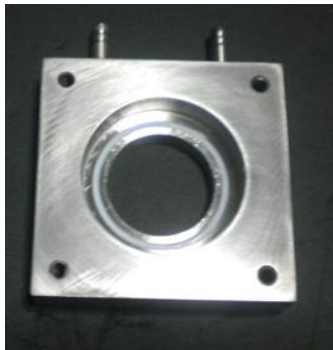


Fig.5 - Fotografia digital do bloco1 que vai conter o dielétrico.

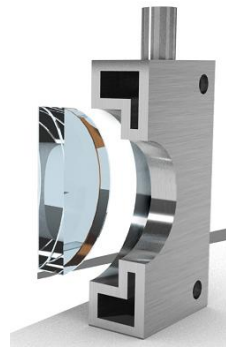


Fig.6 - Corte transversal do bloco 1 através do software 3D-MAX.

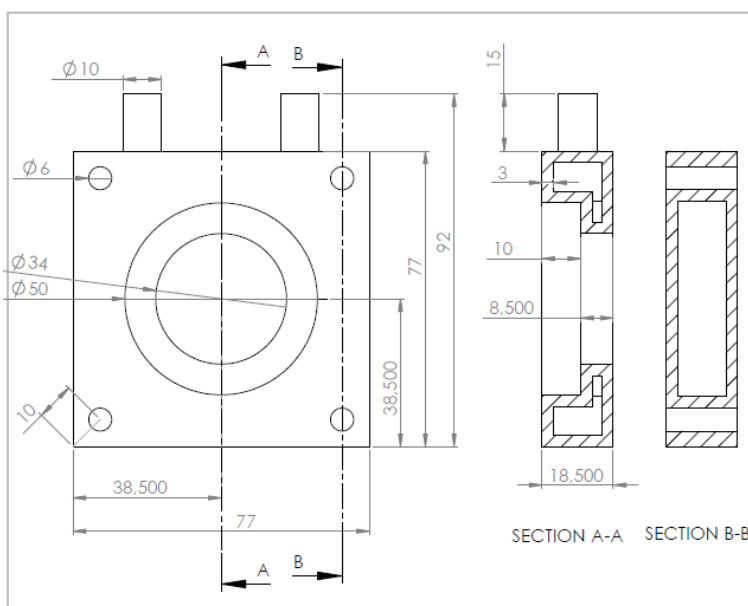


Fig.7 - Desenho técnico do bloco 1. Vista frontal e cortes transversais das secções A-A e B-B. As paredes de aço têm 3 mm de espessura.

5.1.2 – Bloco 2

Este bloco contém a janela de quartzo por onde passará a luz do laser, *fig.8*. É oco e também funciona como sistema termostático, de modo análogo ao bloco 1. Na base, tem um orifício de entrada da amostra e no topo, um orifício de saída da amostra e um orifício na parede metálica do aço com 1 cm de profundidade para controlo da temperatura na célula. O desenho técnico do bloco 2 pode ser analisado nas *fig. 9 e 10* com as dimensões em milímetros.

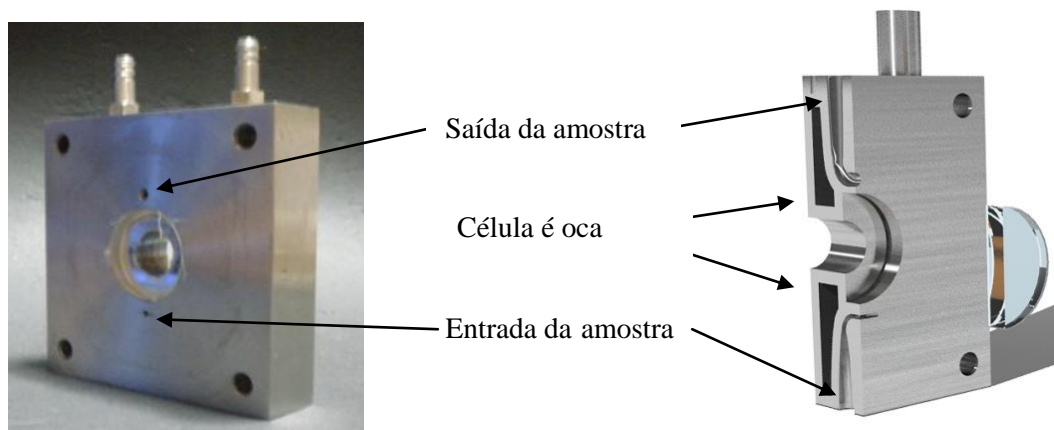


Fig.8 - Bloco 2 vai conter a janela de quartzo e é oco. A primeira imagem é uma fotografia digital. A segunda imagem é um desenho construído através do software 3D-MAX.

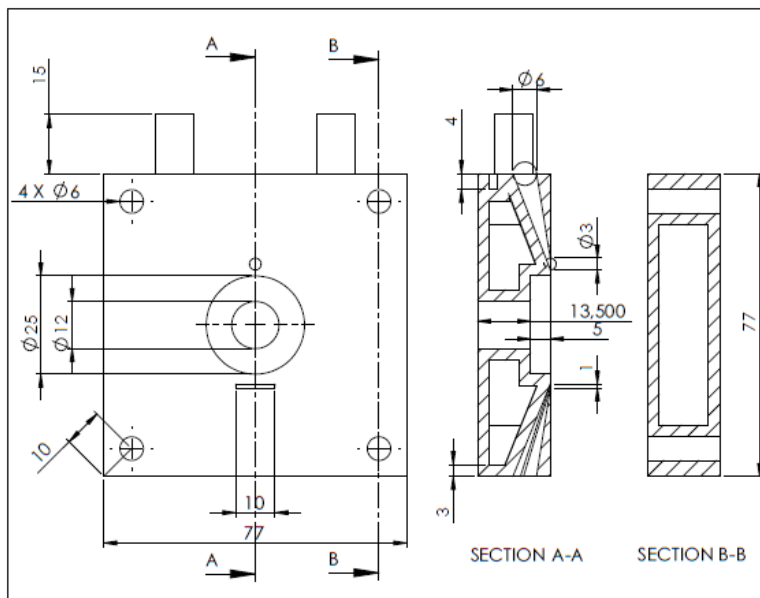


Fig.9 - Desenho técnico do bloco 2: Vista frontal e cortes transversais das secções A-A e B-B. No percurso óptico a entrada da amostra tem uma forma aproximadamente rectangular para que entre sem turbulência.

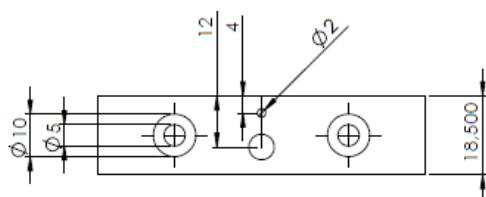


Fig.10 - Desenho técnico do bloco 2: Vista de cima. São visíveis os orifícios da saída da amostra (6 mm de diâmetro) e do termómetro (2 mm de diâmetro e 10 mm de profundidade na parede de aço).

5.1.3 – Separador

O separador é pressionado entre os blocos de aço e define a espessura e forma do percurso óptico da amostra. É de cobre ($C_p=385 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$ a 300 K), para facilitar as transferências de calor entre a solução que contém a amostra e os blocos de aço, *fig.11*.



Fig.11 - Separador de cobre pressionado entre os dois blocos. A imagem é um desenho construído através do software 3D-MAX.

Há já alguns anos que nas células existentes no Laboratório de Fotoquímica se utiliza para percurso óptico uma geometria circular recorrendo-se a anilhas e o-rings, funcionando também como vedantes. Como o caudal de fluido é constante, durante o escoamento ocorre variação da velocidade do fluido em função da altura, uma vez que ocorre variação da área exposta à direcção do escoamento do fluido. Com geometria circular, quando o fluido é introduzido no percurso óptico, existe a possibilidade do escoamento se efectuar preferencialmente pela zona central ou de ser irregular, com cruzamento de linhas de corrente do fluido, caracterizado pela presença de regiões com pequenos vórtices e que podem causar efeitos de fotodegradação, dado que a amostra poderá apresentar tempos de permanência diferentes em diferentes locais do percurso óptico (mais elevados na zona irradiada), *fig.12*.

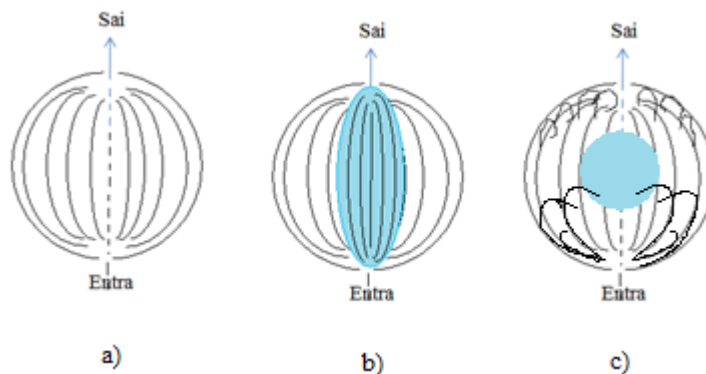


Fig.12- Percurso óptico de geometria circular: a) escoamento ideal do fluido; b) escoamento do fluido pela zona central; c) escoamento irregular caracterizado por cruzamento de linhas de corrente.

Altereí, por isso, a geometria do percurso óptico, para geometria rectangular por uma série de razões, que passo a expor. Com esta geometria, as grandezas que caracterizam o escoamento do fluido não variam com o percurso óptico (velocidade e caudal são aproximadamente constantes). Introduzi um comportamento aproximadamente ideal para o fluido onde vector velocidade de uma partícula de fluido em cada ponto é constante ao longo do tempo. Desta forma, as linhas de corrente que constituem o fluido são paralelas entre si, e portanto, nunca se cruzam. Considerando que o percurso óptico é uma conduta rectangular, durante o movimento do fluido, as forças internas de resistência ao movimento fazem com que as lâminas de fluido se desloquem umas em relação às outras, *fig.13*. Este facto significa que a velocidade em cada linha de corrente é diferente ao longo da secção recta da conduta, estabelecendo-se um perfil de velocidades parabólico, *fig.14 a)*, desde o centro da conduta onde a velocidade é máxima até à parede da conduta onde a velocidade se anula. Resulta então que a amostra apresenta diferentes velocidades na secção recta da conduta.

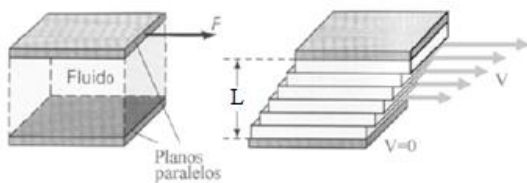


Fig.13 - Fluido em escoamento laminar. Devido à viscosidade do fluido, a tensão de corte faz com que as lâminas de fluido se desloquem umas em relação às outras.

Contudo, se a largura da conduta for suficientemente larga relativamente à velocidade do fluido, como é o caso, é razoável aproximar que toda a região central do fluido tem a mesma velocidade, *fig.14 b)*.

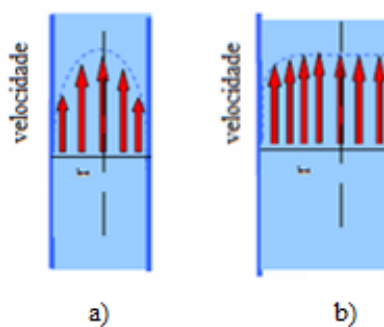


Fig 14 - Perfil de velocidades: a) perfil parabólico; b) perfil de velocidades constante na secção da conduta.

A implementação desta ideia permitirá uma troca constante e contínua de moléculas em cada secção recta da conduta e na mesma direcção do fluxo.

5.1.4 – Acoplamento do transdutor piezoelétrico

O acoplamento do transdutor na célula é feito com uma fina camada de acoplador (silicone ou gel utilizado para ultrassons na medicina). O sistema de fixação do transdutor no dielétrico foi feito com quatro parafusos que enroscam directamente na célula através de uma placa de acrílico, e que pressionam o transdutor piezoelétrico contra o espelho dielétrico, *fig15*.

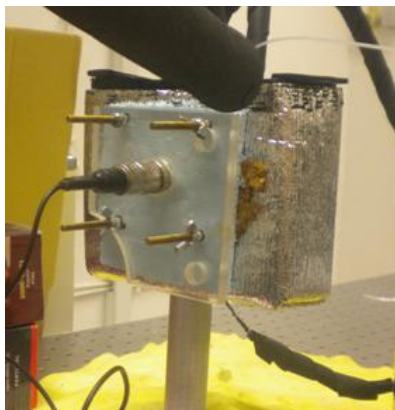


Fig.15 - Acoplamento do transdutor piezoelétrico ao dielétrico.

5.2 - Sistema térmico

Do ponto de vista térmico, esta célula PAC foi concebida com o objectivo de se poder variar a temperatura. O sistema de controlo de temperatura da solução da amostra foi projectado, com rigor, para o intervalo -1 °C a 15°C. O controlo é feito por quatro processos em conjunto: a) banho controlador da temperatura b) banho externo de pré-arrefecimento da amostra c) dois blocos (1 e 2) termostáticos da célula d) isolamento exterior da célula, *fig16*.

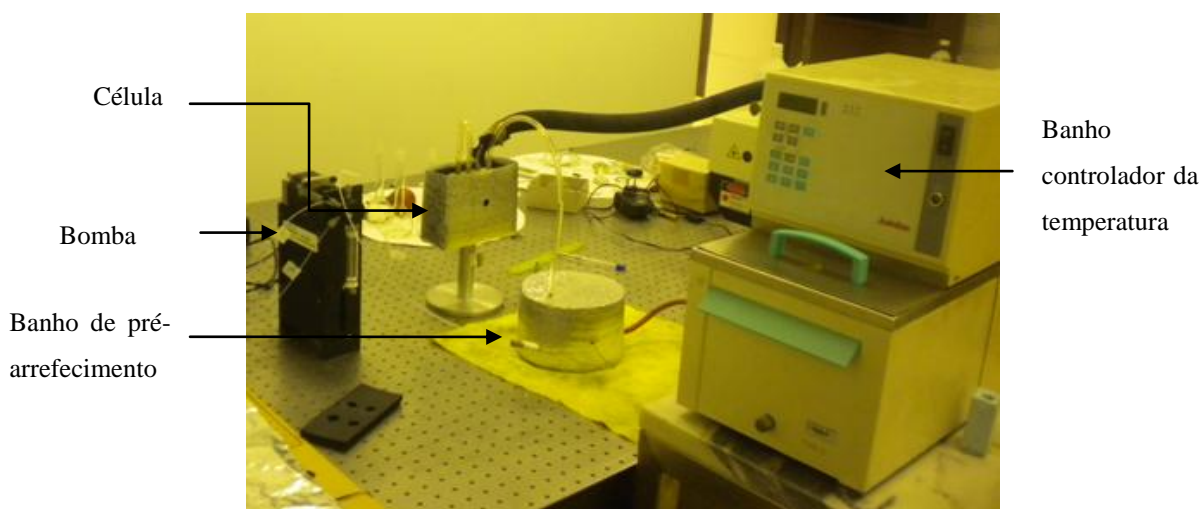


Fig.16 - O sistema de controlo de temperatura

5.2.1 - Banho controlador da temperatura

Este banho termostático é o banho que define a temperatura do sistema. O fluido termostático é o álcool etílico. Depois de se fixar a temperatura, o fluido termostático é bombeado à velocidade de 15 l.min^{-1} para o sistema a que está ligado.

5.2.2 - Banho externo de pré-arrefecimento

Este banho externo de pré arrefecimento foi construído em alumínio e tem como objectivo pré-arrefecer a solução da amostra à temperatura pretendida antes de entrar na célula. O banho externo está termicamente isolado com uma borracha elastómera, *KFlex ST* (baixa condutividade térmica, $k=0,034 \text{ W/mK}$, resistência mecânica elevada) e uma película de alumínio. No interior, existe uma serpentina onde passa a amostra. O fluido termostático entra no banho externo de pré-arrefecimento e troca calor com a amostra que passa no interior da serpentina. A serpentina é de aço inox, de comprimento de 90 cm e diâmetro interno 0,75 mm, *fig.17 e 18*. Desenho técnico, *fig19*.



Fig.17 – Banho externo de pré arrefecimento (fotografia digital).

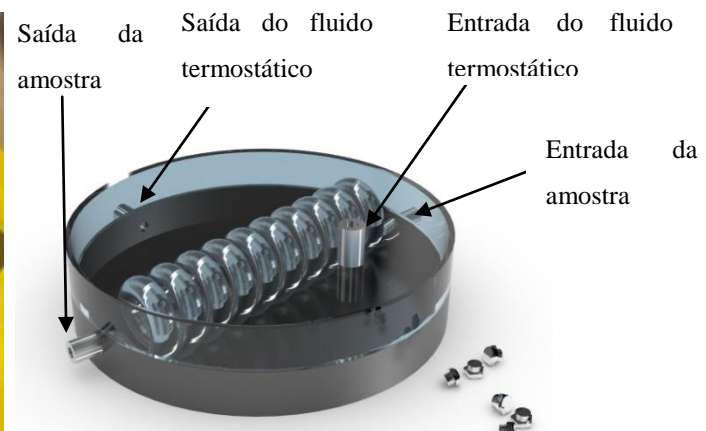


Fig.18 – Banho externo de pré arrefecimento (Desenho 3D MAX)

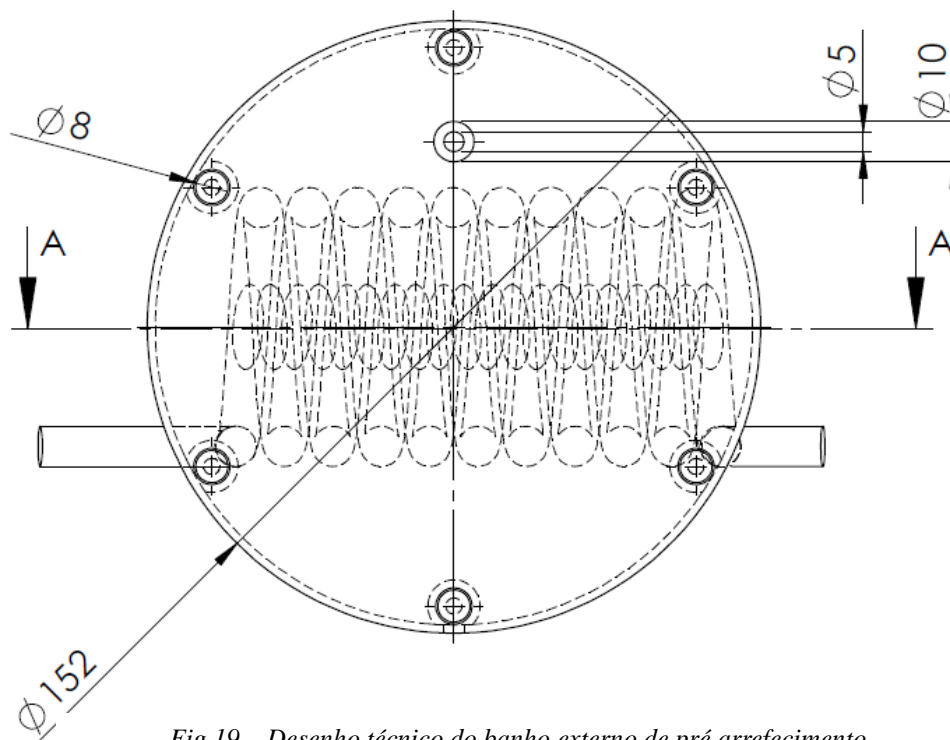


Fig.19 – Desenho técnico do banho externo de pré-arrefecimento

A solução da amostra é bombeada, sendo introduzida no banho de pré-arrefecimento por uma conduta em aço inox com um diâmetro interno de 0,75 mm. Passa pela serpentina no interior do banho, trocando calor com o fluido termostático (álcool etílico), sendo de seguida enviada para a célula por uma conduta de aço inox com diâmetro interno de 0,75 mm, termicamente isolada.

5.2.2.1- Propriedades térmicas do banho externo de pré-arrefecimento

A solução da amostra é bombeada para o banho de pré-arrefecimento, passando pela serpentina (no seu interior) que está imersa num fluido termostático, como já foi referido. Deste modo, a amostra, no interior da serpentina, troca calor com o banho termostático, exterior a esta.

Iniciou-se este estudo térmico, estabelecendo uma comparação entre o valor da temperatura do fluido termostático do banho externo com o valor da temperatura fixa do banho controlador de temperatura. Foram feitas três medidas de controlo que se registam na *tabela 3*.

Tabela 3 – Controlo da temperatura do banho termostático

Indicador de Temperatura (°C) (Banho de controlo de temperatura)	Temperatura do fluido termostático (°C) (Banho de pré-arrefecimento)
7,0	7,4
4,0	4,5
1,0	1,5

Observou-se que as diferenças de temperatura medidas, 0,4°C e 0,5 °C, existentes entre o indicador do banho de controlo de temperatura e a temperatura do fluido termostático no banho de pré-arrefecimento revelam a existência de fenómenos de transferência de calor. Estas transferências de calor ocorrem sobretudo na conduta que estabelece ligação entre o banho de controlo de temperatura e o banho de pré-arrefecimento.

5.2.2.2 - Propriedades térmicas da serpentina

Pretende-se, então, controlar a temperatura da amostra, transferindo calor entre a amostra, que entra na serpentina, e o fluido termostático que contacta com ela. Por isso, foi necessário determinar o comprimento mínimo da serpentina, de modo a garantir que a amostra atinja a temperatura pretendida quando sai da serpentina em direcção à célula PAC.

Para o facto, foi necessário tecer algumas considerações:

- a) Sabendo que a temperatura ambiente no laboratório é aproximadamente constante, fixada por sistema de ar condicionado, o comprimento mínimo da serpentina foi determinado para a maior diferença de temperaturas (drivig force) no sentido das temperaturas decrescentes, isto é, entre 24°C de temperatura ambiente e 1,5 °C de temperatura do banho externo à serpentina.
- b) Dado que o caudal de fluido termostático que entra no banho de pré-arrefecimento é elevado (15 l.min⁻¹), considerei que a temperatura do fluido termostático é uniforme em qualquer local no interior do banho.
- c) Uma vez que o volume do banho de pré-arrefecimento é muito grande, (1270 cm³) a temperatura é constante e uniforme, considerei que a temperatura da parede de aço da serpentina, T_s , de 0,625 mm de espessura, é constante e igual à temperatura do fluido termostático.
- d) Existe transferência de calor por convecção da solução da amostra para a parede da serpentina e desta para o fluido termostático.

- e) Para a transferência de calor por convecção num fluido em movimento, aplicou-se a lei de Newton para a transferência de calor, em que a quantidade de calor, Q , em W, é proporcional à diferença de temperatura da parede de aço e do fluido. A constante de proporcionalidade é o coeficiente de transferência de calor por convecção, h , em W/m^2K .

$$dQ_{conv} = -h(T_s - T)dA \quad (31)$$

- f) O estudo na determinação do comprimento da serpentina foi realizado com água.

Efectuando um balanço térmico ao fluido na serpentina, num volume de controlo diferencial, em estado estacionário, obtém-se,

$$0 = E_{entra} - Q_{sai} - E_{sai} \Leftrightarrow 0 = mC_p T - dQ_{conv} - mC_p (T + dT)$$

$$dQ_{conv} = mC_p T - mC_p T - mC_p dT \Leftrightarrow -h(T_s - T)dA_s = -mC_p dT$$

$$-h(T_s - T)\pi D dx = -mC_p dT \Leftrightarrow -h(T_s - T)\pi D \int_0^L dx = -mC_p \int_{T_1}^{T_2} dT$$

$$-h\pi D \int_0^L dx = mC_p \int_{T_1}^{T_2} \frac{-1}{T_s - T} dT \Leftrightarrow -\frac{h\pi D}{mC_p} L = \ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} \quad (32)$$

Multiplicando por $\frac{T_2 - T_1}{T_2 - T_1}$, vem

$$\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} = -\frac{h\pi D}{mC_p} L \times \frac{T_2 - T_1}{T_2 - T_1} \quad (33)$$

Calor transferido, Q_{transf}

$$\dot{Q}_{transf} = mC_p (T_2 - T_1) = \frac{-h\pi DL (T_2 - T_1)}{\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1}} = \frac{h\pi DL (T_1 - T_2)}{\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1}} \quad (34)$$

Como, $(T_1 - T_2) = (T_s - T_2) - (T_s - T_1)$ então,

$$mC_p (T_2 - T_1) = \frac{h\pi DL [(T_s - T_2) - (T_s - T_1)]}{\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1}} = \frac{h\pi DL (T_1 - T_2)}{\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1}} \quad (35)$$

$$mC_p(T_2 - T_1) = \frac{h\pi DL(T_1 - T_2)}{\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1}} \quad (36)$$

Rearranjando a eq.36 obtém-se a expressão que permite o cálculo do comprimento da serpentina.

$$L = - \ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} \times \frac{mC_p}{h\pi D} \quad (37)$$

As variáveis da eq.37 são conhecidas excepto h , coeficiente de transferência de calor por convecção. Para a sua determinação, é necessário avaliar o regime de escoamento do fluido e tecer algumas considerações hidrodinâmicas e térmicas, dado que o escoamento ocorre no interior de uma conduta circular.

A condição de escoamento no interior da serpentina foi determinada recorrendo ao cálculo do número de Reynolds,

$$Re = \frac{\rho u D}{\mu} = \frac{999,1 \frac{kg}{m^3} \times 0,068 \frac{m}{s} \times 0,75 \times 10^{-3} m}{1,223 \times 10^{-3} Pa.s} = 41,7 \quad (38)$$

em que $\rho_{\text{água}} = 999,1 \text{ kg/m}^3$, μ é a viscosidade do fluido, $\mu = 1,223 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$, obtidos [27] à temperatura média do fluido, D é o diâmetro da serpentina igual a $0,75 \times 10^{-3} \text{ m}$ e u é a velocidade de escoamento, determinada a partir do caudal volumétrico ($0,03 \text{ cm}^3/\text{s}$) que atravessa a conduta circular de área $\pi \cdot r^2$.

$$Q_v = u \cdot A \Leftrightarrow u = \frac{0,03 \times 10^{-6}}{\pi \times (3,75 \times 10^{-4})^2} = 0,068 \text{ m/s} \quad (39)$$

Como o número de Reynolds é inferior a 2000 o escoamento é laminar.

Do ponto de vista hidrodinâmico, o fluido entra na conduta com velocidade constante e quando estabelece contacto com as paredes da serpentina, (o escoamento é laminar) as forças internas de resistência ao movimento (efeitos da viscosidade) fazem com que as lâminas de fluido se desloquem umas em relação às outras. Desenvolve-se, então, um perfil de velocidades em função do comprimento, x , percorrido pelo fluido e do raio, r , da conduta. Estabelece-se uma camada limite hidrodinâmica ao fim da qual o perfil de velocidades não varia em função de x e de r - *o comprimento de entrada hidrodinâmico*, L_H , *fig.20*. A partir desta distância, obtém-se um perfil de velocidades completamente desenvolvido, parabólico para o regime laminar, com o vector velocidade, máximo no eixo da conduta e nulo junto às paredes da conduta.

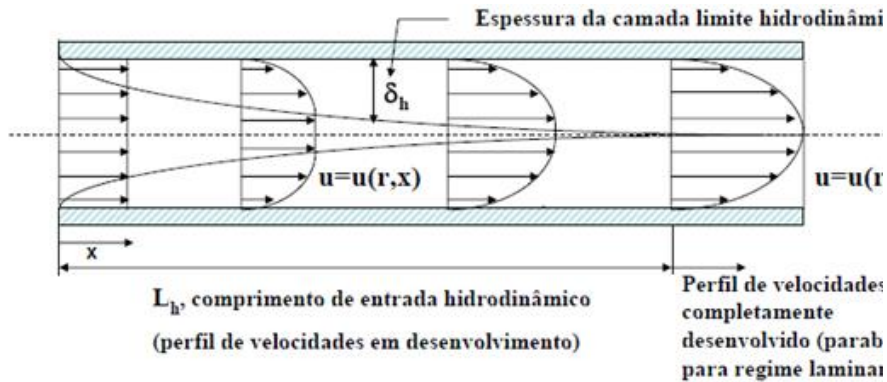


Fig.20- Região de entrada hidrodinâmica. Retirado de [28].

Do ponto de vista térmico, como a temperatura da solução da amostra que entra na serpentina está a uma temperatura superior em relação à temperatura da parede da serpentina, T_s , desenvolve-se radialmente no fluido um gradiente de temperaturas desde o centro da conduta onde a temperatura é maior até à parede da conduta onde a temperatura é menor e constante. Resulta, então, um perfil de temperaturas completamente desenvolvido a uma determinada distância da entrada da conduta - comprimento de entrada térmico, L_T , fig.21.

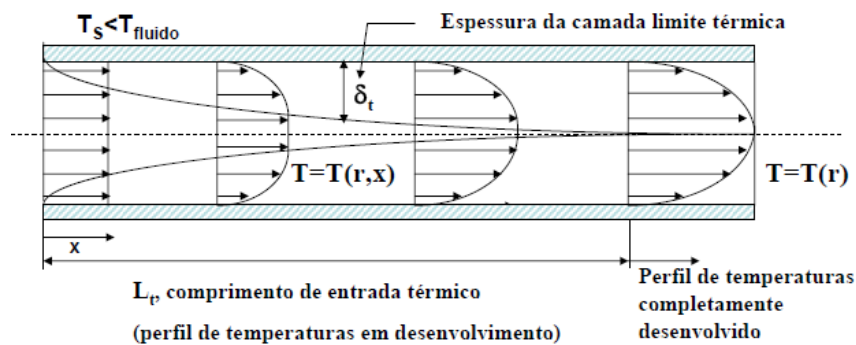


Fig 21- Região de entrada térmico. Retirado de [28].

Interessa referir que o coeficiente de transferência de calor por convecção, h , varia ao longo do comprimento de entrada térmico e que a partir desta posição, no escoamento termicamente desenvolvido, o coeficiente de transferência de calor por convecção é constante.

O comprimento de entrada térmico e o comprimento de entrada hidrodinâmico têm de ser determinados, uma vez que se recorreu a correlações empíricas em regime laminar, para a determinação do coeficiente de transferência de calor por convecção, h ,

[27]. Os comprimentos de entrada térmico, L_T , e hidrodinâmico, L_H , foram então determinados,

$$L_H = 0,05 \cdot Re \cdot D = 0,05 \times 41,6 \times 0,75 \times 10^{-3} = 1,56 \times 10^{-3} m = 1,56 mm$$

$$L_T = 0,03 \cdot Re \cdot Pr \cdot D = 0,03 \times 41,6 \times 8,70 \times 0,75 \times 10^{-3} = 8,16 \times 10^{-3} = 8,16 mm$$

em que Pr é o número de Prandtl e que dá uma indicação da espessura relativa das camadas limites térmicas e hidrodinâmicas.

$$Pr^4 = \frac{\mu_{fluido} \cdot C_{p,fluido}}{k_{fluido}} = \frac{1,23 \times 10^{-3} \times 4189}{0,59} = 8,70 \quad (40)$$

Em regime laminar, os comprimentos de entrada térmico, L_T , e hidrodinâmico, L_H , são pequenos, e a temperatura da parede da serpentina, T_s , é constante; há condições para que o perfil de velocidades e de temperaturas sejam completamente desenvolvidos. Nestas condições, e a partir de correlações empíricas, obtém-se o número de Nusselt, constante e igual a 3,66 [27] e que é directamente proporcional ao coeficiente de transferência de calor por convecção, h ,

$$Nu = \frac{h \cdot D}{k_{fluido}} \Leftrightarrow h = \frac{Nu \cdot k_{fluido}}{D} = \frac{3,66 \times 0,59}{0,75 \times 10^{-3}} = 2879 \frac{W}{m^2 K} \quad (41)$$

Finalmente, calcula-se o comprimento da serpentina no interior do banho de pré-arrefecimento, fazendo uso da eq.37,

$$L = -\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} \times \frac{m C_p}{h \pi D} = -\ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} \times \frac{\rho Q_v C_p}{h \pi D}$$

$$L = -\ln \frac{1,5 - 1,6}{1,5 - 24} \times \frac{999,1 \times 0,03 \times 10^{-6} \times 4189}{2879 \times \pi \times 0,75 \times 10^{-3}} = 5,42 \times 1,85 \times 10^{-2}$$

$$L = 0,10 m = 10 cm$$

É comum dar uma margem de 30% relativamente ao comprimento calculado. Então,

$$L_{real} = 1,3 \times L_{calculado} = 1,3 \times 10 = 13 cm$$

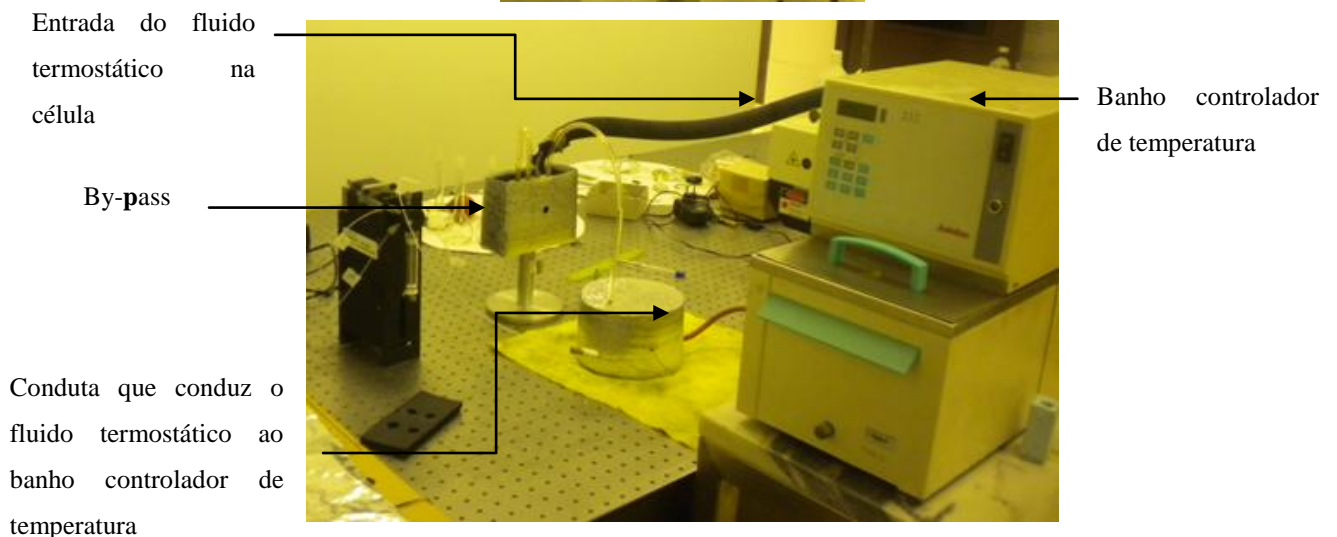
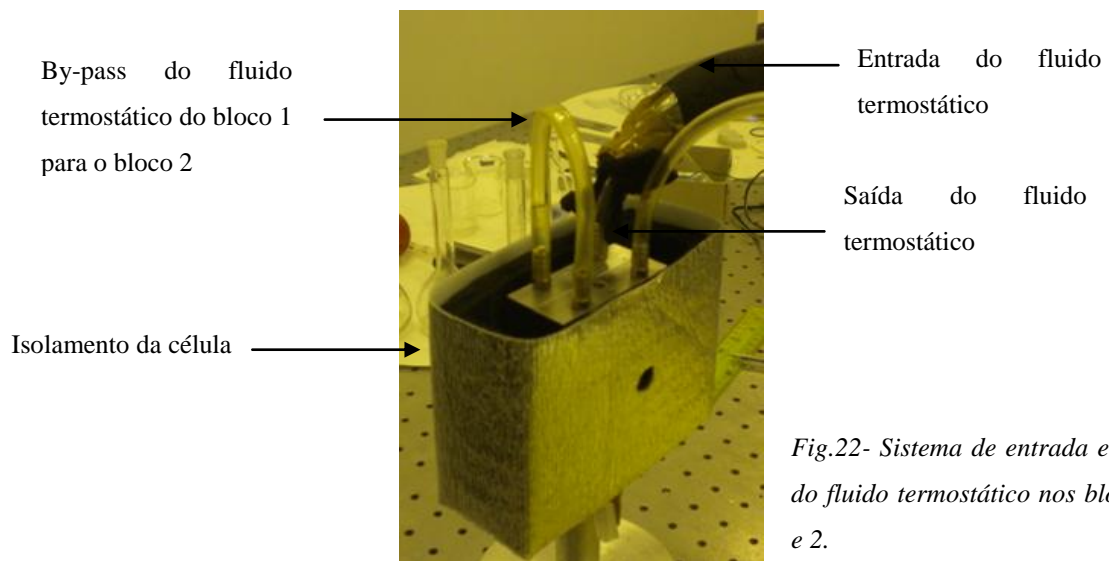
Portanto, o comprimento mínimo para a serpentina no banho de pré-arrefecimento é de 13 cm. Neste momento, a serpentina que foi introduzida no banho tem o comprimento de cerca de 90 cm.

⁴ As propriedades termodinâmicas do fluido foram determinadas à temperatura média do fluido, [27],

$$\bar{T}_{fluido} = \frac{T_1 + T_2}{2}; \mu_{fluido} = 1,23 \times 10^{-3} pa \cdot s; C_{p,fluido} = 4189 \frac{J}{kg K}; k_{fluido} = 0,59 \frac{W}{m K}$$

5.2.3 – Sistema térmico dos blocos (1 e 2) termostáticos

Os dois blocos termostáticos são ociosos por onde circula um fluido termostático à velocidade de $15 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. Cada bloco tem dois canais no topo: um canal de entrada de fluido e outro de saída de fluido. O fluido termostático entra na célula por um dos canais do bloco 1, circula no seu interior, sai pelo outro canal, sendo conduzido por um *by-pass* ao canal de entrada do bloco 2, *fig22*. Neste, o fluido termostático circula no interior, saindo pelo canal de saída sendo conduzido para banho externo de pré-arrefecimento da amostra. Deste último, o fluido volta a entrar no banho de controlo da temperatura, completando o ciclo, *fig23*.



5.2.4 - O isolamento exterior da célula

5.2.4.1 – Construção do isolamento exterior da célula

Após uma análise cuidada dos materiais isolantes disponíveis no mercado, seleccionei a borracha elastómera “K Flex ST”, como isolamento exterior da célula, pois apresenta uma baixa condutividade térmica, $k_{20^{\circ}\text{C}}=0,034 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, uma elevada resistência mecânica e química, um baixo custo e é fácil adquirir no mercado. Para isolar a célula de aço do meio ambiente, foi construída uma capa térmica em K Flex ST, com as dimensões adequadas para introduzir a célula no interior, *fig24*.

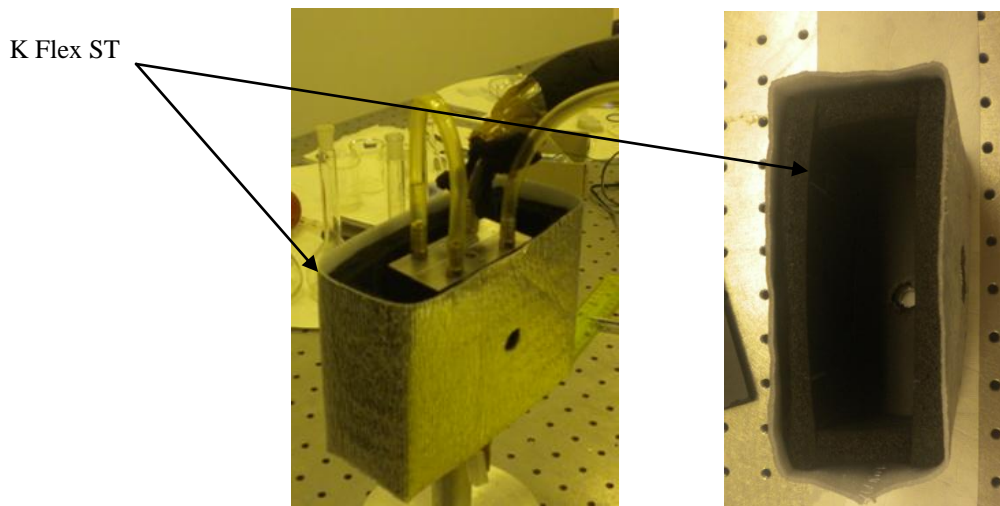


Fig.24 – Isolamento térmico da célula

O isolamento de K Flex ST foi envolvido com uma malha de esponja revestida de papel de alumínio para minimizar as transferências de energia pela radiação ambiente.

5.2.4.2 – Eficiência teórica do isolamento exterior da célula

A célula está exposta ao ambiente laboratorial de ar condicionado, a uma temperatura média de 24°C . A *fig.25* mostra o sistema operacional. Quando a amostra entra na célula a uma temperatura inferior da temperatura ambiente, desenvolvem-se mecanismos de transferência de calor, para o interior da célula. Essas transferências de calor devem ser minimizadas por um sistema isolador eficiente. Interessa investigar se o sistema de isolamento seleccionado em K Flex ST é eficiente, reprodutível e robusto.

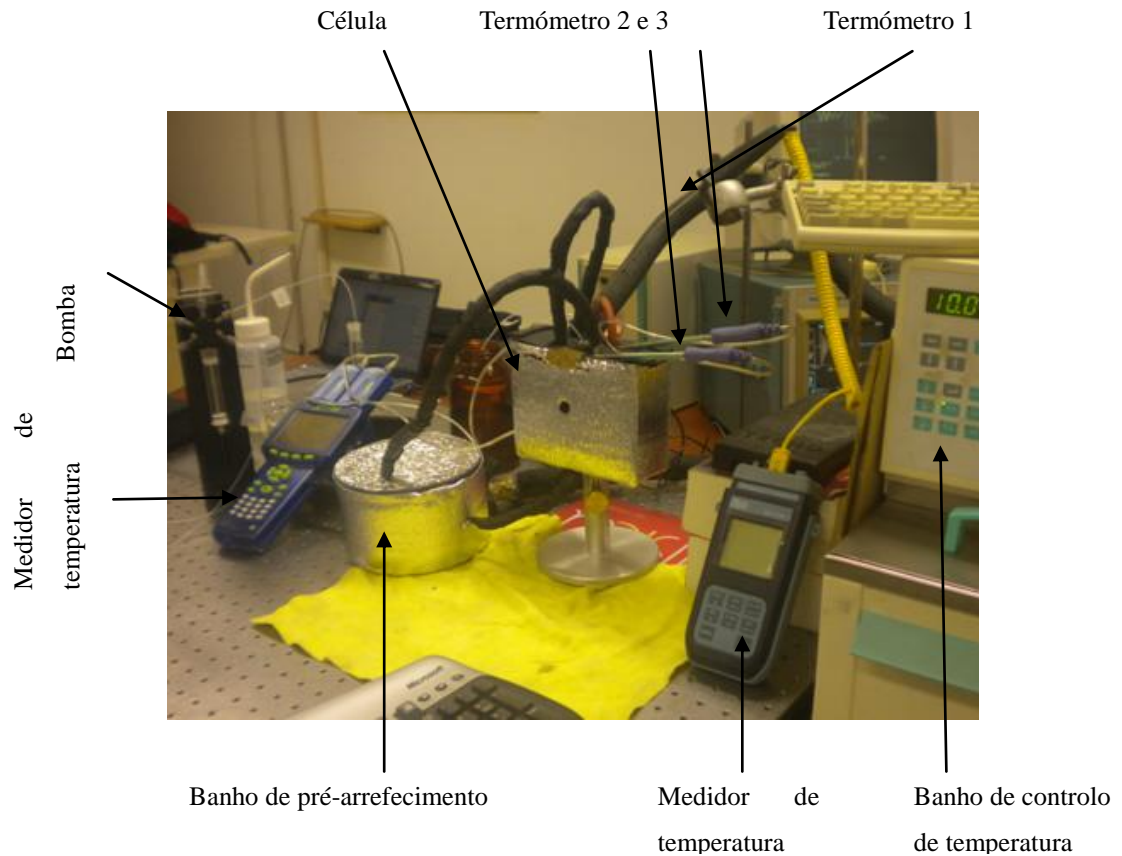


Fig.25 – Sistema operacional.

Para determinar a eficiência deste isolamento, foi necessário fazer algumas considerações:

- a) A transferência de calor ocorre perpendicularmente às paredes da célula.
- b) Ocorre transferência de calor por convecção do meio ambiente para a parede exterior do isolamento, por condução através da parede de K Flex ST, ainda por condução ao longo da parede do aço e finalmente por convecção para o interior do fluido termostático.
- c) Foi admitida a condição de regime estacionário.
- d) Considerou-se que a célula se comporta como uma conduta por onde circula no interior o fluido termostático com $15 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ de caudal volumétrico.

Para a condução de calor nas paredes planas sólidas de K Flex ST e aço, aplicou-se a lei de Fourier para a condução de calor, eq.42, em que o fluxo de calor, q' em (W/m^2) é proporcional ao gradiente de temperatura na direcção perpendicular às paredes da célula.

$$\frac{q}{A} = q' = -k \frac{dT}{dx} \quad (42)$$

A constante de proporcionalidade, k , é a condutividade térmica em $W/m.K$ e é característica do material da parede. O sinal negativo resulta do facto do calor ser transferido no sentido decrescente da temperatura. Em condições de regime estacionário, a distribuição de temperatura é uma função linear com a espessura da parede, L , eq.43.

$$q'dx = -kdT \Leftrightarrow q'(x_2 - x_1) = -k(T_2 - T_1) \Leftrightarrow q' = -k \frac{\Delta T}{\Delta x}$$

$$q' = -k \frac{\Delta T}{L} \quad (43)$$

Para a transferência de calor por convecção num fluido em movimento, aplica-se a lei de Newton, em que o fluxo de calor, q' , em W/m^2 , é proporcional à diferença de temperatura entre a parede plana e o fluido, eq.44. A constante de proporcionalidade é o coeficiente de transferência de calor por convecção, h , em $W/m^2.K$.

$$q_{conv} = h(T_s - T)A \Leftrightarrow \frac{q_{conv}}{A} = q' = h(T_s - T) \quad (44)$$

A *fig.26* é representativa dos fenómenos que ocorrem nesta parede composta, quando o fluxo de calor atravessa a parede da célula. Cada região funciona como uma resistência térmica à condução do calor,

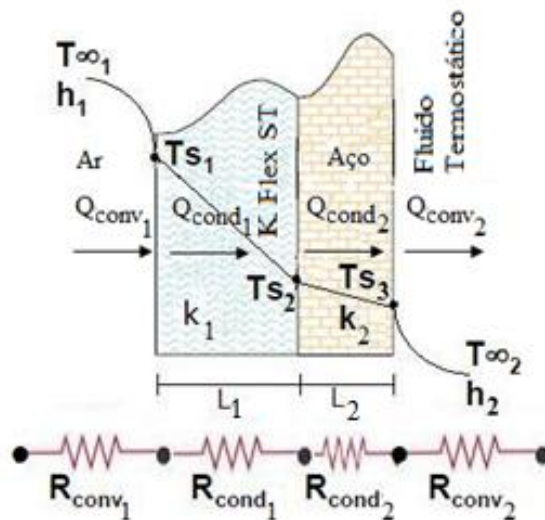


Fig 26 – Fluxo de calor através da parede composta. Retirado de [28].

em que h_1 e h_2 são os coeficientes de transferência de calor por convecção do ar e do fluido termostático que circula no interior da célula, respectivamente. T_{∞_1} é a temperatura ambiente, T_{∞_2} é a temperatura do fluido termostático que circula no interior

da célula de aço, T_{s_1} , T_{s_2} e T_{s_3} são temperaturas das interfaces, $k_1 = 0,034 W/m K$ e $k_2 = 15,1 W/m K$ são as condutividades térmicas do K Flex ST e do aço, respectivamente; L_1 e L_2 são as espessuras das paredes de K Flex ST e aço, respectivamente. Interessa, pois, determinar o fluxo, q' (W/m^2), de calor que atravessa esta parede composta. Aplicam-se as leis de Fourier e Newton às regiões respectivas.

Região de convecção 1 (ar):

$$q_{conv_1} = A_s h_1 (T_{\infty_1} - T_1) \Leftrightarrow (T_{\infty_1} - T_1) = q_{conv_1} \cdot \frac{1}{A_s h_1} \quad \rightarrow R_{conv_1} \quad (45)$$

Região de condução 1 (K Flex ST):

$$q_{cond_1} = k_1 \frac{A_s}{L_1} \cdot (T_1 - T_2) \Leftrightarrow (T_1 - T_2) = q_{cond_1} \cdot \frac{L_1}{k_1 \cdot A_s} \quad \rightarrow R_{cond_1} \quad (46)$$

Região de condução 2 (aço):

$$q_{cond_2} = k_2 \frac{A_s}{L_2} \cdot (T_2 - T_3) \Leftrightarrow (T_2 - T_3) = q_{cond_2} \cdot \frac{L_2}{k_2 \cdot A_s} \quad \rightarrow R_{cond_2} \quad (47)$$

Região de convecção 2 (fluido termostático):

$$q_{conv_2} = A_s h_2 (T_3 - T_{\infty_2}) \Leftrightarrow (T_3 - T_{\infty_2}) = q_{conv_2} \cdot \frac{1}{A_s h_2} \quad \rightarrow R_{conv_2} \quad (48)$$

A soma das diferenças de temperaturas origina uma diferença total de temperatura (driving-force global) dada pelo produto da resistência total com o fluxo de calor total, eq.49.

$$(T_{\infty_1} - T_1) + (T_1 - T_2) + (T_2 - T_3) + (T_3 - T_{\infty_2}) = q_{conv_1} \cdot R_{conv_1} + q_{cond_1} \cdot R_{cond_1} + q_{cond_2} \cdot R_{cond_2} + q_{conv_2} \cdot R_{conv_2}$$

$$(T_{\infty_1} - T_{\infty_2}) = q_{transf} \cdot \left(\frac{1}{A_s h_1} + \frac{L_1}{k_1 \cdot A_s} + \frac{L_2}{k_2 \cdot A_s} + \frac{1}{A_s h_2} \right)$$

$$(T_{\infty_1} - T_{\infty_2}) = \frac{q_{transf}}{A_s} \cdot \left(\frac{1}{h_1} + \frac{L_1}{k_1} + \frac{L_2}{k_2} + \frac{1}{h_2} \right)$$

$$(T_{\infty_1} - T_{\infty_2}) = q' \cdot \left(\frac{1}{h_1} + \frac{L_1}{k_1} + \frac{L_2}{k_2} + \frac{1}{h_2} \right) \quad (49)$$

Para o cálculo de q' a partir da eq.49, todas as variáveis são conhecidas excepto h_1 e h_2 que têm de ser determinadas.

Cálculo do coeficiente de transferência de calor por convecção interior, h_2 , do fluido termostático que circula dentro da célula:

O regime de escoamento do fluido termostático que circula no interior da célula é obtido admitindo que a célula de aço é o prolongamento da conduta que liga o banho controlador da temperatura e a célula. Calculou-se o número de Reynolds, Re_D e obteve-se o regime de escoamento no interior da célula,

$$Re_D = \frac{\rho \cdot u \cdot D_H}{\mu} = \frac{0,79 \times 10^3 \frac{kg}{m^3} \times 3,62 \frac{m}{s} \times 9,4 \times 10^{-3} m}{1,14 \times 10^{-3} Pa \cdot s} = 2,4 \times 10^4 \text{ (Regime turbulento)} \quad (50)$$

em que ρ é a densidade do álcool, $\rho_{álcool} = 0,79 \times 10^3 \frac{kg}{m^3}$, μ é a viscosidade do álcool, $\mu_{álcool} = 1,14 \times 10^{-3} Pa \cdot s$, D_H^5 é o diâmetro hidráulico $D_H = 9,4 \times 10^{-3} m$, u é a velocidade do fluido que passa dentro da célula, $u^5 = 3,62 m/s$.

Para este escoamento turbulento em condutas não circulares de diâmetro D_H , é razoável aplicar a correlação empírica de *Dittus –Boelter* [27] para números de Prandtl, Pr , maiores ou iguais a 0,7. Neste caso, $Pr^6 = 15,5$. A equação de *Dittus-Boelter* no processo de aquecimento [27] é dada pela expressão seguinte,

$$Nu = 0,023 Re^{0,8} Pr^{0,4} \quad (51)$$

$$Nu = 0,023 \times (2,4 \times 10^4)^{0,8} \times 15,5^{0,4} = 219,8$$

$$\text{Então, } Nu_D = \frac{h_2 \cdot D_H}{k_{álcool}} \Leftrightarrow h_2 = \frac{219,8 \times 0,169}{9,4 \times 10^{-3}} = 3952 \frac{W}{m^2 K}$$

$$^5 u = \frac{Q_v}{\pi \cdot r_H^2} = \frac{2,5 \times 10^{-4} \frac{m^3}{s}}{\pi \cdot (4,7 \times 10^{-3})^2 m^2} = 3,62 \frac{m}{s} \quad D_H = \frac{4 A_c}{P} = \frac{4 \times 93,75 \times 10^{-6}}{0,04} = 9,4 \times 10^{-3} m$$

$$A_c, \text{área da secção transversal ao escoamento} = 12,5 \times 7,5 = 93,75 mm^2 ; P_{\text{perímetro molhado}} = 40 mm$$

$$^6 Pr = \frac{\mu_{fluido} \cdot C_{p,fluido}}{k_{fluido}} = \frac{1,14 \times 10^{-3} \times 2,3 \times 10^3}{0,169} = 15,5. \text{ As propriedades termodinâmicas do fluido foram}$$

determinadas à temperatura média do fluido, $\bar{T}_{fluido} = \frac{T_1 + T_2}{2}$, [31], em que $C_{p,álcool} = 2,3 \times 10^3 \frac{J}{kg K}$, $\mu_{álcool} = 1,14 \times 10^{-3} Pa \cdot s$, $k_{álcool} = 0,169 \frac{W}{m K}$, $\rho_{álcool} = 0,79 \times 10^3 \frac{kg}{m^3}$.

Cálculo do coeficiente de transferência de calor por convecção, h_1 , no ar:

Trata-se de um escoamento externo em paredes planas onde o número de Reynolds pode ser dado por, $Re = \frac{\rho u_{\infty} x}{\mu}$ [27], em que ρ é a densidade do ar, u_{∞} é a velocidade do ar fora da zona onde existe gradientes de temperatura, x é o comprimento da parede e μ é a viscosidade do ar, dados por, $\rho_{ar} = 1,1614 \frac{kg}{m^3}$, $\mu_{ar} = 184,6 \times 10^{-7} Pa.s$, $k_{ar} = 26,3 \times 10^{-3} \frac{W}{m K}$, $Pr = 0,707$, $u_{\infty} = 0,5$ m/s [29,30]. Os valores para as variáveis termodinâmicas anteriores foram obtidos à temperatura média do ar de 290 K [27,31]. O comprimento da parede exterior isolada, L , é igual a 14 cm.

$$Re = \frac{\rho u_{\infty} x}{\mu} \quad (52)$$

$$Re = \frac{1,1614 \frac{kg}{m^3} \times 0,5 \text{ m/s} \times 14 \times 10^{-2} \text{ m}}{184,6 \times 10^{-7} Pa.s} = 4,4 \times 10^3 \text{ (regime laminar sobre toda a parede)}$$

Obtém-se o coeficiente de transferência de calor exterior médio, h_2 , para toda a parede da célula, usando número o Nusselt médio, [27],

$$Nu_L = 0,664 Re_L^{0,5} Pr^{0,3} \quad (53)$$

$$Nu_L = 0,664 \times (4,4 \times 10^3)^{0,5} 0,707^{0,3} = 39,7$$

$$\bar{h}_1 = \frac{Nu_L k_{ar}}{L} \quad (54)$$

$$\bar{h}_1 = \frac{39,7 \times 26,3 \times 10^{-3}}{14 \times 10^{-2}} = 7,46 \frac{W}{m^2 K}$$

O calor q' transferido do meio ambiente para o interior da célula é dado pela eq.49 considerando a maior drivig-force (ΔT) das experiências realizadas: $T_{\infty_1} = 24^{\circ}C = 297 K$ e $T_{\infty_2} = 2^{\circ}C = 275 K$. Os valores $h_2 = 3952 \frac{W}{m^2 K}$, $h_1 = 7,46 \frac{W}{m^2 K}$ foram determinados anteriormente. L_1 , L_2 , k_1 e k_2 são conhecidos: $L_1 = 10 \text{ mm}$, $L_2 = 3 \text{ mm}$, $k_1 = 0,034 W/m K$ e $k_2 = 15,1 W/m K$.

$$q' = \frac{(T_{\infty_1} - T_{\infty_2})}{\left(\frac{1}{h_1} + \frac{L_1}{k_1} + \frac{L_2}{k_2} + \frac{1}{h_2}\right)} = \frac{297 - 275}{\left(\frac{1}{7,46} + \frac{10 \times 10^{-3}}{0,034} + \frac{3 \times 10^{-3}}{15,1} + \frac{1}{3952}\right)}$$

$$q' = 51,33 \frac{W}{m^2} = 0,0051 \frac{W}{cm^2}$$

A área total da parede exposta ao meio ambiente, é $A_T \cong 500 \text{ cm}^2$, pelo que o calor transferido do meio ambiente, através da área total da parede, para o interior é de 2,6W. É possível fazer uma previsão da variação da temperatura do fluido termostático quando são transferidos $51,33 \frac{W}{m^2}$ de calor. Usando a eq.44, $h_2 = 3952 \frac{W}{m^2 K}$ e $q' = 51,33 \frac{W}{m^2}$,

$$51,33 \frac{W}{m^2} = 3952 \frac{W}{m^2 K} \times (\Delta T)K \Leftrightarrow \Delta T = 0,013 K = 0,013^\circ C$$

O valor encontrado para a transferência de calor é pequeno como era previsível e não tem significado na variação de temperatura do fluido termostático.

5.2.4.3 – Eficiência experimental do isolamento exterior da célula

Do ponto de vista experimental foram feitos diferentes tipos de testes térmicos. Iniciou-se este procedimento experimental bombeando água com diferentes fluxos (0,033 ml/s, 0,05 ml/s, 0,067 ml/s), diferentes volumes (2 ml, 3 ml, 5ml, 10 ml) a diferentes temperaturas (1°C, 4°C, 7°C, 10°C). A medida da temperatura foi efectuada no bloco 1, no interior do orifício de saída da solução da amostra, *fig.27*. As *tabelas 4 e 5* apresentam de forma resumida os resultados experimentais obtidos para o valor da temperatura⁷ à saída do orifício do bloco 1, onde V é o volume de água introduzido na célula, com diferentes fluxos, às temperaturas fixas de 1°C, 4°C, 7°C, 10°C definidas pelo banho controlador da temperatura.

⁷ Xplorer GLX Pasco temperature sensor model PS-2125 com uma precisão de $\pm 0,5^\circ C$



Fig.27 - Termómetro colocado no bloco 1 na saída da amostra.



Tabela 4 – Valores de temperatura medidos no orifício de saída da amostra, para cada volume de água adicionado, cada temperatura fixa e para fluxos de 0,033 ml/s e 0,05 ml/s.

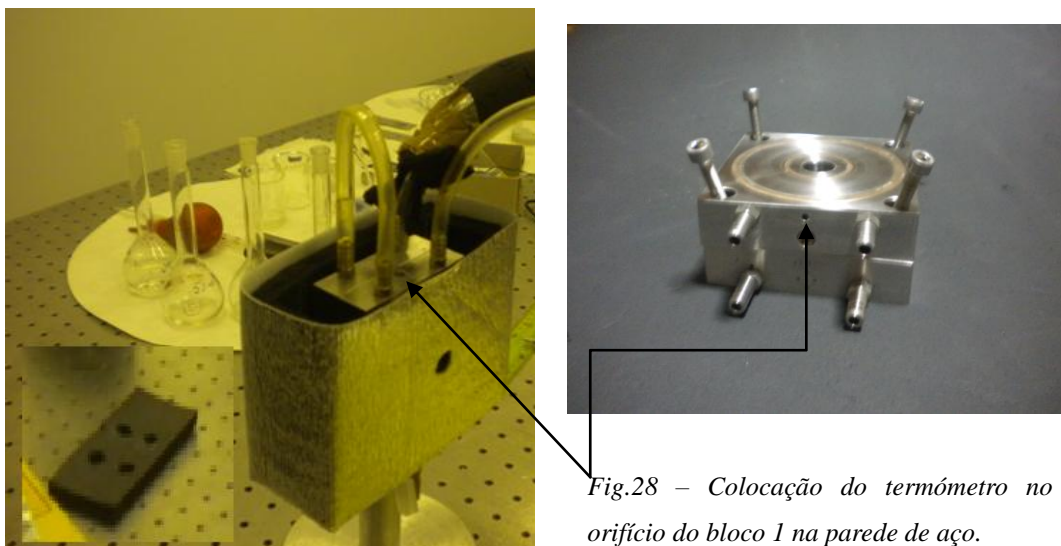
Fluxo	0,033 ml/s e 0,05 ml/s			
V(ml)	1°C	4°C	7°C	10°C
2	2	4,8	7,6	10,4
3	2	4,8	7,6	10,4
5	2	4,8	7,6	10,4
10	2	4,8	7,6	10,4

Tabela 5 – Valores de temperatura medidos no orifício de saída da amostra, para cada volume de água adicionado, cada temperatura fixa e para fluxo de 0,067 ml/s.

Fluxo	0,067 ml/s			
V(ml)	1°C	4°C	7°C	10°C
2	2,2	4,8	7,6	10,4
3	2,2	4,8	7,7	10,4
5	2,2	4,8	7,7	10,5
10	2,2	4,8	7,7	10,5

Verifica-se que para cada temperatura fixada pelo banho e para os fluxos de entrada considerados, os valores da temperatura da água medidos à saída da célula, são independentes do volume de água adicionado. Para os fluxos de 0,033 ml/s e 0,05 ml/s observaram-se variações médias de temperatura de 1°C, 0,8°C 0,6°C e 0,4°C relativamente às temperaturas fixas de 1°C, 4°C, 7°C, 10°C (medidas no banho controlador de temperatura). Para o fluxo de 0,067 ml/s, observaram-se variações médias de temperatura de 1,2°C, 0,8°C 0,7°C e 0,45°C para as mesmas condições experimentais de entrada.

A reprodutibilidade dos valores medidos da temperatura foi estudada. Para isso, bombeou-se água para a célula (com fluxo de 0,03 ml/s) a diferentes temperaturas fixadas pelo banho controlador. As diferentes temperaturas⁸ da água foram medidas no orifício construído na parede de aço da célula, *fig.28*.



A *tabela 6* seguinte apresenta os valores da temperatura do sistema termostático, fixados pelo banho controlador da temperatura. A T_{banho} é a temperatura do banho controlador de temperatura, $\bar{T}_{orifício}$, a temperatura do aço, medida no orifício da parede de aço da célula e $\Delta T = \bar{T}_{orifício} - T_{banho}$, a diferença entre as duas temperaturas anteriores. Estes valores foram colocados no *gráfico 3* e verifica-se que para o intervalo de temperatura estudado, -1°C a 15°C , a variação de temperatura, ΔT , diminui ligeiramente; a variação de temperatura, ΔT , permanece constante no intervalo $4,2^{\circ}\text{C}$ a $1,5^{\circ}\text{C}$.

Ainda com a intenção de conhecer os fenómenos térmicos que se processam no corpo de aço, foram colocados dois termómetros⁹ (T_{front} e T_{back}) na superfície do aço (topo da célula), à frente e atrás do orifício construído na parede de aço da célula, *fig.29*, e sujeitou-se o sistema às mesmas condições experimentais: $V_{\text{água}}=0,9$ ml, Fluxo= $0,03$ ml/s e -1°C a 15°C de intervalo de temperatura. A *tabela 7* e o *gráfico 4* resumem os valores obtidos. Observa-se que para cada temperatura fixada pelo banho controlador,

⁸ Thermocouple thermometer Delta OHM HD 2108.1 com uma precisão de $\pm 0,05^{\circ}\text{C}$

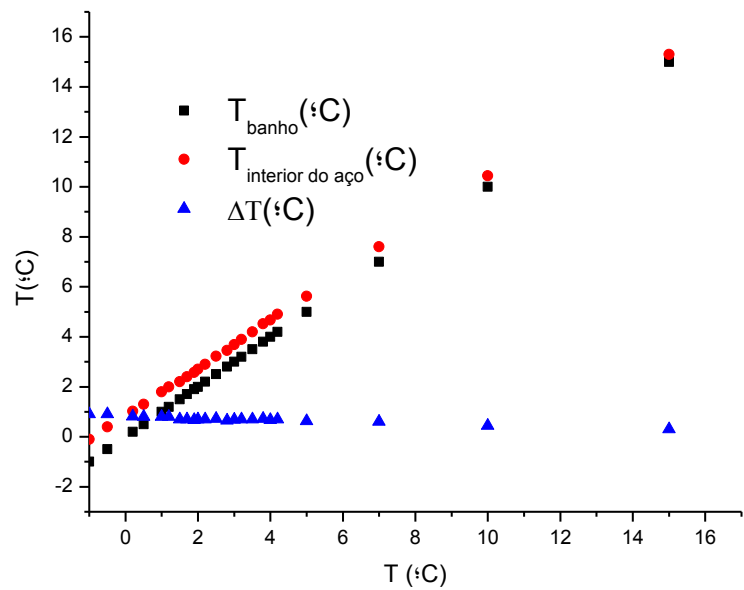
⁹ Xplorer GLX Pasco temperature sensor model PS-2125 com uma precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$

estes valores são mais elevados e mais dispersos relativamente aos valores das temperaturas anteriores medidos no orifício. Era um resultado esperado, uma vez que, a medição está mais próxima da superfície sendo influenciada pelo ambiente e os termómetros utilizados apresentam uma precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Tabela 6 - Valores da T_{banho} ,

$$\bar{T}_{orifício}, \Delta T = \bar{T}_{orifício} - T_{banho}$$

$T_{banho} (^{\circ}\text{C})$	$\bar{T}_{orifício} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta T (^{\circ}\text{C})$
15,0	15,3	0,3
10,0	10,4	0,4
7,0	7,6	0,6
5,0	5,6	0,6
4,2	4,9	0,7
4,0	4,7	0,7
3,8	4,5	0,7
3,5	4,2	0,7
3,2	3,9	0,7
3,0	3,7	0,7
2,8	3,5	0,7
2,5	3,2	0,7
2,2	2,9	0,7
2,0	2,7	0,7
1,9	2,6	0,7
1,7	2,4	0,7
1,5	2,2	0,7
1,2	2,0	0,8
1,0	1,8	0,8
0,5	1,3	0,8
0,2	1,0	0,8
-0,5	0,4	0,9
-1,0	-0,1	0,9



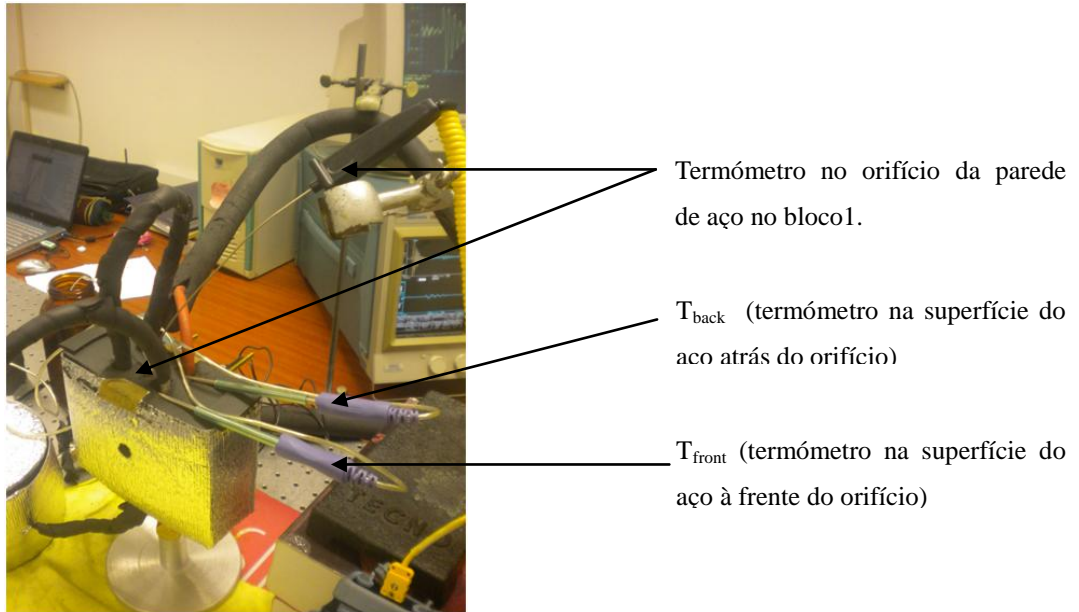


Fig.29 - Montagem dos termómetros

Tabela 7- Valores da T_{banho} , $\bar{T}_{orifício}$, T_{back} , T_{front} .

T_{banho} (°C)	$T_{orifício}$ (°C)	T_{front} (°C)	T_{back} (°C)
15.0	15.3	15.6	16.3
10.0	10.4	11.2	12.3
7.0	7.6	8.2	9.1
5.0	5.6	6.7	8.1
4.0	4.7	5.4	6.7
3.5	4.2	5.0	6.1
3.0	3.7	5.0	6.3
2.5	3.2	4.4	5.7
2.0	2.7	3.4	4.8
1.5	2.2	4.0	5.9
1.0	1.8	3.5	5.2
0.5	1.3	3.1	4.6
-0.5	0.4	2.3	3.8
-1.0	-0.1	1.8	3.2

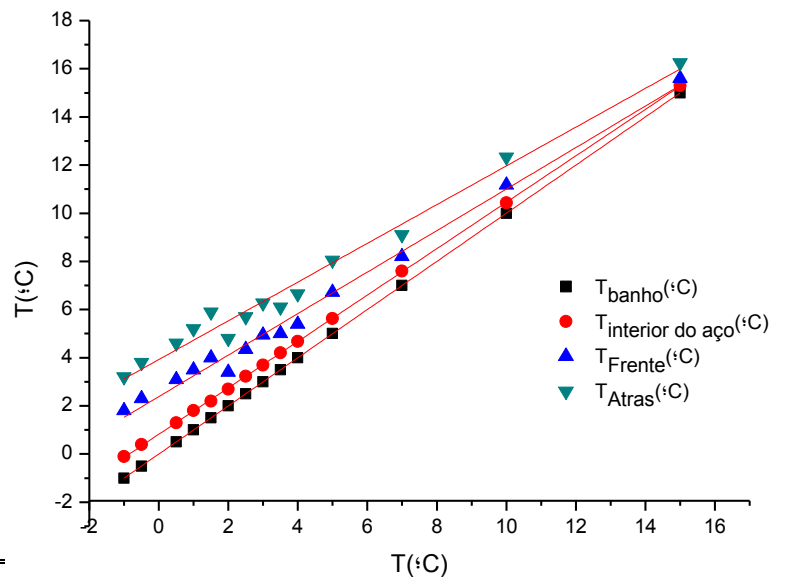


Gráfico 4 - Evolução da T_{banho} , $\bar{T}_{orifício}$, T_{back} , T_{front} .

O controlo da temperatura ao sistema foi efectuado em três pontos: ponto 1 – Banho controlador da temperatura; ponto 2 - Banho externo da serpentina; ponto 3 – Célula. A *fig.30* e a *tabela 8* seguintes sistematizam, de forma resumida, os valores obtidos.

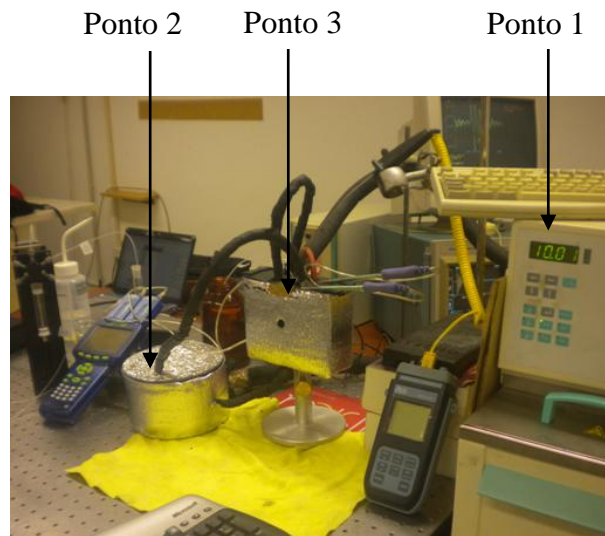


Fig.30 – Pontos de controlo da temperatura.

Tabela 8 - Valores da temperatura nos pontos 1,2 e 3.

T_{banho} (°C)	T_{banho} externo (°C)	T_{orificio} (°C)
15.0		15.3
10.0		10.4
7.0	7,4	7.6
5.0		5.6
4.0	4,5	4.7
3.5		4.2
3.0		3.7
2.5		3.2
2.0		2.7
1.5		2.2
1.0	1,5	1.8
0.5		1.3
-0.5		0.4
-1.0		-0.1

De modo a facilitar a variação da temperatura num procedimento experimental, elaborou-se o *gráfico 5* onde se faz a correspondência entre a temperatura do banho controlador da temperatura e a temperatura no orifício do termómetro, no bloco 1.

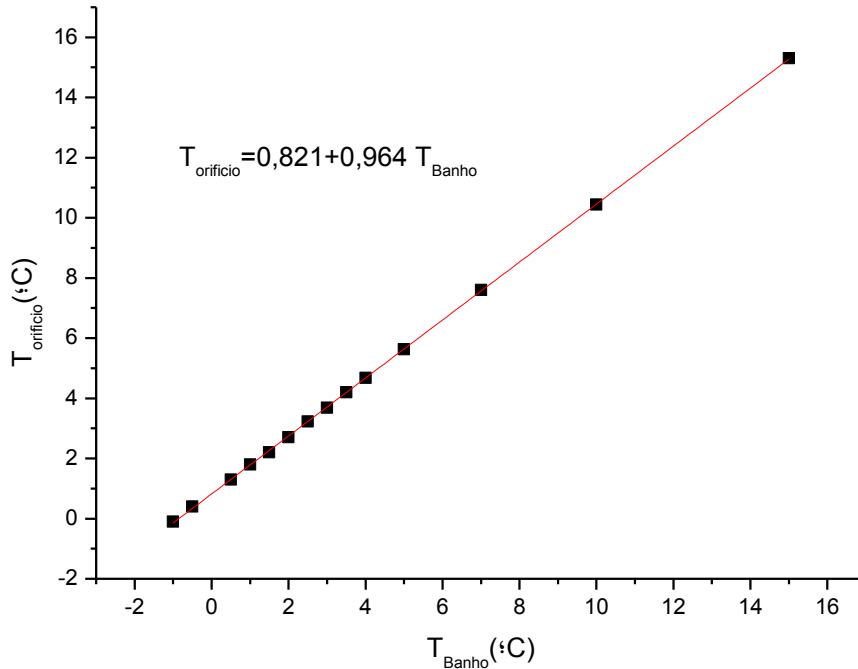


Gráfico 5 - Correspondência entre a temperatura do banho controlador da temperatura e a temperatura no orifício da célula.

Da equação do *gráfico 5*, verifica-se que o declive da recta (factor de correspondência) é 0,964 (praticamente 1). Este facto revela que a célula está termicamente bem isolada e que existe uma correspondência linear entre a temperatura do banho e a temperatura medida no orifício da parede de aço.

Os tempos médios entre cada medida de temperatura também foram controlados. A *tabela 9* apresenta o abaixamento de temperatura entre os 15 °C e 0,2 °C num trabalho experimental típico. Os tempos referidos na tabela referem-se ao tempo total de estabilização de cada temperatura e à realização de duas medidas experimentais a essa temperatura. Refira-se que a temperatura ambiental do laboratório influencia o tempo total.

Tabela 9 - Tempos médios entre cada medida de temperatura.

T (°C)	Tempo (min)
15	15
10	15
7	10
5	10
4,2	12
4	10
3,8	10
3,5	10
3,2	10
3	10
2,8	10
2,5	10
2,2	10
1,9	10
1,2	10
0,2	10

Da prática experimental, observei que o tempo médio de realização de um trabalho experimental é de $2H45min \pm 15min$, para uma temperatura ambiental entre 20°C a 25°C. Houve um ganho temporal interessante com o desenvolvimento deste projecto. Na metodologia anterior a este projecto, realizavam-se duas experiências fotoacústicas (~ controlo de 15 temperaturas) num dia. Utilizando esta metodologia, é possível a realização de quatro experiências fotoacústicas no mesmo período de tempo.

5.3 – Coeficiente de expansão térmica

Neste trabalho, foi estudado o comportamento da água destilada e soluções aquosas de sais com diferentes concentrações em função da temperatura, utilizando a calorimetria fotoacústica. Pretendia-se saber para que valores de temperatura, a água e as soluções salinas, não apresentavam sinal fotoacústico. Iniciou-se o trabalho com a realização do espectro fotoacústico da água na zona da radiação do infravermelho próximo (NIR) (800 nm a 2200 nm) para saber onde é que a água apresentava valores relativamente elevados de absorção.

5.3.1 - Espectro fotoacústico (NIR)

O espectro foi obtido variando o comprimento de onda de 10 nm em 10 nm. Para cada comprimento de onda foi medida a energia do laser. O sinal obtido foi corrigido pela energia do laser. O espectro fotoacústico experimental foi comparado com o da referência [32].

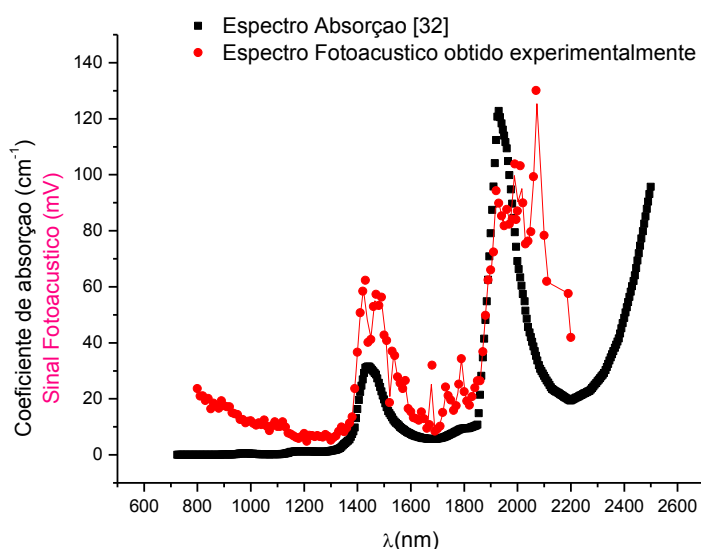


Gráfico 6 – Espectro fotoacústico da água destilada: vermelho - obtido experimentalmente; preto – retirado de [32].

Verificaram-se duas bandas intensas com picos a 2070 nm (4831 cm^{-1}) resultante da combinação de bandas envolvendo elongações assimétricas e de deformação angular e a 1427 nm (7008 cm^{-1}) devido a combinações assimétricas e simétricas. Realizou-se, de seguida, um conjunto de experiências, com o feixe do laser a 2000 nm, com água destilada e com as diferentes soluções salinas, fazendo variar a temperatura. O coeficiente de absorção molar da água, ϵ , a 2000 nm é de $1,25 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [32].

5.3.2 - Coeficiente de expansão térmico da água destilada

Neste procedimento experimental, pretendeu-se conhecer o valor da temperatura para a qual o sinal fotoacústico é nulo, $T_{\alpha=0}$. Foi estudado o valor de $T_{\alpha=0}$ nestas condições experimentais de isolamento já referido, com $V=0,9 \text{ ml}$ e $\text{Fluxo}=0,03\text{ml/s}$ para a água

destilada. Fez-se variar a temperatura da água dentro da célula e recolheram-se as ondas fotoacústicas às diferentes temperaturas, fazendo incidir luz laser a 2000 nm. O gráfico 7 mostra a onda fotoacústica da água destilada a diferentes temperaturas.

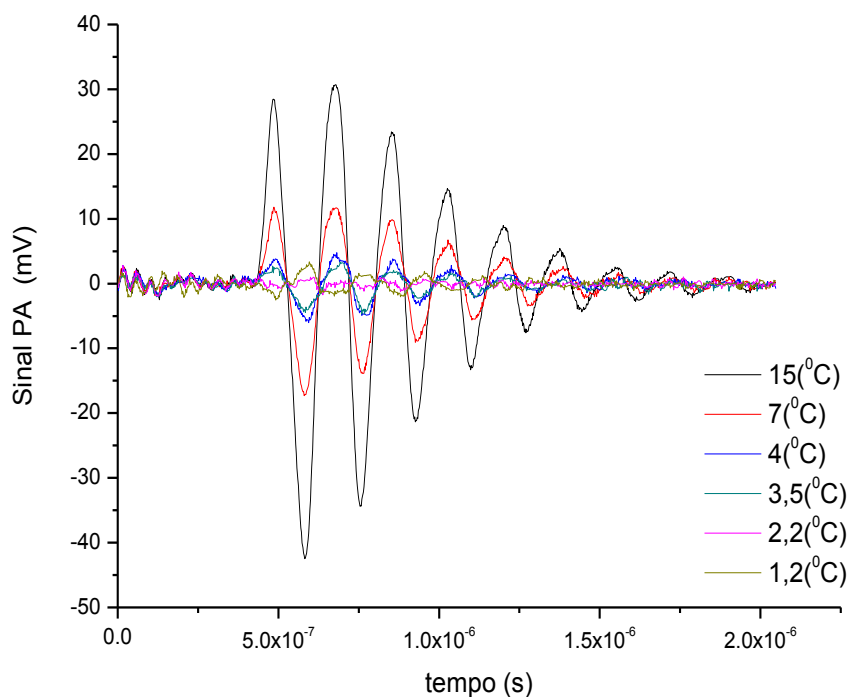


Gráfico 7 - Onda fotoacústica da água destilada a diferentes temperaturas.

A interpretação deste espectro foi feita traçando a área do primeiro pico observado, em função da temperatura respectiva, *gráficos 8-a* e *8-b*). Verificou-se que a $T_{\alpha=0}=3^{\circ}\text{C}$. Dado que o valor encontrado nunca coincidiu com o valor da literatura ($T_{\alpha}=3,98^{\circ}\text{C}$), foram implementadas diversas abordagens no sentido de eliminar interferências que pudessem afectar o sinal PA obtido. O espelho dielétrico foi substituído por uma janela de quartzo porque o espelho não era totalmente transparente a 2000 nm. Observou-se que o espelho absorvia luz do laser originando um sinal que interferia com o sinal PA. Fizeram-se, ainda, experiências onde se subtraiu o ruído instrumental ao sinal PA. Os *gráficos 8-a*) - espelho dielétrico; *8-b*) - com janelas de quartzo e sem ruído instrumental, reflectem duas abordagens tidas em conta para levar a cabo este estudo. Observou-se, ainda, que nos gráficos $\text{PA}=f(T)$, existiu quase sempre um desvio na tendência (*gráfico 8-a*) entre $3,5^{\circ}\text{C}$ e $4,5^{\circ}\text{C}$. Contudo o valor encontrado para $T_{\alpha=0}$ foi sempre, aproximadamente, 3°C .

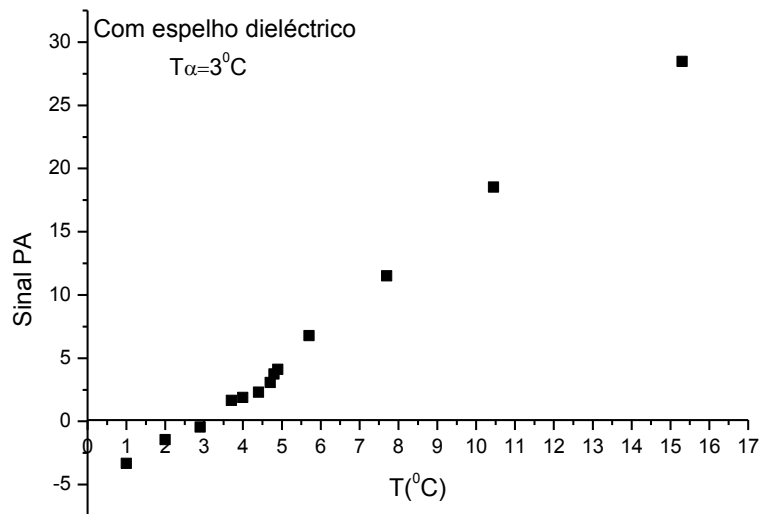


Gráfico 8- a) com espelho dieléctrico.

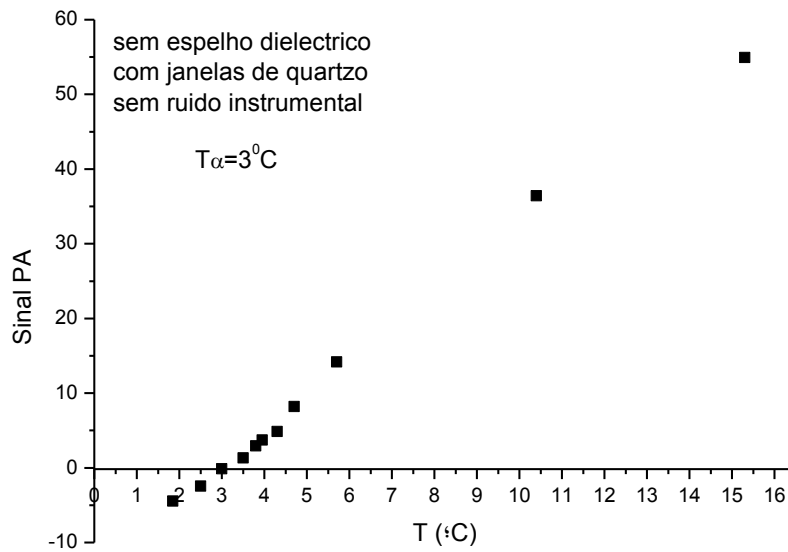


Gráfico 8 - b) Com janelas de quartzo e sem ruído instrumental.

A eq.6 sugere que, quando o coeficiente de expansão térmica for nulo a variação de pressão na solução deveria ser zero e como consequência não se deveria observar sinal acústico. Os valores tabelados referem que o coeficiente de expansão térmica é zero à temperatura de 3,98°C. Nestas experiências realizadas com água, essa situação só ocorre para $T_{\alpha=0}=3^{\circ}\text{C}$. Este facto pode ser explicado pelo aquecimento local da água, quando irradiada com luz laser, desviando a temperatura da amostra para valores menores que 3,98°C. A frequência de disparo do laser é 10 Hz, portanto executa disparos com

intervalos de tempo de 0,1 s. A energia associada a cada disparo (shot) do laser é de 0,5 mJ. A intensidade de luz laser absorvida localmente é determinada pela eq.55,

$$I_A(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot (1 - 10^{-A(\lambda)}) \Leftrightarrow I_A(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda)Cl}) \quad (55)$$

$$I_{A,2000 \text{ nm}} = 0,5 \times 10^{-3} \times (1 - 10^{-1,25 \times 55,5 \times 0,0127})$$

$$I_{A,2000 \text{ nm}} = 4,34 \times 10^{-4} \text{ J}$$

em que, $\varepsilon(\lambda)$ é a absorptividade molar da água, $\varepsilon_{\text{água}}(2000 \text{ nm})=1,25 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [32], C é a concentração da água, $C_{\text{água}}=55,5 \text{ M}$ e l é o percurso óptico, $l=127 \text{ }\mu\text{m}$. Num shot, o aumento de temperatura local (zona irradiada) pode ser calculada,

$$Q = I_{A,2000 \text{ nm}} = m C_p \Delta T \Leftrightarrow \Delta T = \frac{I_{A,2000 \text{ nm}}}{\rho A \cdot l C_p}$$

$$\Delta T = \frac{4,34 \times 10^{-4} \text{ J}}{1000 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times \pi \times (2,5 \times 10^{-3})^2 \text{ m}^2 \times 0,127 \times 10^{-3} \text{ m} \times 4206 \frac{\text{J}}{\text{kg K}}}$$

$$\Delta T = 0,04 \text{ K} \Leftrightarrow \Delta T = 0,04 \text{ }^\circ\text{C}$$

em que $I_{A,2000 \text{ nm}}$ é a energia absorvida ao comprimento de onda de 2000 nm do laser, ρ é a densidade da água a $3,98^\circ\text{C}$, $\rho_{\text{água}}(3,98^\circ\text{C}) = 1000 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$, A é a área de raio 2,5 mm irradiada, l é o percurso óptico, $l=127 \text{ }\mu\text{m}$ e C_p é a capacidade térmica mássica da água a $3,98^\circ\text{C}$, $C_{p,\text{água}}(3,98^\circ\text{C}) = 4206 \frac{\text{J}}{\text{kg K}}$.

Em 200 shots, o aumento de temperatura local seria $\Delta T = 8,27 \text{ }^\circ\text{C}$. Como a energia do laser absorvida localmente pela água não é totalmente dissipada entre cada disparo do laser, produz-se um efeito cumulativo na temperatura local. Ao fim de 200 shots, existe no local irradiado uma temperatura diferente e superior a $3,98^\circ\text{C}$. Por esse motivo, observa-se um sinal PA quando a temperatura do volume da amostra é $3,98^\circ\text{C}$. Sigrist et al. também observaram este fenómeno.

5.3.3 - Coeficiente de expansão térmica de soluções salinas

Estudou-se, também, o valor da temperatura para a qual o sinal fotoacústico é nulo, $T_{\alpha=0}$, em soluções aquosas de sais. Os *gráficos 9-a)* – soluções aquosas de cloreto de sódio e *9-b)* – soluções aquosas de tampão fosfato resumem os dados obtidos. Observa-se que à medida que as concentrações salinas aumentam o valor de $T_{\alpha=0}$ diminui.

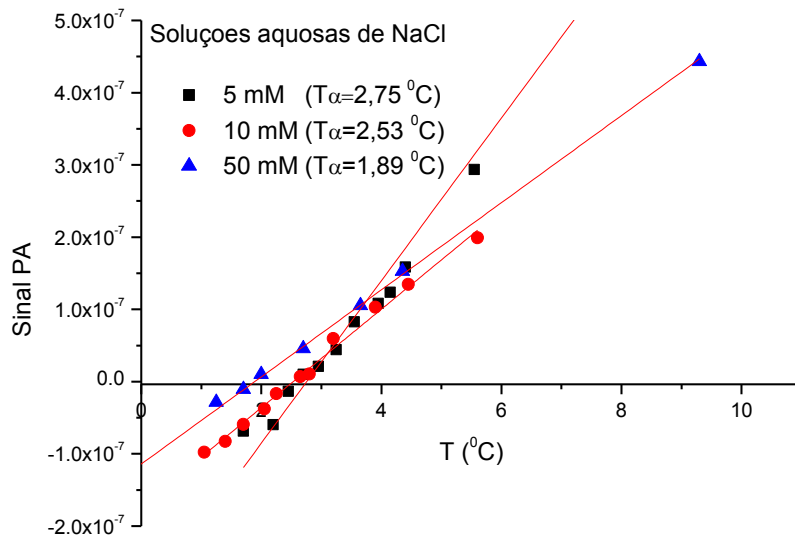


Gráfico 9 - a) Soluções aquosas de NaCl, 5 mM, 10 mM e 50 mM.

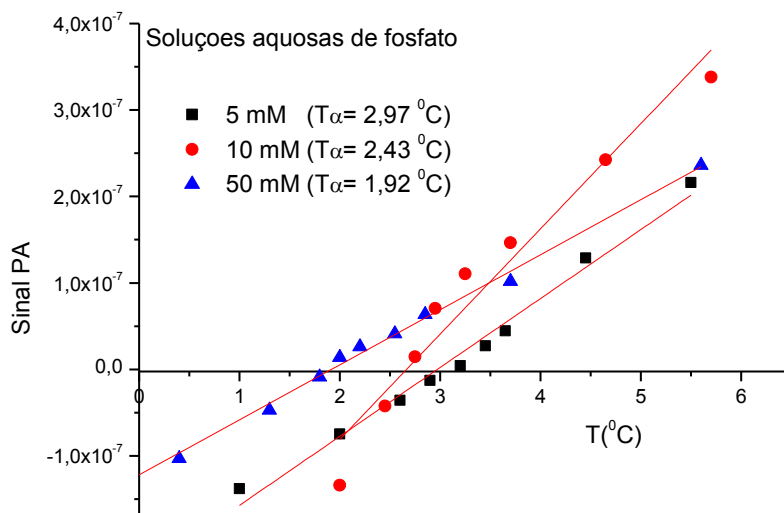


Gráfico 9 - b): Soluções aquosas de fosfato, 5 mM, 10 mM e 50 mM.

Com os valores de $T_{\alpha=0}$ obtidos da análise anterior para cada concentração de sal, estudou-se a variação da temperatura $T_{\alpha=0}$ com a força iónica, I , das soluções salinas e traçou-se o respectivo *gráfico 10*. Observa-se que a $T_{\alpha=0}$ diminui com o aumento de força iónica e tende para um limite a partir do qual permanece constante.

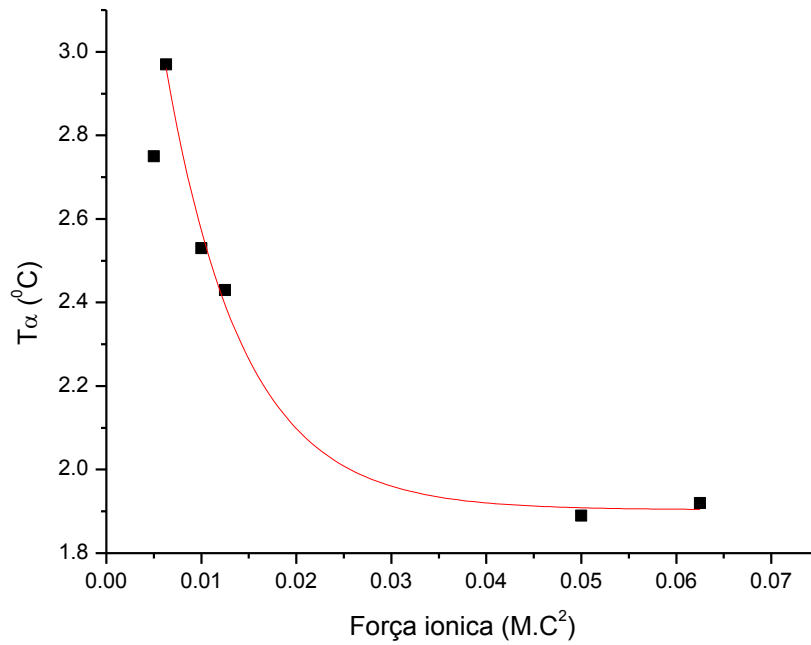


Gráfico 10 - $T_{\alpha=0}$ função da força iónica.

Capítulo 6 - Conclusões e trabalho futuro

6.1 - Conclusões

O objectivo do trabalho foi totalmente atingido, desde a concepção ao desenvolvimento e testes. O comportamento térmico do sistema foi avaliado, apenas, para o intervalo de temperatura de -1°C a 15°C . Foram implementados alguns testes de validação térmica ao sistema montado. Verificou-se que o sistema de controlo da temperatura responde muito bem quando se sujeita o sistema, a variações de temperatura. Os valores de temperatura medidos no banho de pré-arrefecimento e célula são ambos muito precisos apresentando, apenas, um pequeno desvio entre si. Este desvio observado está dentro do erro experimental. A temperatura medida no orifício da parede de aço da célula apresenta, apenas, uma pequena diferença de temperatura em relação à temperatura do banho controlador de temperatura, $\Delta T_{\text{max}}=0,8^{\circ}\text{C}$ $\Delta T_{\text{min}}=0,3^{\circ}\text{C}$, e permanece constante entre $1,5^{\circ}\text{C}$ a $4,2^{\circ}\text{C}$. O *gráfico 5* estabelece uma excelente correspondência entre a temperatura do banho controlador de temperatura e a temperatura medida no orifício da parede de aço da célula. Este facto permite definir, com muita rapidez, a temperatura desejada para o sistema. Para validação do sistema, tentou encontrar-se o valor de temperatura igual a $3,98^{\circ}\text{C}$ para a qual o coeficiente de expansão térmica da água é zero, $T_{\alpha=0}$. Na realização dos procedimentos experimentais, o valor encontrado para a água foi $T_{\alpha=0}=3^{\circ}\text{C}$. Esta diferença está relacionada com a transferência de calor da luz laser para a água aumentando localmente a temperatura da água. O conhecimento deste valor de temperatura é importante para o estudo de substâncias que geram uma onda devido a alterações do volume molecular.

A presença de sais em água influencia a $T_{\alpha=0}$. O *gráfico 10* mostra a relação de dependência entre a força iónica e a $T_{\alpha=0}$. Verifica-se que à medida que aumenta a força iónica, $T_{\alpha=0}$ diminui e tende para um valor limite que é independente da força iónica. Este gráfico é um excelente guia de trabalho pois permite determinar, previamente, $T_{\alpha=0}$ para uma dada solução salina.

Do ponto de vista prático, outro avanço considerável que este projecto proporcionou foi o da redução para cerca de metade do tempo de execução de uma experiência com 15 medições de temperatura. Anteriormente a este projecto, faziam-se

duas experiências por dia. Após a implementação desta metodologia é possível a realização de quatro experiências no mesmo período de tempo.

A selecção dos materiais foi feita em função das características físicas e químicas, bem como o custo e a disponibilidade no mercado. As estruturas metálicas do banho de pré-arrefecimento e da célula são reproduzíveis, uma vez que foram elaborados os respectivos desenhos técnicos, colocados no apêndice deste trabalho. Os isolamentos desenvolvidos também são de fácil execução e muito funcionais. Na realização deste projecto houve a necessidade de se proceder a uma abordagem interdisciplinar, desde a Fotoquímica, Química-Física, Matemática, Tecnologia Química, Física.

O sistema está operacional.

6.2 - Trabalhos futuros

Célula Peltier

No decorrer do projecto anteriormente descrito, surgiu a ideia de desenvolver uma célula para calorimetria fotoacústica usando a geometria de irradiação frontal, recorrendo a um sistema de controlo de temperatura completamente diferente e inovador – módulos termoeléctricos ou módulos Peltier (MP).



Fig.31 – Módulo peltier convencional.

Este conceito permitiria eliminar todas as condutas associadas ao sistema de controlo de temperatura e proporcionar mais espaço de trabalho ao utilizador com a mesma precisão no controlo de temperatura. A ideia de se utilizarem módulos Peltier para o controlo da temperatura não é nova. Existem muitos equipamentos que recorrem a este fenómeno no quotidiano, como por exemplo, nos frigoríficos. O MP baseia-se no efeito Peltier e consiste na junção de dois metais diferentes onde uma corrente eléctrica produz um

fluxo de calor. Os dois metais são semi-condutores altamente dopados de modo a criar um excesso de electrões num dos metais (N) e uma deficiência no outro (P). Quando se aplica uma tensão ao sistema, o campo eléctrico associado gera um movimento de electrões do metal do tipo N para o metal do tipo P. Este facto origina um fluxo de calor de uma superfície metálica (fria) para a outra superfície metálica (quente). A *figura 32* é representativa do processo.

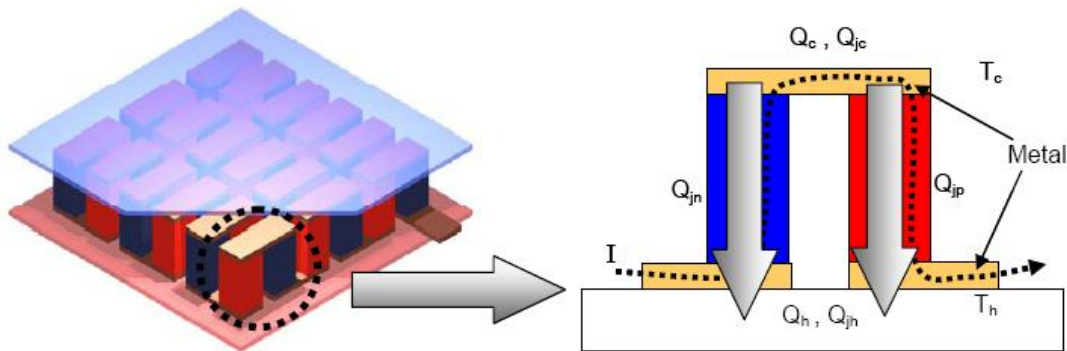


Fig.32 – Módulo Peltier convencional: detalhe das junções.

O calor absorvido na junção fria é bombeado para a junção quente, onde a quantidade de transferência de calor é directamente proporcional à intensidade da corrente que atravessa o circuito e ao número de pares N e P (junções). A ideia a implementar seria a de colocar em contacto directo os MP com a parede de aço da célula de forma a estabelecer um fluxo de calor do interior da célula de aço para o exterior (meio ambiente). Deste modo, a solução da amostra seria arrefecida. Os elementos fundamentais para a construção desta célula seriam os seguintes: (1) bloco1 – maciço, contém a janela de quartzo, contém os módulos Peltier ligados em série, três orifícios no topo (saída e entrada da solução da amostra e termómetro) e uma conduta incrustada no bloco; (2) bloco 2 – maciço, contém o espelho dieléctrico; (3) um espelho dieléctrico, uma janela de quartzo e um separador de cobre; (4) um dissipador de calor; (5) uma ventoinha e (6) controlador de temperatura, *fig.33*.



Fig.33 – Componentes da célula Peltier.

Surgiu a ideia de colocar uma conduta de aço que transporta a amostra para o percurso óptico, incrustada no interior do bloco de modo a que o arrefecimento ou aquecimento da amostra se fizesse no interior da célula, *fig34*.

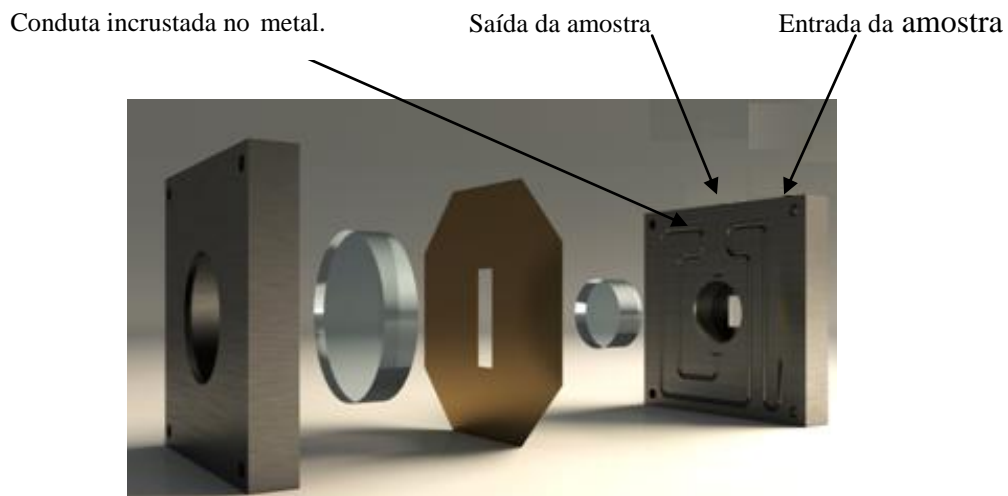


Fig.34 – Conduta incrustada no bloco que transporta a amostra para o percurso óptico ao mesmo tempo que é termostalizada.

O calor transferido para o ambiente pelos MP instalados no lado exterior da célula implicaria o arrefecimento do interior da célula e por conseguinte da amostra. A selecção e controlo da temperatura da amostra seriam efectuados por um controlador de temperatura dado que existe uma relação directa entre o calor bombeado e a intensidade de corrente que atravessa o circuito eléctrico. Como a temperatura do meio ambiente vai

aumentar, e de modo a garantir uma boa eficiência dos MP, ter-se-ia que adicionar um dissipador de calor e uma ventoinha para o efeito, *fig35*.

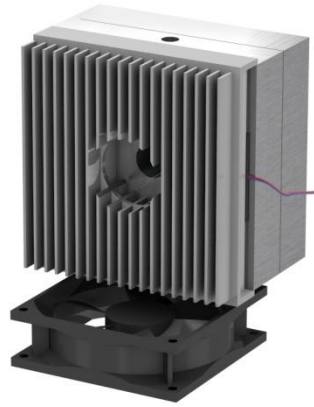


Fig35- Célula Peltier com os elementos acoplados.

As trocas de calor promovidas por um MP dependem de vários factores: T_C , temperatura da superfície fria, T_H , temperatura da superfície quente, ΔT , diferença entre a temperatura da superfície quente, T_H , e a temperatura da superfície fria, T_C , Q_H , quantidade de calor no lado quente, Q_C , quantidade de calor do lado frio. No caso de se pretender baixar a temperatura do corpo de aço de 20°C para 0°C , a potência de calor a ser transferida da célula de aço para o exterior seria,

$$Q = \rho_{aço} A L C_{p,aço} \Delta T \quad (56)$$

com densidade do aço, $\rho_{aço} = 8055 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$, capacidade térmica, $C_{p,aço} = 480 \frac{\text{kJ}}{\text{kg K}}$, espessura da célula, $L=2,4 \text{ cm}$, área de célula, $A=7,7 \text{ cm} \times 7,7 \text{ cm}$, um tempo de operação de 5 min, $\Delta T = 20^\circ\text{C}$, diferença entre a temperatura no interior da célula (0°C) e a temperatura ambiente (20°C):

$$Q = 8055 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \times 5,9 \times 10^{-3} \text{m}^2 \times 24 \times 10^{-3} \text{m} \times 480 \frac{\text{J}}{\text{kg K}} \times 20 \text{ K} = 1,1 \times 10^4 \text{ J}$$

Para um tempo de operação de 5 minutos, a potência de calor a transferir do interior para o exterior seria,

$$P = Q_H \frac{1,1 \times 10^4 \text{ J}}{300 \text{ s}} = 36,7 \text{ W}$$

Para se processar esta transferência de calor [33,34], a potência eléctrica disponibilizada pelo MP com 3,2 A e 8,8 V (MULTICOMP MCPE-071-10-15) necessária será de $P_{eléctrica} = 3,2 \times 8,8 = 28,2 \text{ W}$. O lado quente do sistema terá que dissipar 36,7 W dividido por quatro MP que dá uma potência total de $P_{total} = \left(\frac{36,7}{4}\right) + 28,2 = 37,4 \text{ W}$ por MP. No caso de quatro MP, $P_{total}=149,5 \text{ W}$. Utilizando um dissipador com uma resistência térmica de 0,15 °C/W, a temperatura do dissipador, T_H , aumentará 22,4°C e é igual a $T_H = T_{amb} + \left(\frac{°C}{W}\right) \times Q_H \Leftrightarrow T_H = 20 + 0,15 \times 149,2 = 42,4°C$. Para atingir a diferença de temperatura de 20°C pretendida entre o corpo de aço da célula e o meio ambiente, existirá uma diferença de temperatura de 42,4 °C entre o lado frio e o lado quente dos MP. Das características técnicas dos MP, em apêndice, quando o $\Delta T=T_H-T_C$ é máximo a quantidade de calor transferida é zero, portanto, para aumentar a eficiência dos MP é necessário baixar a diferença de temperatura de 42,4 °C para um valor menor, recorrendo a uma ventoinha com a potência adequada.

O comprimento da serpentina, com 0,75 mm de diâmetro interno, a incrustar no interior do bloco metálico, pode ser determinado recorrendo à eq.28 e pode admitir-se que a temperatura da parede de aço da serpentina, de 0,625 mm de espessura, é $T_s=1°C$, constante e igual à temperatura do bloco metálico. Deste modo, ocorre apenas transferência de calor por convecção do interior do fluido para a parede da serpentina, T_s . T_2 e T_1 são as temperaturas de saída e de entrada da amostra na serpentina, respectivamente, ρ, Q_v, C_p, h são dados na secção 5.2.2.2, pois as condições de escoamento são as mesmas.

$$L = - \ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} \times \frac{m C_p}{h \pi D} = - \ln \frac{T_s - T_2}{T_s - T_1} \times \frac{\rho Q_v C_p}{h \pi D}$$

$$L = - \ln \frac{0 - 1}{0 - 20} \times \frac{999,1 \frac{kg}{m^3} \times 0,022 \frac{m^3}{s} \times \pi \times (0,75 \times 10^{-3})^2 m^2 \times 4189 \frac{J}{kg K}}{2879 \frac{J}{s m^2 K} \times \pi \times 0,75 \times 10^{-3} m^2}$$

$$L = 0,024 m = 2,4 cm$$

O comprimento do tubo a incrustar no bloco é de $L = 0,024 m = 2,4 cm$. Como é comum dar uma margem de 30% em relação ao valor calculado, o comprimento do tubo de serpentina deverá ser $L = 2,4 \times 1,3 = 3,12 cm$.

Capítulo 7 - Bibliografia

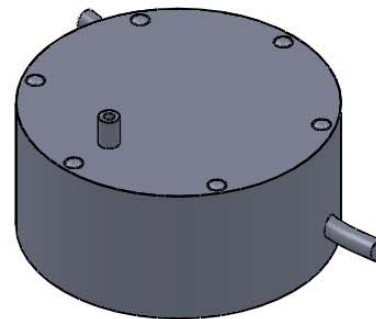
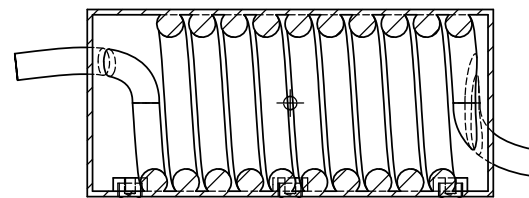
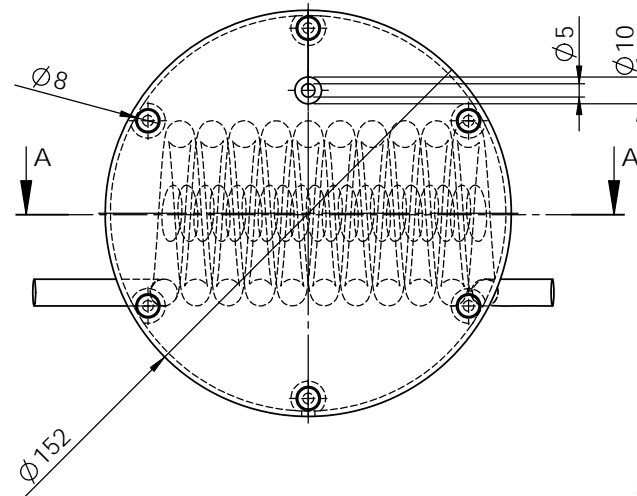
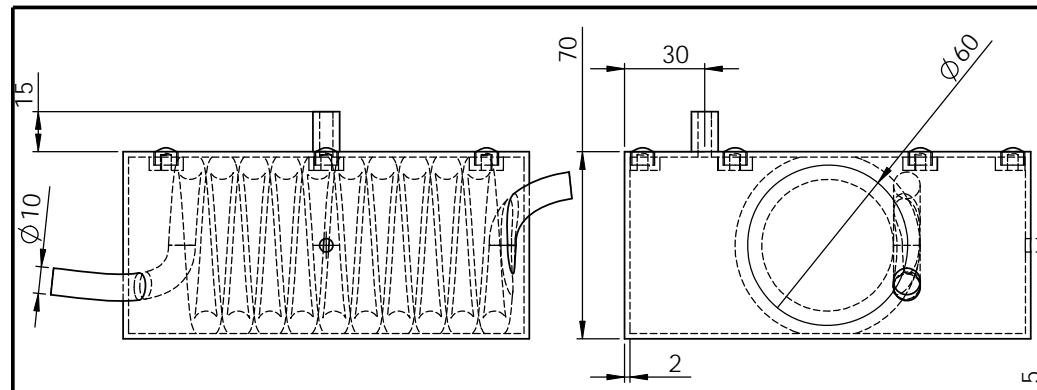
- [1] A. G. Bell, *Philosophical Magazine*, **11**, 510 (1881).
- [2] Braslavsky, S. E., Heibel, G. E., *Chemical Reviews*, **92**, 6 (1992).
- [3] D. Ducharme, A. Tessier, R.M. Leblanc, *Rev. Sci. Instrum.* **59** 1461 (1979).
- [4] Braslavsky S. E., Heihoff K., *Chem. Phys. Lett.*, **131**, 183 (1986).
- [5] Peters, K.S., Rothberg L.J., Simon J. Bernstein, M., *Journal American Society*, **105**, 3464 (1983).
- [6] Melton L. A., Ni T., Lu Q., *Rev. Sci. Instrum.* **60**, 3217 (1989).
- [7] Arnault L. G., Caldwell R. A., Elbert J. E., Melton L. A., *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 5381 (1992).
- [8] Puchenkov O. V., Malkin S., *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 3 (1995).
- [9] Autrey t., Foster, N. S., Klepzing K., Amonette J. E., Daschbach, J.L., *Rev. Sci. Instrum.*, **69**, 6 (1998).
- [10] Autrey t., Foster, N. S., Klepzing K., *Journal of Photochemistry & Photobiology*, **125**, 13-19, (1999).
- [11] <http://www.cpac.qui.uc.pt>, consultado em Março de 2011.
- [12] Grabowski J., Jay G., Indig G., *Biophys. Journal*, **61**, 631-638 (1992).
- [13] Angeloni L., Feis A., *Jou. Phys. Chem B*, **105**, 2638-2643 (2001).
- [14] Gensch, T., Viappiani C., *Photochem. Photobiol Science*, **2**, 699-721 (2003).
- [15] Chen H. L., Hsu, J.C., Viet, M. H., Li M. S., Hu C.K., Liu C.H., *Proteins*, **78**, 2973-2983 (2010).
- [16] Sigrist, M. W., *J. Appl. Phys.*, **50**, 7, 1 (1986).
- [17] Tam A. C., *Ultrasensitive Laser Spectroscopy*, Academic. New York, (1983).
- [18] Arnault L.G., Schaberle F. A., *Photochem. Photobiol.Sci*, **9**, 812-822 (2010).
- [19] Peters K.S., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 294-302, (1994).
- [20] Arnault L.G., Pinheiro M., Gonçalves A. M., Formosinho S.J., Pereira M. M., *American Chemical Society*, **106**, 15, 3787-3795 (2002).
- [21] www.isbu.ac.uk/water/, consultado em Julho de 2011.
- [22] Atkins P. W. *Physical Chemistry*, 5ª edição, Oxford University Press, Oxford (1994).
- [23] Kell G. S., *Journal of Chemical and Engineering Data.*, **20**, 1, (1975).
- [24] Putintsev, N.M., *Doklady Physical Chemistry*, **401**, part 2 (2005).
- [25] Chang, R., *Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences*, University Science Books (2000).
- [26] Galinski E., Stein M, Amendt B, Kinder M., *Comp. Biochem. Pyisiol.*, **117A**, 3, 357-365 (1997).
- [27] Incropera, F.P., De Witt, D.P., *Fundamentos de Transferência de calor e massa*, 5ª edição, LTC editora, Rio de Janeiro (2003).
- [28] Carvalho M.G., *Transferência de calor por convecção forçada*, capítulo 5 (2005).
- [29] <http://www.arsinco.com.br/salalimpa.htm>, consultado em Agosto.2011.
- [30] <http://pt.scribd.com/doc/57561351/sala-limpa>, consultado em Agosto.2011.
- [31] <http://engineeringtoolbox.com>, consultado em 11.Agosto.2011.
- [32] Palmer K.F., Williams D., *Optical Properties of water in the near infrared*, *Journal of the Optical Society of America*, **64**, 1107-1110 (1974).

- [33] http://pcbheaven.com/wikipages/The_Peltier_Thermo-Element/ consultado em Agosto.2011.
- [34] http://www.eletrodomesticosforum.com/efeito_peltier.htm, consultado em Agosto.2011.
- [35] Buij K., Choppin G.R., *Journal of Chemical Physics*, **39**, 8 (1963).
- [36] Hepler L.G., *Canadian Journal of chemistry*, **47**,4613 (1969).
- [37] Mancinelli R., Botti A., Bruni F., Ricci M.A., Soper A. K., *Phys. Chem. Chem. Phys*, **9**, 2959-2967 (2007).

Apêndices

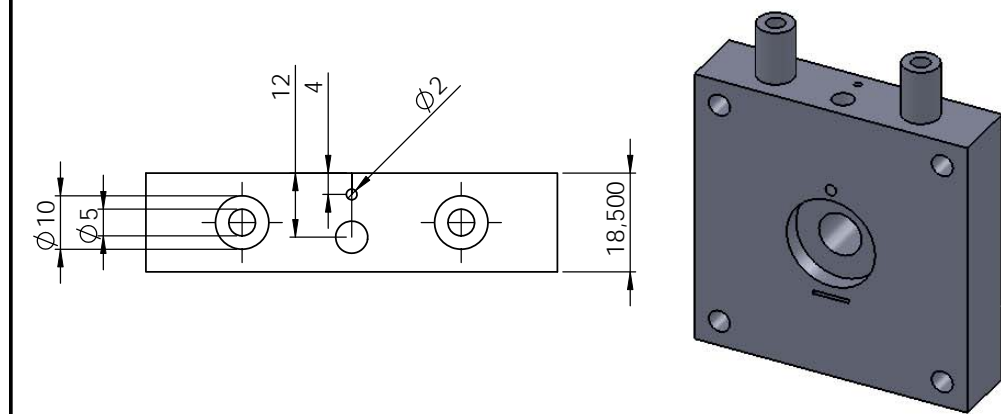
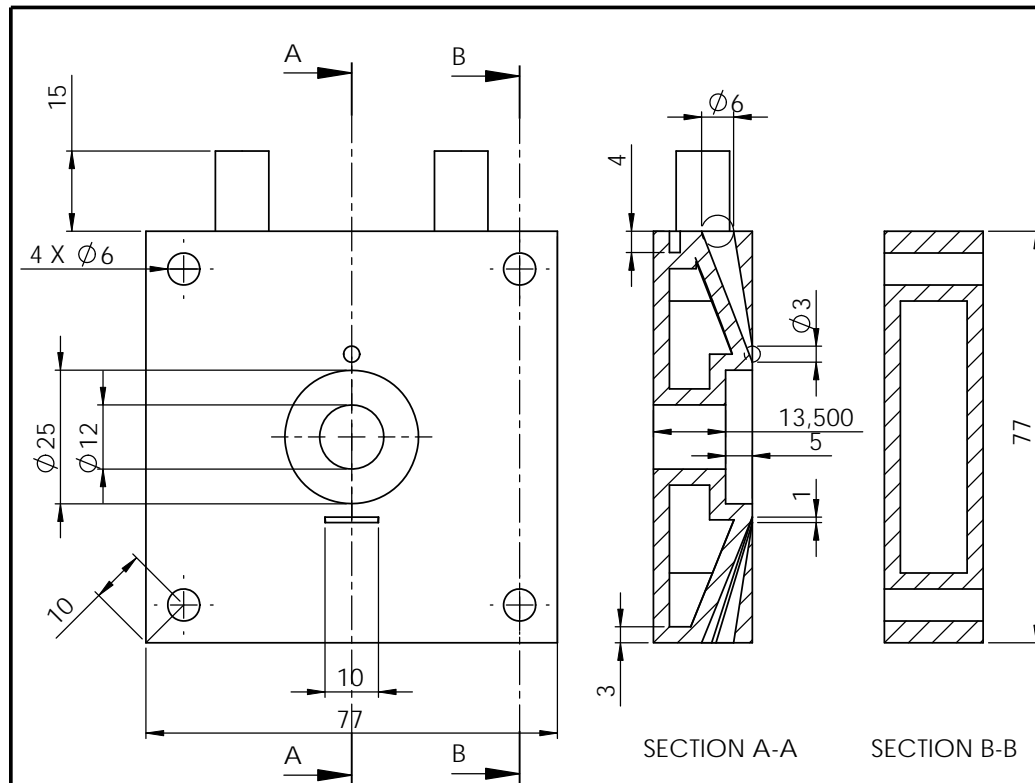
A₁ – Desenhos Técnicos

A₂ – Artigo Publicado

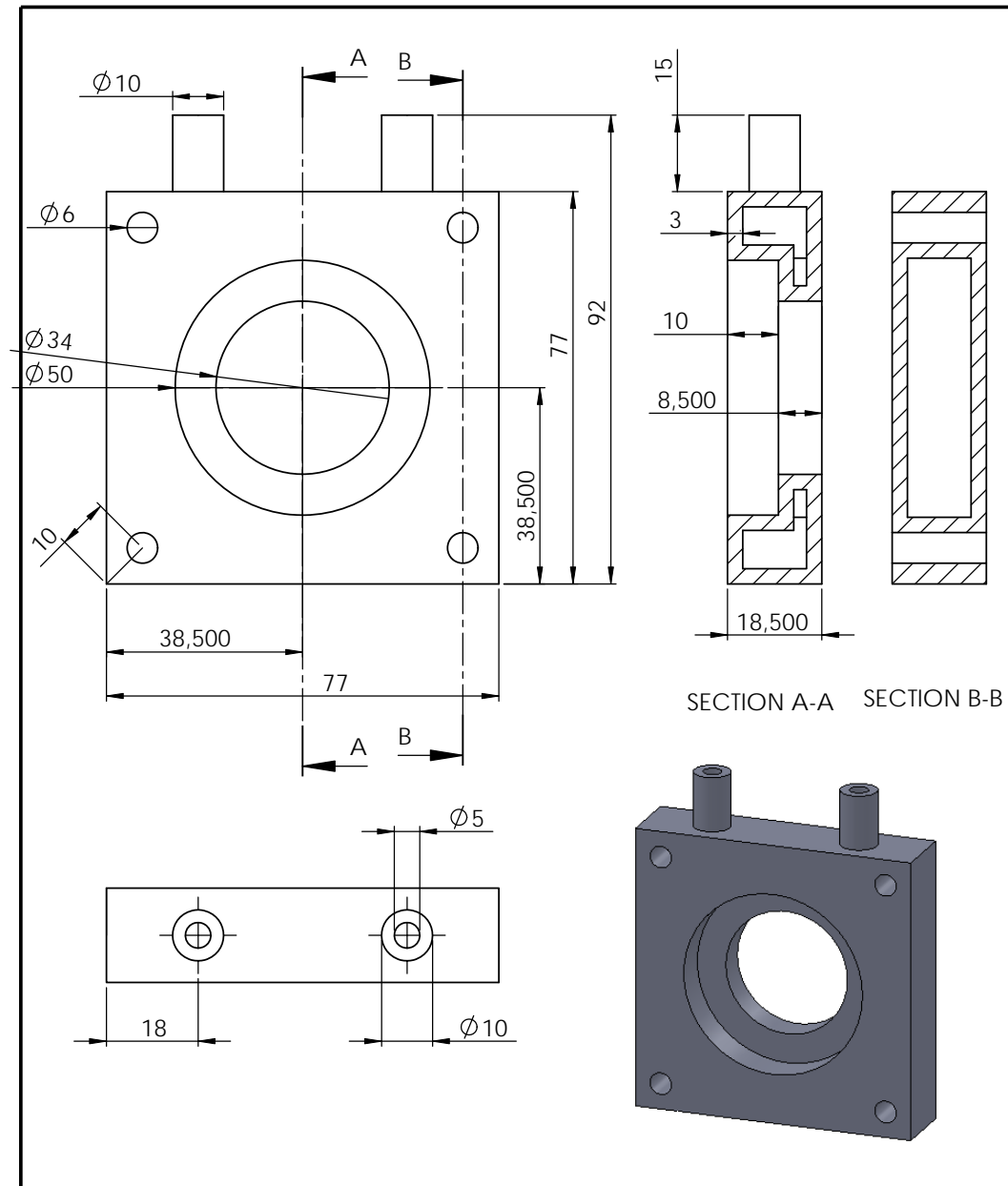


SECTION A-A
SCALE 1 : 2

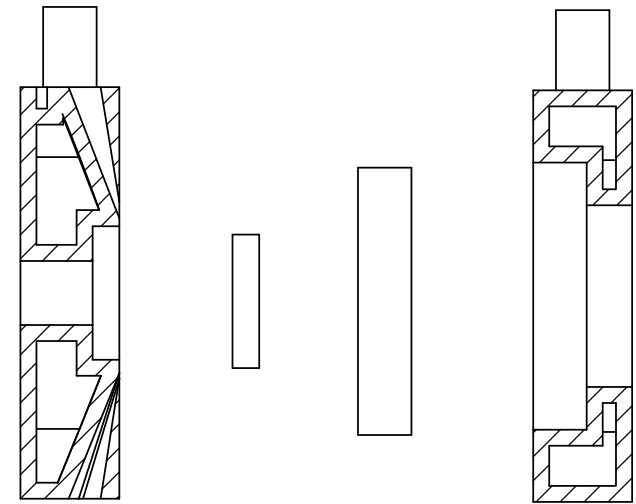
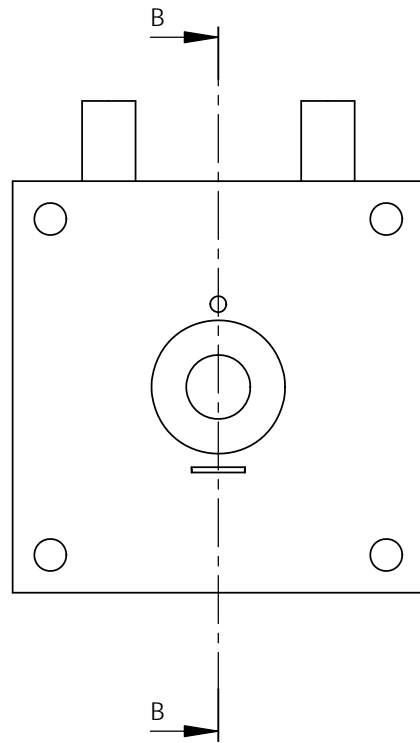
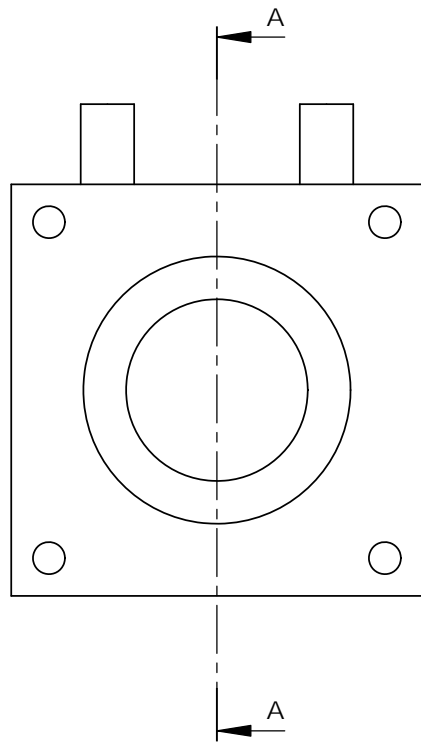
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS		FINISH:		DEBUR AND BREAK SHARP EDGES		DO NOT SCALE DRAWING		REVISION	
SURFACE FINISH:									
TOLERANCES:									
LINEAR:									
ANGULAR:									
DRAWN		SIGNATURE		DATE		TITLE:			
CHK'D									
APPV'D									
MFG									
Q.A				MATERIAL:		DWG. NO.		A4	
						Banho Externo			
				WEIGHT:		SCALE:1:5		SHEET 1 OF 1	



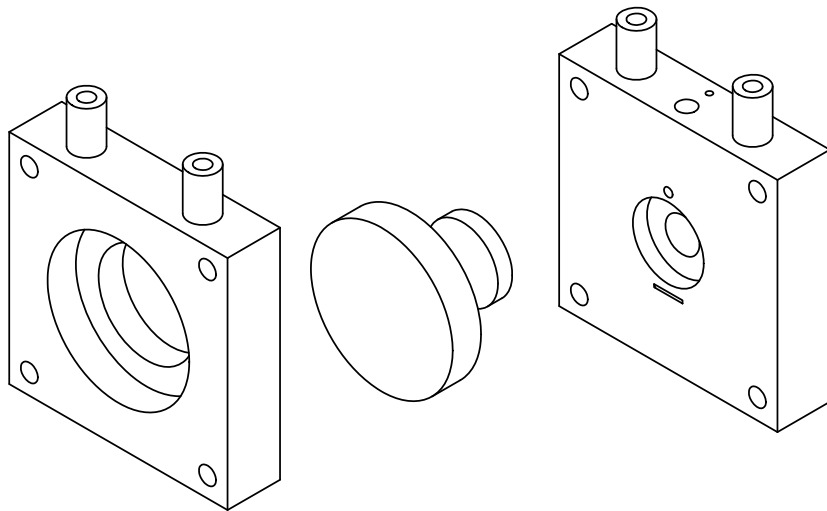
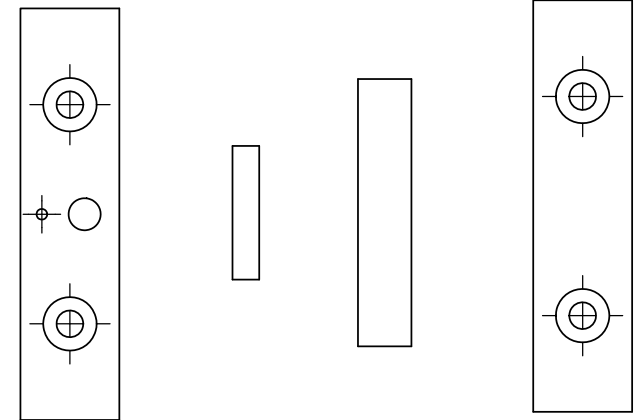
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS SURFACE FINISH: TOLERANCES: LINEAR: ANGULAR:				FINISH:	DEBUR AND BREAK SHARP EDGES	DO NOT SCALE DRAWING	REVISION
DRAWN	NAME	SIGNATURE	DATE			TITLE:	
CHK'D							
APPV'D							
MFG							
Q.A							
				MATERIAL:	DWG NO.	bloco1	A4
				WEIGHT:	SCALE:1:1	SHEET 1 OF 1	



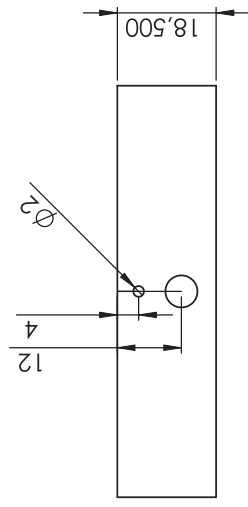
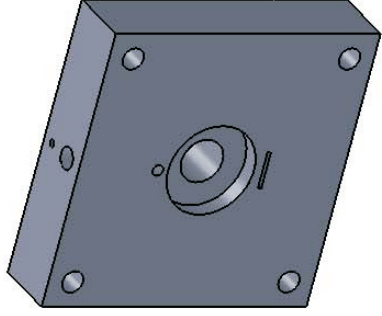
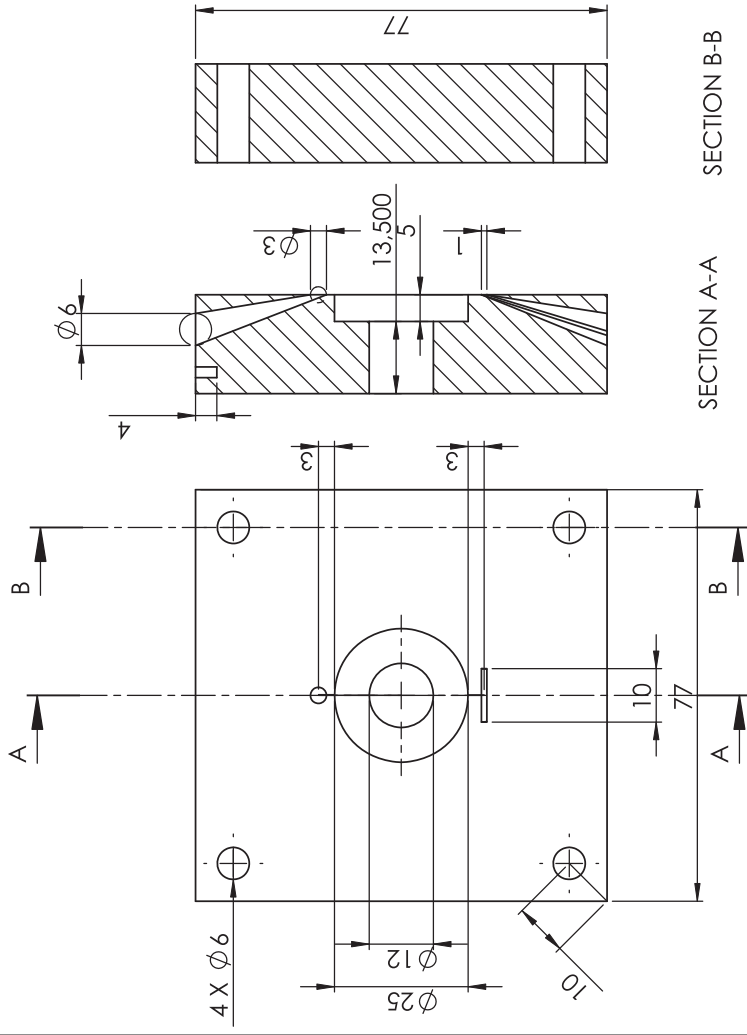
UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS SURFACE FINISH: TOLERANCES: LINEAR: ANGULAR:			FINISH:	DEBUR AND BREAK SHARP EDGES	DO NOT SCALE DRAWING	REVISION
DRAWN				TITLE:		
CHK'D						
APPV'D						
MFG						
Q.A				MATERIAL:	DWG NO.	A4
				WEIGHT:	SCALE:1:1	SHEET 1 OF 1



SECTION B-B

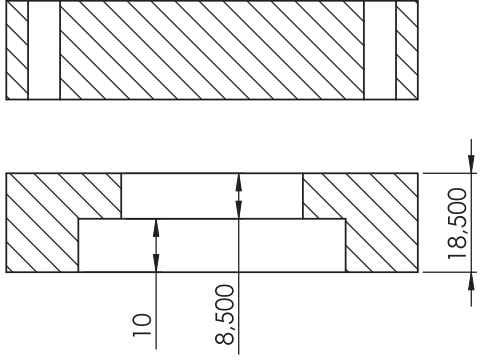
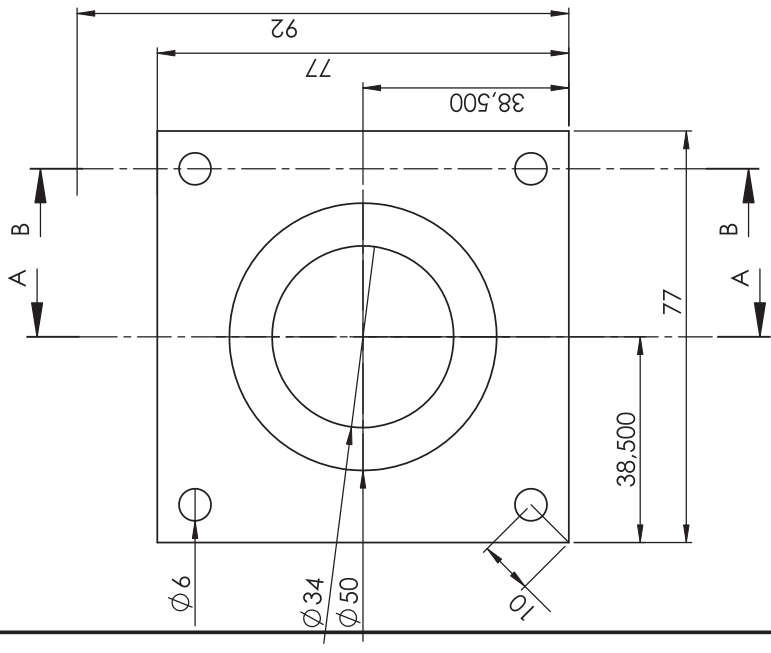


UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS			FINISH:		DEBUR AND BREAK SHARP EDGES		DO NOT SCALE DRAWING		REVISION	
SURFACE FINISH:										
TOLERANCES:										
LINEAR:										
ANGULAR:										
DRAWN		NAME	SIGNATURE	DATE			TITLE:			
CHK'D										
APP'VD										
MFG										
Q.A					MATERIAL:		DWG NO.		A3	
							Desenho expandido			
					WEIGHT:		SCALE:1:1		SHEET 1 OF 1	

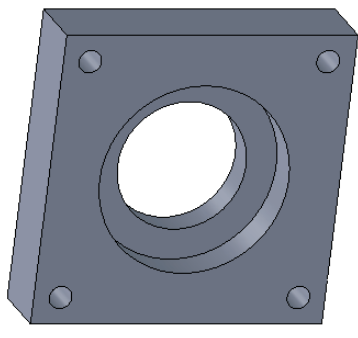


SECTION A-A SECTION B-B

UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS FINISH: TOLERANCES: LINEAR: ANGULAR:		FINISH:		DEBUR AND BREAK SHARP EDGES		DO NOT SCALE DRAWING		REVISION	
DRAWN	NAME	SIGNATURE	DATE						
CHKD									
APPVD									
MFG									
G.A.									
TITLE: Peltier				MATERIAL:		DWG NO.:		SHEET 1 OF 1	
				bloco1,		A4			
				SCALE:1:1					



SECTION A-A SECTION B-B



UNLESS OTHERWISE SPECIFIED: DIMENSIONS ARE IN MILLIMETERS DECIMALS: THREE TOLERANCES: LINEAR: .125 ANGULAR: .5		FINISH: NONE		DEBUR AND BREAK SHARP EDGES		DO NOT SCALE DRAWING		REVISION	
DRAWN	NAME	SIGNATURE	DATE			TITLE: Peltier			
CHKD						DWG NO. bloco2,		A4	
APPVD						SCALE: 1:1		SHEET 1 OF 1	
MFG						MATERIAL:			
G.A.						WEIGHT:			

Multi-spectral photoacoustic mapping of bacteriochlorins diffusing through the skin: exploring a new PAT contrast agent

Fábio A. Schaberle¹, Luís A. F. Reis², Gonçalo F. F. Sá², Carlos Serpa², Artur R. Abreu¹,
Mariette M. Pereira², Luis G. Arnaut^{1,2}

¹Luzitin S.A., Ed. Bluepharma, 3045-016 Coimbra, Portugal

²Chemistry Department, University of Coimbra, 3000-535 Coimbra, Portugal

ABSTRACT

A skin depth map was built reconstructing photoacoustic signals at several wavelengths of visible and infrared light. The mapping technique was used to follow the diffusion through the skin of near-infrared absorbing dyes. Such dyes can be useful for photodynamic therapy (PDT) of skin lesions and are investigated as contrast agents for photoacoustic tomography (PAT), because they strongly absorb light at wavelengths where the skin is more transparent.

Keywords: Multi-spectral Photoacoustic Mapping, Contrast Agent, Bacteriochlorins.

1. INTRODUCTION

Endogenous chromophores have been thoroughly investigated as contrast agents for photoacoustic tomography (PAT).¹ For example, endogenous molecules that absorb light in the phototherapeutic window (650-900 nm), such as oxygenated and deoxygenated hemoglobin, have been used to produce PAT functional images of the blood vessels. These technological approaches are valuable in the diagnosis of a variety of diseases. However, there are pathologies for which PAT will only work properly if an exogenous contrast agent is used. This is likely to be the case of neoplastic diseases, because hyperproliferative cells are difficult to distinguish from normal cells without the use of exogenous markers. For such diseases, early stage diagnosis can make the difference between a successful or an unsuccessful treatment. The difficulty with neoplasms at an early stage is the amount of affected cells and, consequently, the smallness of the tumor mass. Sub-millimeter tumors are very difficult to detect with the traditional imaging techniques.² The major advantages of PAT are the high spatial resolution enabled by the use of ultrasound frequencies and in the penetration depth limited only by one-way light absorption and scattering. Nevertheless, PAT can only be successful in the detection of tumors in early stages if a good contrast agent is present. We believe that an important barrier to be overcome by PAT as a diagnostic tool for the detection of early stage tumors is the availability of adequate tumor contrast agents.

Halogenated tetraphenylbacteriochlorins optimized for photodynamic therapy (PDT)³⁻⁶ of cancer are a good starting point for the development of PAT contrast agents,⁷ because they combine a strong absorption in the phototherapeutic window, a significant accumulation in the tumors and favorable pharmacokinetics. Such dyes have a molar absorption coefficient ϵ ca. $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 743 nm. At this wavelength endogenous dyes such as melanin or hemoglobin have small absorption coefficients and the absorption of water is not yet appreciable.⁸ This leads to an optical penetration depth of 2.3 mm at 750 nm for human skin,⁹ which allows for the measurement of photoacoustic signals with minimum background interference. Additionally, such bacteriochlorins can be synthesized in one step from the precursor porphyrin and are photostable for tens of joules absorbed.^{5,6} Notwithstanding the photophysical properties tailored for PDT applications, these bacteriochlorins can also generate photoacoustic (PA) waves with reasonable efficiency, as we will show in this paper. In previous work, we showed that a sulfonated halogenated bacteriochlorin attains a tumor-to-muscle ratio of 3 and tumor-to-skin ratio of 5 just 24 hours after of the intravenous administration.³ Its biodistribution shows initial accumulation mainly in the spleen, kidneys and liver, but after 48 there are only vestigial quantities of this bacteriochlorin in the organs of DBA mice.³

Halogenated bacteriochlorins have been characterized in detail by our group, including the development of synthetic methods for gram-scale batches, photophysical and photochemical characterization, toxicity, biodistribution, pharmacokinetics and PDT efficacy *in vitro* and *in vivo*.^{3-6,10} All these parameters, and very specially the preferential tumor accumulation, shows that halogenated bacteriochlorins are good candidates for contrast agents in photoacoustic tomography. In a first approach to PAT with these contrast agents, we showed that intravenous administration in mice enhanced the PA signal measured for the liver, with respect to a control experiment with mice without contrast.⁷ In this work we investigate the use of photoacoustics to follow the permeation of a halogenated bacteriochlorin through the skin after topical application.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Synthesis of bacteriochlorins

Halogenated bacteriochlorins were synthesized according to the method presented in Figure 1 and recently reported.^{5,6} Different amounts of a given bacteriochlorin in an appropriate gel were combined with known permeation enhancers (dimethyl sulfoxide, Azone, oleic acid) to obtain a range of formulations appropriate for topical applications. The formulations were placed in contact with the skin of minipigs for different time intervals (1 to 4 h) and cleaned before the evaluation of the permeation. The visible/near-infrared absorption of a typical halogenated tetraphenylbacteriochlorin is presented in Figure 2, together with the corresponding fluorescence spectrum. Absorption and fluorescence spectra were measured by standard techniques using Shimadzu UV-2100 and SPEX Fluoromax 3.22 spectrophotometers, respectively.

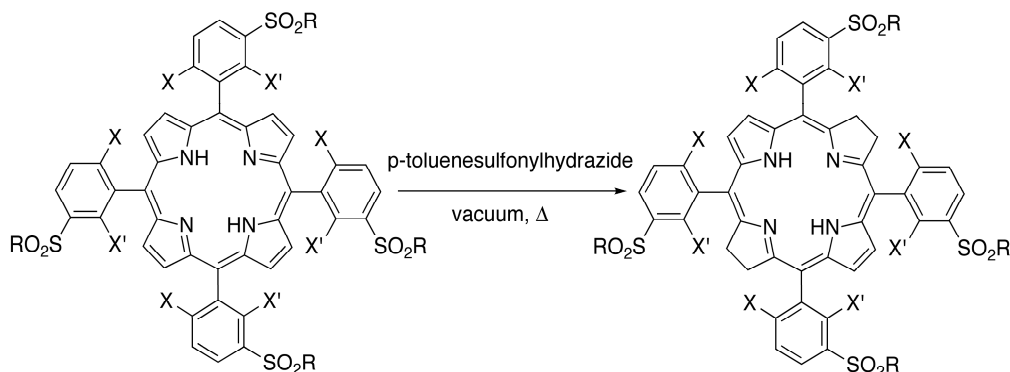


Figure 1. Solid-state synthesis of photostable halogenated bacteriochlorins from the precursors porphyrins, where X and X' are F or Cl atoms and R are OH or NH-alkyl groups.

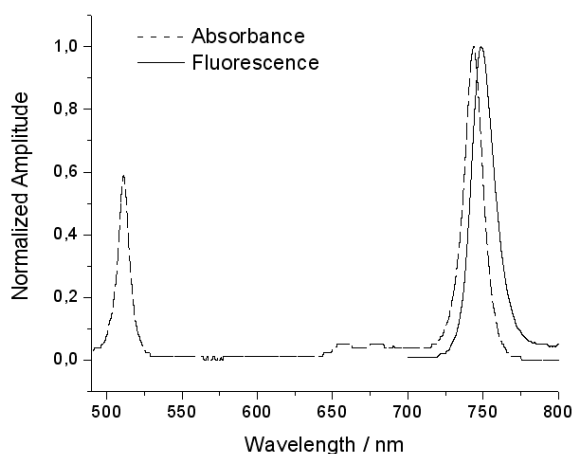


Figure 2. Absorption and fluorescence spectra of a halogenated tetraphenylbacteriochlorin in ethanol.

2.2 Photoacoustic Mapping

A very schematic view of the device employed to map PA signals generated in the skin is presented in Figure 3. The laser light is delivered to the skin through a right angle prism coupled to a fiber optic and the photoacoustic waves are detected in a backward mode. The excitation was made using an OPO pumped by a Nd:YAG laser from EKSPLA NL301 with pulse width of 6 ns at 355 nm. The OPO generates wavelength from 210 nm up to 2300 nm. The PA waves were detected with a 15 MHz Panametrics transducer (model A113S), acoustically coupled to the top of the prism, preamplified with a Panametrics ultrasonic amplifier (model 5676) and collected with an oscilloscope from Tektronix DPO 7254. Clearly, a significant fraction of the incident light is transmitted through the prisms and only $4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ are delivered to the skin. Working with such low laser fluences emphasizes the smallness of the intrinsic signal produced by the skin in the infrared. Critical to the improvement of the light reflection at the interface between the two prisms and sound transmission at that same interface, is the ability to separate the prisms by an optically-transparent thin material with a refractive index lower than the prisms but a similar acoustic impedance. To overcome this problem we used a thin acetate film (6 μm thickness) between the prisms. The PA signals were analyzed with homemade software to map the intensity as a function of the origin of the generated PA wave into the skin for each wavelength.

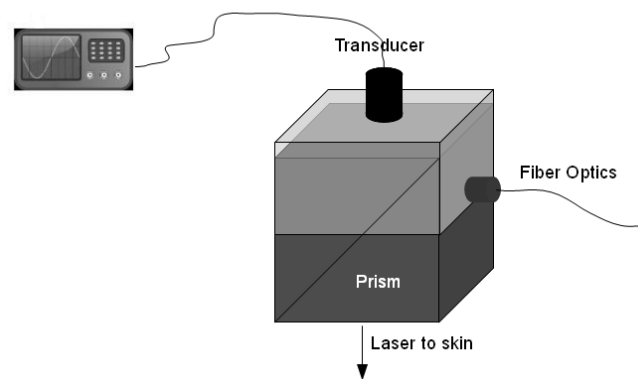


Figure 3: Homemade photoacoustic device used in the backward detection.

The device was used to map the intensity of the acoustic signals generated in the forearm of the experimentalists and using minipig skin samples. In the first case, we did not apply contrast agents and the PA signals are intrinsic to the skin. In the second case, we measured the intrinsic PA signals and, subsequently, the acoustic signals generated after the permeation of a halogenated bacteriochlorin. The delay of the PA signal due to the time required by the acoustic waves to travel from the skin surface to the transducer was measured intercalating a black polystyrene target between the prism and the skin. This delay was used as reference to assess the origin of the PA signals generated within the skin.

2.3 Time-resolved Photoacoustic Calorimetry

Time-resolved photoacoustic calorimetry (PAC) gives the relative energy deposited in a medium through nonradiative decays following the absorption of a photon by a molecule.¹¹ The energies fractions and lifetimes of a sample $E(t)$ can be obtained by the convolution of the instrumental response $T(t)$ with the kinetic equations $H(t)$ describing the electronic decay,¹²

$$E(t) = T(t) \otimes H(t) \quad (1)$$

Experimentally, the function $T(t)$ can be obtained using a molecule, called a photoacoustic reference, that releases nonradiatively (only heat deposition) all the radiative energy absorbed in a time faster than the transducer resolution.

The PA signal generated by a photoacoustic reference is the highest that can be generated in the absence of chemical reactions. The heat function $H(t)$ contains the energy fractions and the lifetime decay:

$$H(t) \rightarrow \sum \phi_n \exp(-t/\tau_n) \quad (2)$$

Using an appropriate photoacoustic reference to describe the instrument response and solving the convolution with sample signal, we can obtain the energy fraction deposited in the medium that contributes to the photoacoustic wave.¹² Hence, PAC measures the efficiency of a given contrast agent in converting the light absorbed into a photoacoustic signal. Ideally, this contrast agent should behave as a photoacoustic reference, with a decay shorter than the laser pulse and $\phi_i=1$.

Time-resolved PAC measurements were performed in a homemade apparatus following the front-face irradiation design described by Arnaut et al.⁹ More than 99% of the light impinging on the front-face dielectric mirror is reflected back into the solution, thus minimizing the background signal. The solutions were pumped through a 0.11 mm thick cell at a 1 ml/min flow with a SSI chromatography pump, and irradiated with a Nd:YAG laser from EKSPLA NL301 with pulse width of 6 ns at 355 nm. The PA waves were detected with a 2.25 MHz Panametrics transducer (model A106S) and pre-amplified with a Panametrics ultrasonic amplifier (model 5676) and collected with an oscilloscope from Tektronix DPO 7254. The photoacoustic characterization of the bacteriochlorin was made using 2-hydroxybenzophenone (HBP, Aldrich) as a photoacoustic reference. All the solutions were prepared in ethanol and the data were analyzed using a software developed by Schaberle et al.¹²

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Photoacoustic Mapping

The measurement *in vivo* was made in the forearm of the experimentalist, in the anatomical region near the hand. The measurements were conducted at several wavelengths and in the absence of exogenous contrast agents. The objective was to obtain a profile of the photoacoustic waves generated within the skin and to plot the dependence of PA wave on the wavelength. Figure 4 shows that strong PA signals are generated near the surface of the skin for short wavelengths, with most of the PA signal coming from the first 200 μm of the skin for wavelengths shorter than 530 nm. This is entirely consistent with the wavelength dependence of the absorption coefficient of human skin *in vitro*.⁹ At the onset of the phototherapeutic window, the highest intensity of the PA signal is displaced to 1 mm beneath the skin surface, presumably due to the presence of hemoglobin.

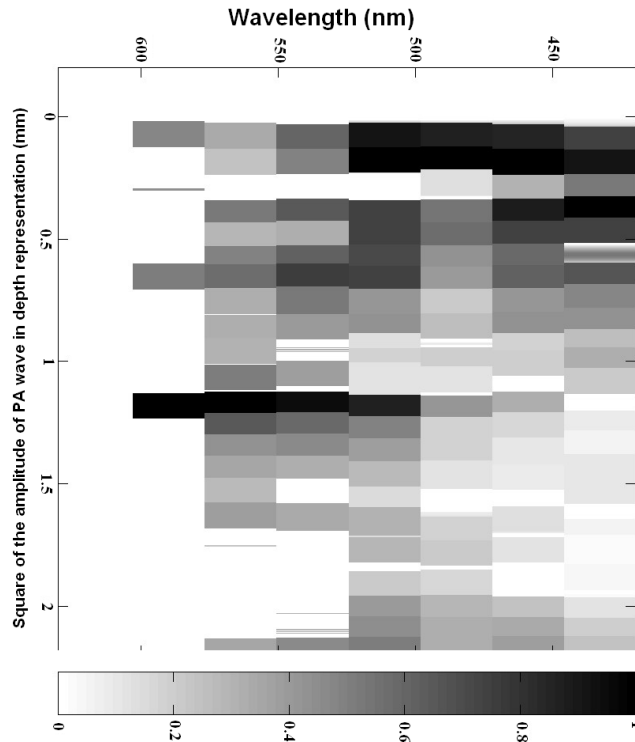


Figure 4: *In vivo* multi-spectral photoacoustic mapping of human skin. The square of the amplitude of PA wave is represented as a function of the arrival times converted into distance from the surface of the prism-skin interface. The skin photoacoustic signal (from white – no absorption – up to black – maximum absorption) decreases as the excitation wavelength approaches the phototherapeutic window.

The PA signals generated by halogenated bacteriochlorins in the skin were tested with minipig skin in view of the similarity between the skin of these animal-models and human skin. We applied to the skin sample a 1 mm thick layer of a formulation for topical use containing a halogenated bacteriochlorin and a permeation enhancer, and allowed for a contact time of 2 hours. The position of the skin surface was identified interposing in an experiment at 530 nm and another one at 743 nm, a black target between the prism and the skin surface. In Figure 5 we show the raw PA data collected with the black target at 743 nm, the skin without bacteriochlorin at 530 nm and 743 nm, and finally the skin with bacteriochlorin at 743 nm after a contact time of 2 h. The signal produced by the black target is similar to the signal produced by the skin when irradiated at 530 nm. This shows that nearly all the PA signal at this wavelength is generated very close to the skin surface. On the other hand, laser pulses at 743 nm in the absence of bacteriochlorin produce a small and uncharacteristic PA signal, but a substantial PA signal is obtained when the bacteriochlorin permeates through the skin. It should be emphasized that this signal was obtained with a laser fluence of only $4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$. This is 5000 less than the ANSI limit, which indicates how much the signal can still be increased. The skin was thoroughly cleaned with ethanol after the permeation time elapsed and before the PA signals were collected. This guarantees that the PA signal comes from within the skin.

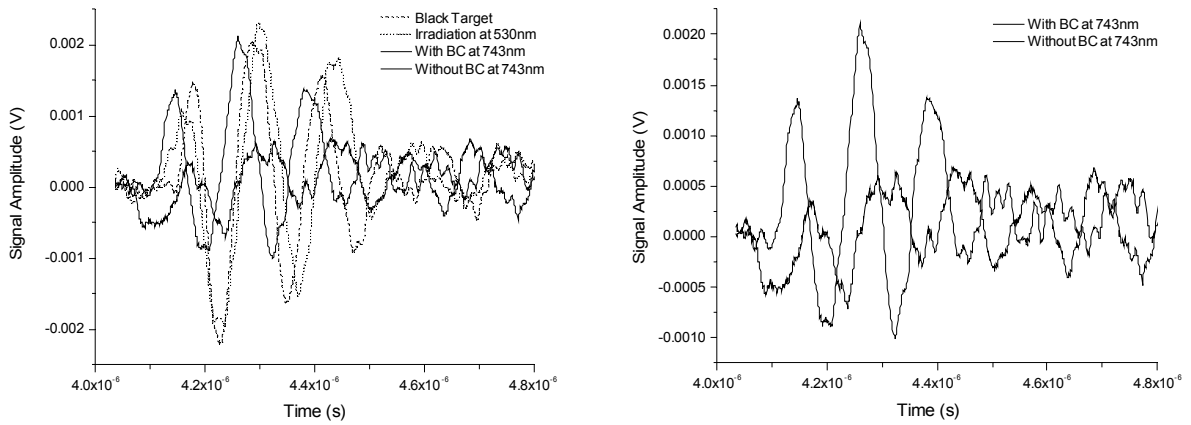


Figure 5: Raw PA signals obtained with a black target, irradiation of the skin at 530 nm or 743 nm without exogenous contrast agents, and with the bacteriochlorin after 2 h of contact with the skin (left). PA signal in the absence and presence of bacteriochlorin at 743 nm (right)

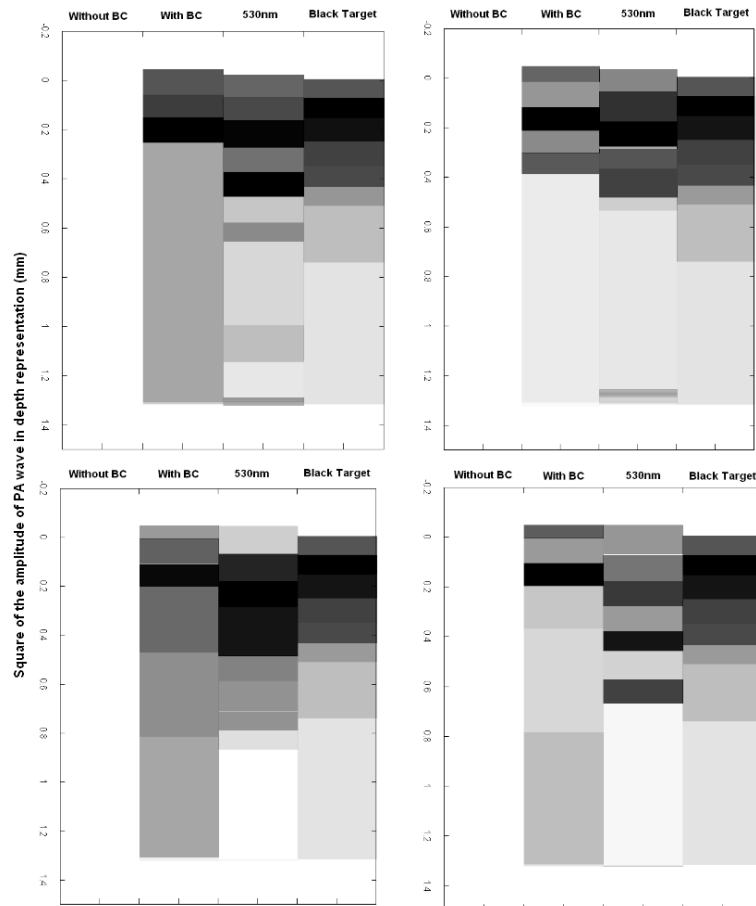


Figure 6: Square of the PA waves with the arrival times converted into distance from the surface of the prism-sample interface for a black target at the interface, for the irradiation of the skin at 530 nm or 743 nm without exogenous contrast agents, and for the skin after various times of contact with the bacteriochlorin. The topical formulation containing the bacteriochlorin was applied to the skin for 1 h (upper left), 2 h (upper right), 3 h (lower left) or 4 h (lower right) and then cleaned with ethanol before excitation with 743 nm laser pulses.

Contact times of 1h, 2h, 3h and 4h between the topical formulation containing the bacteriochlorin and the skin were also tested. Figure 6 shows the distribution of the square of the amplitude of PA signals at various layers beneath the skin surface, generated by laser pulses at 743 nm. The black target filters the light and the PA signals are originated just below the surface of the prism. The PA signals are negligible in the absence of bacteriochlorin for laser pulses of 743 nm, but a distribution of signals is observed in the presence of bacteriochlorin for the various contact times. At present it is not possible to provide a quantitative assessment of the diffusion of the bacteriochlorin through the skin, but it is clear that this non-invasive and simple device has the sensitivity to probe the presence of PAT contrast agents ca. 1 mm beneath the surface of the skin using a laser fluence of $4 \mu\text{J}/\text{cm}^2$.

3.2 Photoacoustic Characterization

PAC of contrast agents for PAT provides a simple and quantitative method to assess the efficiency of the conversion of the radiative energy absorbed by the dye into a photoacoustic wave. PAC analysis of bacteriochlorins using HBP as reference in ethanol showed that bacteriochlorins decay following two sequential exponentials, the first one with a lifetime shorter than 1 ns and releasing 69% of the energy absorbed, and the other one with a lifetime ca. 250 ns and releasing 5% of the energy. The lifetime of 250 ns was obtained by flash photolysis.⁴ The formation of long-lived species that do not decay in the timescale probed by the 2.25 MHz transducer employed in these experiments, accounts for the remaining of the energy. Table 1 presents the fractions of energy released and Figure 7 shows typical PA waves measured in a PAC experiment.

Table 1: Values of energy fractions (ϕ) obtained through time-resolved photoacoustic calorimetry.

	ϕ_1	ϕ_2	τ_1	τ_2
Bacteriochlorin	0.686 ± 0.033	0.048 ± 0.014	$\ll 1 \text{ ns}$	250 ns

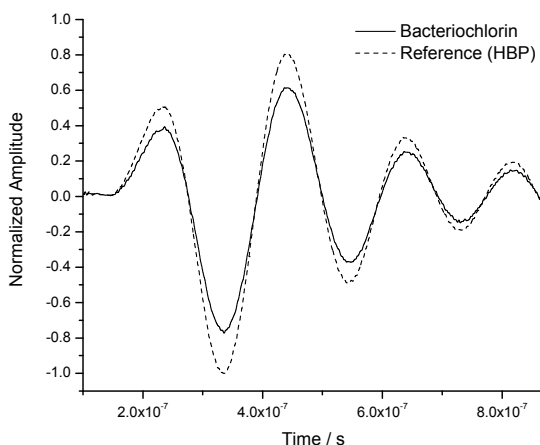


Figure 7: Photoacoustic waves of the bacteriochlorin and the photoacoustic reference (HBP) in ethanol.

Although the PA waves of the bacteriochlorin obtained in this experiment approach the intensity of those of HBP, we must realize that the laser excitation was performed at 355 nm. Excitation at 743 nm has less than half of the energy available but the long-lived species formed upon excitation of the bacteriochlorin have the same energy content and are formed with the same efficiency. Thus, the fraction energy released as heat by these bacteriochlorins upon excitation at 732 nm will be substantially reduced and their efficiency with respect to that of PAC reference will be lowered. Based on the energy of the triplet state of halogenated tetraphenylbacteriochlorons,⁴ we estimate that at 743 nm the fast heat decay will be reduced to 33% of the energy absorbed. Chemical modification of the molecular structures presented in Figure 1 will be required to improve this conversion efficiency.

4. CONCLUSIONS

Halogenated bacteriochlorins are good photosensitizers for PDT of cancer. This work explored their use as PAT contrast agents. It was shown that the photoacoustic signals generated by the skin at the wavelength of 743 nm, where the bacteriochlorins have a very intense absorption band, are very small. The permeation of bacteriochlorins through the skin leads to a substantial increase of the PA signal at this wavelength and provides a simple and non-invasive method to evaluate the presence of these dyes under the skin.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) and FEDER (project no. ERA-CHEM/0002/2008).

REFERENCES

- [1] Kim, C., Favazza, C. and Wang, L. V., "In vivo photoacoustic tomography of chemicals: High-resolution functional and molecular optical imaging at new depths," *Chem. Rev.*, **110** (5), 2756-2782 (2010).
- [2] Weissleder, R. and Pittet, M. J., "Imaging in the era of molecular oncology", *Nature*, **452**, 580-589 (2008).
- [3] Dabrowski, J. M., Urbanska, K., Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Abreu, A. R., Simões, S., Stochel, G. "Biodistribution and Photodynamic Efficacy of a Water-Soluble, Stable, Halogenated Bacteriochlorin against Melanoma", *ChemMedChem*, **6**, 465-475 (2011).
- [4] Silva, E. F. F., Serpa, C., Dabrowski, J. M., Monteiro, C. J. P., Formosinho, S. J., Stochel, G., Urbanska, K., Simoes, S., Pereira, M. M., Arnaut, L. G., "Mechanisms of singlet oxygen and superoxide ion generation by porphyrins and bacteriochlorins," *Chem. Eur. J.*, **16**, 9273-9286 (2010).
- [5] Pereira, M. M., Monteiro, C. J. P., Simões, A. V., Pinto, S. M. A., Abreu, A. R., Sa, G. F. F., Silva, E. F. F., Rocha, L. B., Dabrowski, J. M., Formosinho, S. J., Simoes, S., Arnaut, L. G., "Synthesis and photophysical characterization of a library of photostable halogenated bacteriochlorins: An access to near-infrared chemistry", *Tetrahedron*, **66**, 9545-9551 (2010).
- [6] Pereira, M. M., Monteiro, C. J. P., Simões, A. V. C., Pinto, S. M. A., Arnaut, L. G., Sá, G. F. F., Silva, E. F. F., Rocha, L. B., Simões, S., Formosinho, S. J., "Synthesis and photophysical properties of amphiphilic halogenated bacteriochlorins: new opportunities for photodynamic therapy of cancer", *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **13**, 567-573 (2009).
- [7] Schaberle, F. A., Arnaut, L. G., Serpa, C., Silva, E. F. F., Pereira, M. M., Abreu, A. R., Simões, S., "Infrared absorbing dyes tailored for detection and therapy of solid tumors", *Proc. SPIE* **7376**, (2010).
- [8] Weissleder, R., *Nature Biotech.*, "A clearer vision for in vivo imaging", **19**, 316-317 (2001).
- [9] Bashkatov, A. N., Genina, E. A., Kochubey, V. I., Tuchin, V. V., "Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38**, 2543-2555 (2005).
- [10] Pineiro, M., Gonsalves, A. M. d. A. R., Pereira, M. M., Formosinho, S. J., Arnaut, L. G., "New halogenated phenylbacteriochlorins and their efficiency in singlet-oxygen sensitization", *J. Phys. Chem. A*, **106**, 3787-3795 (2002).
- [11] Patel, C. K. N. and Tam, A. C. "Pulsed optoacoustic spectroscopy of condensed matter", *Rev. Mod. Phys.*, **53**, 517-550 (1981).
- [12] Schaberle, F. A., Nunes, R. M. D., Barroso, M., Serpa, C., Arnaut, L. G., "Analytical solution for time-resolved photoacoustic calorimetry data and applications to two typical photoreactions", *Photochem. Photobiol. Sci.*, **9**, 812-822 (2010).
- [13] Arnaut, L. G., Caldwell, R. A., Elbert, J. E., Melton, L. A. "Recent advances in photoacoustic calorimetry - theoretical basis and improvements in experimental design", *Rev. Sci. Instrum.*, **63**, 5381-5389 (1992).