

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Fábio Daniel Ramos Morgado

**INSTRUMENTAÇÃO DE ESPECTRÓMETRO
RAMAN SPEX 1403: REATIVAÇÃO E
ATUALIZAÇÃO**

**Dissertação no âmbito do Mestrado Integrado de Engenharia
Física, ramo de Instrumentação orientada pela Professora
Doutora Inês Pereira dos Santos e Professor Doutor João Manuel
Rendeiro Cardoso e apresentada ao Departamento de Física da
Faculdade de Ciências e Tecnologia.**

Setembro de 2021

Fábio Daniel Ramos Morgado

Instrumentação de Espectrómetro Raman SPEX 1403: Reativação e Atualização

*Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para
cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Engenharia Física.*

Orientadores:

Professora Doutora Inês Pereira dos Santos, Unidade I&D Química-Física Molecular,
Universidade de Coimbra

Professor Doutor João Manuel Rendeiro Cardoso, Laboratório de Instrumentação, Engenharia
Biomédica e Física da Radiação, Universidade de Coimbra

Consultor Científico:

Professor Doutor Daniel Martín Fernández, Unidade I&D Química-Física Molecular,
Universidade de Coimbra

Setembro de 2021

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos colaboradores da Unidade I&D Química-Física Molecular, UC, e do LIBPhys - Laboratório de Instrumentação, Engenharia Biomédica e Física da Radiação, UC, pelo acolhimento. Um agradecimento ao Doutor Daniel Martín Fernández, pela ajuda, sobretudo com os conhecimentos de Química, e pela opinião científica ao longo da dissertação. Também agradeço ao Professor Luís Carvalho pelos ensinamentos e esclarecimentos ao longo do projeto.

Agradeço, particularmente, aos meus orientadores, Professora Doutora Inês Santos e Professor Doutor João Cardoso, por toda a orientação, ajuda e paciência oferecida ao longo desta dissertação.

Resumo

A espectroscopia de Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional que permite obter informação relativamente aos modos vibracionais das moléculas. Cada molécula apresenta um espectro de Raman característico. Numa amostra, de acordo com o método de aquisição de sinal Raman, é possível obter informação das camadas superficiais mas também das camadas mais internas da amostra. Neste projeto pretende-se adicionar a geometria de transmissão ao SPEX 1403, existente na unidade Química-Física Molecular, obtendo-se informação, em profundidade, da amostra. Também se tem como objetivo melhorar as plataformas de controlo e aquisição com detetor multicanal.

A geometria de transmissão foi obtida utilizando lentes plano-convexas e uma fibra ótica, de modo a se conseguir incidir um feixe laser focado na amostra. O sistema produzido foi testado fazendo um estudo de quantificação em que se prepararam cinco soluções, de diferente concentração, de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano. Para cada solução determinou-se a área das bandas a $1154 \Delta cm^{-1}$ e a $1519 \Delta cm^{-1}$, do espectro de Raman obtido em condições de ressonância, obtendo-se retas de calibração, de área em função de concentração. A calibração permitiu determinar a concentração de duas soluções problema com um erro percentual de 1,8% e 3,1%.

O controlo do SPEX foi melhorado desenvolvendo uma interface de utilizador, em MATLAB[®], mais recente. Simultaneamente, adicionou-se aquisição multicanal utilizando uma câmara CMOS, *Guppy F-036B*. A interface desenvolvida permite controlar as redes de difração e adquirir sinal com a câmara, utilizando o método de empilhamento de imagens para melhorar a sensibilidade da câmara.

Neste projeto, conseguiu-se adicionar a geometria de transmissão e iniciar a atualização dos métodos de controlo e aquisição, desenvolvendo uma interface de utilizador, mas não foi possível adicionar a aquisição multicanal.

Palavras-Chave: Espectroscopia de Raman, TRS, Espectroscopia de Raman de Ressonância de Transmissão, Duplo Monocromador, Deteção Monocanal, Deteção Multicanal

Abstract

Raman spectroscopy is a vibrational spectroscopy technique that allows information to be obtained regarding the vibrational modes of molecules. Each molecule has a characteristic Raman spectrum. In a sample, according to the Raman signal acquisition method, it is possible to obtain information from the surface layers but also from the innermost layers of the sample. In this project, it is intended to add the transmission geometry to spex 1403, existing in the Molecular Chemistry-Physics unit, obtaining information, in depth, of the sample. It is also aimed at improving control and acquisition platforms with multichannel detector.

The transmission geometry was obtained using plane-convex lenses and an optical fiber, in order to be able to focus a laser beam focused on the sample. The system produced was tested by doing a quantification study in which five solutions were prepared, of different concentration, of β -carotene dissolved in cyclohexane. For each solution, the area of the bands was determined at $1154 \Delta cm^{-1}$ and $1519 \Delta cm^{-1}$, of the Raman spectrum obtained under resonance conditions, obtaining calibration straights, of area as a function of concentration. The calibration allowed to determine the concentration of two problem solutions with a percentage error of 1.8% and 3.1%.

Spex control has been improved by developing a newer user interface in MATLAB[®]. At the same time, multichannel acquisition was added using a CMOS camera, *Guppy F-036B*. The developed interface allows you to control diffraction gratings and acquire signal with the camera, using the image stacking method to improve camera sensitivity.

In this project, it was possible to add the transmission geometry and start updating the control and acquisition methods, developing a user interface, but it was not possible to add the multichannel acquisition.

Keywords: Raman Spectroscopy, TRS, Transmission Resonance Raman Spectroscopy, Double Monochromator, Single-channel Acquisition, Multichannel Acquisition

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Acrónimos	xix
1 Introdução	1
1.1 Motivação	1
1.2 Objetivos	1
1.3 Análise de Requisitos	2
1.4 Estrutura da Dissertação	2
2 Estado da Arte	3
2.1 Espectroscopia de Raman	3
2.2 Geometrias de Aquisição em Espectroscopia de Raman	5
2.3 Radiação de Excitação em Espectroscopia de Raman	9
2.4 Espectrómetro Dispersivo	10
2.4.1 Tipos de Sistemas Dispersivos	12
2.4.1.1 Duplo Monocromador	12
2.4.1.2 Triplo Monocromador	14
2.4.1.3 Espectrógrafo / Monocromador com Filtro de Rejeição de Luz Parasita	14
2.5 Detetores para Espectroscopia de Raman	15
2.5.1 Detetores Monocanal	15
2.5.1.1 Fotomultiplicador	15

2.5.1.2	Fotodíodo	16
2.5.2	Detetores Multicanal	17
2.5.2.1	Charged Coupled Device	17
2.5.3	Comparação dos Detetores	18
2.6	Métodos de Aquisição para Espectrómetros	
	Dispersivos	19
2.6.1	Espectrómetros com Detecção Monocanal	19
2.6.2	Espectrómetros com Detecção Multicanal	19
2.6.2.1	Aquisição Estática	20
2.6.2.2	Aquisição Segmentada	21
2.6.2.3	Técnica de Varrimento Multicanal (SMT)	22
2.6.2.4	Técnica de Varrimento Contínua Prolongada (CEST)	23
3	Materiais e Métodos	25
3.1	Interface com o SPEX 1403	25
3.1.1	Teste ao Funcionamento do 'Man in The Middle'	28
3.2	Geometria de Transmissão	28
3.2.1	Material para Espectroscopia Raman de Transmissão	28
3.2.2	Montagem Experimental	31
3.2.2.1	Acoplamento Utilizando Postes	33
3.2.2.2	Acoplamento Utilizando uma Gaiola	33
3.2.2.3	Incidência na Amostra	35
3.3	Detecção do Sinal Raman	38
3.3.1	Pré-Processamento de Sinal	38
3.3.1.1	Subtração do Sinal de Fundo	38
3.3.1.2	Filtro de Suavização do Sinal Raman	39
3.3.2	Caracterização da Resolução com Fotomultiplicador	39
3.3.2.1	Determinação da Resolução do Espectrómetro	39
3.3.2.2	Otimização da Resolução Espectral de Aquisição	40
3.3.3	Aquisição de Sinal com Detetor Multicanal	42
3.4	Espectroscopia de Raman de Ressonância de	
	Transmissão	43
3.4.1	Preparação de Soluções de Diferentes Concentrações de β -Caroteno	43
3.4.2	Obtenção da Curva de Calibração e Quantificação de Concentração de Amostras Problema	45
3.5	Nova Interface do Utilizador	45
3.5.1	Descrição das Características da Interface Desenvolvida	45
3.5.2	Calibração da Representação Gráfica de Espectros	47

4	Resultados e Discussão	48
4.1	Caracterização da Resolução Espectral	48
4.1.1	Resolução Espectral do SPEX 1403	48
4.1.2	Resolução Otimizada do SPEX 1403	50
4.2	Soluções de β -caroteno em Ciclo-hexano de Diferentes Concentrações	54
4.2.1	Determinação da Curva de Calibração para Quantificação por Raman de Ressonância	55
4.2.2	Validação da Curva de Calibração	60
4.3	Validação do Funcionamento da Interface Desenvolvida	63
5	Conclusão	65
5.1	Trabalho Futuro	67
	Referências	68
	Apêndice A Man In The Middle	72
	Apêndice B Controlos Adquiridos	76
B.1	Descrição do Processo do <i>Handshake</i> Inicial	76
B.2	Descrição do Processo de Varrimento	78
	Apêndice C Desenhos dos Raios Geométricos	80
	Apêndice D Otimização da Resolução Espectral a Partir do Espectro de Raman de Ciclo-hexano	82
D.1	Otimização pela Banda a $801,3 \Delta cm^{-1}$ do Ciclo-hexano	82
D.2	Otimização pela Banda a $2852,9 \Delta cm^{-1}$ do Ciclo-hexano	84
	Apêndice E Alinhamento do Laser	86
E.1	Alinhamento da Direção do Feixe	86
E.2	Alinhamento dos Espelhos	88
	Apêndice F Descrição da Interface do Utilizador	91
F.1	Interface de Utilizador	91
F.1.1	Descrição do Início da Janela da Interface	91
F.1.2	Menus	92
F.1.2.1	Menu Ficheiro	92
F.1.2.2	Menu Aquisição	93

F.1.2.3 Espectro	95
Apêndice G Curvas de Transmissão dos Filtros	96
Apêndice H Desenhos das Peças CAD	97

Lista de Figuras

2.1	Diagrama da dispersão de Rayleigh e de Raman.	4
2.2	Ilustração das geometrias referentes a Transmissão de Raman, Retrodispersão e SORS.	6
2.3	Resultados da obtenção do espectro de Raman utilizando as geometrias de transmissão e de retrodispersão.	7
2.4	Espectro da secção verde da cápsula de Sudafed Dual Relief, com espessura de 150 μm , utilizando as geometrias de SORS, TRS e Retrodispersão. . .	8
2.5	Ilustração de um monocromador e de um espectrógrafo com configuração de Czerny-Turner.	11
2.6	Ilustração da geometria aditiva e subtrativa do monocromador.	13
2.7	Espectro de Raman de baixa frequência do 1,2-bis(fenilfosfino)etileno dissolvido em CH_2Cl_2	13
2.8	Esquema de um espectrómetro triplo com configuração aditiva e subtrativa.	14
2.9	Ilustração de um fotomultiplicador.	16
2.10	Ilustração de um fotodíodo.	16
2.11	Ilustração de um fotodíodo de avalanche.	17
2.12	Representação da formação dos poços de potencial com a aplicação de tensão dos elétrodos.	17
2.13	Representação do processo de transformação do sinal luminoso em sinal elétrico num CCD.	18
2.14	Espectro de Raman de dextrose sólida.	20
2.15	Espectro de Raman de acetaminofenol.	21
2.16	Espectro de explicação da técnica SMT.	22
2.17	Representação do espectro da rotação pura do $^{35}\text{Cl}_2$	23
2.18	Comparação da técnica de aquisição segmentada com a técnica CEST. . .	24
3.1	Representação da ligação entre os dispositivos de modo a executar a interferência 'Man in The Middle'.	26
3.2	Fluxograma do 'Man in the Middle'.	27
3.3	Esquema da montagem experimental do instrumento.	32

3.4	Montagem do acoplamento do feixe laser na fibra ótica, com utilização de postes.	34
3.5	Montagem do acoplamento do feixe laser na fibra ótica, utilizando uma gaiola.	34
3.6	Sistema, em plástico, que permite a incidência do feixe laser na amostra.	36
3.7	Sistema final que permite a incidência do feixe laser na amostra.	37
3.8	Sistema que permite a incidência do feixe, após a amostra, na entrada do duplo monocromador.	37
3.9	Espectro de Raman do ciclo-hexano, obtido em configuração de transmissão.	41
4.1	Variação da largura a meia altura com a largura das fendas de entrada e saída para a linha espectral a 579,1 nm da lâmpada de mercúrio.	49
4.2	Banda a 801,3 Δcm^{-1} do espectro de Raman do ciclo-hexano obtido com as fendas de entrada e de saída com uma largura de 400 μm	51
4.3	Banda a 2852,9 Δcm^{-1} do espectro de Raman do ciclo-hexano obtido com as fendas de entrada e de saída com uma largura de 400 μm	51
4.4	Curva da variação da FWHM com a abertura da fenda para a banda de 801,3 Δcm^{-1} do ciclo-hexano.	52
4.5	Curva da variação da FWHM com a abertura da fenda para a banda a 2852,9 Δcm^{-1} do ciclo-hexano.	53
4.6	Soluções de β -caroteno dissolvidas em ciclo-hexano.	54
4.7	Soluções de β -caroteno dissolvidas em ciclo-hexano em frascos para medição.	54
4.8	Espectros médios de Raman (5 aquisições) de, ciclo-hexano puro (a) e de soluções de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano (b-f) de concentrações 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08 mg mL^{-1} respectivamente.	56
4.9	Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de 1154 Δcm^{-1} , utilizando a integração da área da banda.	58
4.10	Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de 1519 Δcm^{-1} , utilizando a integração da área da banda.	59
4.11	Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de 1154 Δcm^{-1} , utilizando o máximo de intensidade da banda.	59
4.12	Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de 1519 Δcm^{-1} , utilizando o máximo de intensidade da banda.	60

4.13	Espectros de Raman de ressonância de transmissão da solução de concentração de $0,070 \pm 0,002 \text{ mg mL}^{-1}$, deslocado verticalmente de 2 unidades normalizadas relativamente ao espectro de Raman do ciclo-hexano.	62
4.14	Espectros de Raman de ressonância de transmissão da solução de concentração de $0,050 \pm 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$, deslocado verticalmente de 2 unidades normalizadas relativamente ao espectro de Raman do ciclo-hexano.	62
4.15	Espectro da lâmpada de mercúrio obtido no SPEX 1403.	63
4.16	Apresentação da linha espectral a $1122,5 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$, da lâmpada de mercúrio, na interface desenvolvida.	64
4.17	Apresentação das linhas espectrais a $2101 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ e a $2164 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$, da lâmpada de mercúrio, na interface desenvolvida, utilizando a aquisição segmentada.	64
C.1	Diagrama dos raios óticos no acoplamento do feixe laser à fibra ótica. . .	80
C.2	Diagrama dos raios óticos na incidência do feixe laser da fibra ótica na amostra.	80
C.3	Diagrama dos raios óticos no interior do duplo monocromador, com deteção monocanal.	81
C.4	Diagrama dos raios óticos no interior do duplo monocromador, com adição de deteção multicanal.	81
D.1	Curva da variação da FWHM, em nm, com a abertura da fenda de entrada e da fenda de saída, para a banda de $801,3 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ do ciclo-hexano. . . .	82
D.2	Curva da variação da FWHM, em nm, com a abertura da fenda de entrada e da fenda de saída, para a banda de $2852,9 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ do ciclo-hexano. . . .	84
E.1	Guias de alinhamento do feixe laser.	87
E.2	Visualização da mancha vista no alinhamento do espelho frontal.	89
E.3	Laser Innova Coherent 90 com a cobertura retirada para alinhamento. . .	89
E.4	Visualização dos painéis dos manípulos de controlo da posição dos espelhos. .	90
F.1	Janela com pedido de introdução da posição, em número de onda, do monocromador indicada no SPEX.	92
F.2	Janela de confirmação de encerramento da aplicação.	93
F.3	Janela que permite a escolha dos parâmetros de aquisição, em unidades de <i>Desvio de Raman</i> (esquerda) e em unidades de <i>Número de Onda</i> (direita).	93
F.4	Janela que permite a escolha dos parâmetros de aquisição, da deteção multicanal, em unidades de <i>Desvio de Raman</i> (esquerda) e em unidades de <i>Número de Onda</i> (direita).	95
G.1	Gráfico da curva de transmissão do filtro passa-banda.	96

G.2	Gráfico da curva de transmissão do filtro passa-alto.	96
H.1	Desenho em CAD da peça da estrutura inicial utilizada para realizar a geometria de transmissão.	97
H.2	Desenho em CAD da peça da estrutura inicial utilizada para realizar a geometria de transmissão.	98
H.3	Desenho em CAD da peça utilizada para colocar cuvettes com a amostra a analisar.	98
H.4	Desenho em CAD da peça onde é colocado o filtro passa-alto, após a amostra.	99

Lista de Tabelas

2.1	Tabela com valores normais de comprimento de onda dos lasers utilizados em espectroscopia de Raman.	9
4.1	Tabela com os valores, médios, da largura a meia altura da linha espectral a 579,1 nm, da lâmpada de mercúrio.	50
4.2	Valores médios para a área integrada (em unidades arbitrárias) e máximo de intensidade das bandas de 1154 Δcm^{-1} e 1519 Δcm^{-1} , respectivamente.	56
4.3	Reta de calibração, R^2 , LOD e LOQ para cada ajuste executado.	57
4.4	Concentração, média, das soluções de validação da curva de calibração.	61
B.1	Sequência de comandos, e respectivas respostas, trocados durante o handshake inicial.	77
B.2	Sequência de passos executados durante a realização de um varrimento.	79
D.1	Valores da FWHM da Banda de 801,3 Δcm^{-1} do ciclo-hexano, antes e após a filtragem do sinal.	83
D.2	Valores da FWHM da Banda de 2852,9 Δcm^{-1} do ciclo-hexano, antes e após a filtragem do sinal.	85

Lista de Acrónimos

- TRS** Transmission Raman Spectroscopy (Espectroscopia Raman de Transmissão)
- SORS** Spatially Offset Raman Spectroscopy (Espectroscopia Raman de Deslocamento Espacial)
- UV** Ultravioleta
- CCD** Charged Coupled Device
- PMT** Photomultiplier (Fotomultiplicador)
- SNR** Signal Noise Ratio (Rácio Sinal Ruído)
- RMS** Root Mean Square
- SMT** Scanning Multichannel Technique (Técnica de Varrimento Multicanal)
- CEST** Continuous Extended Scanning Technique (Técnica de Varrimento Contínua Prolongada)
- AN** Abertura Numérica
- FWHM** Full Width at Half Maximum (Largura a Meia-Altura)
- U.A.** Unidades Arbitrárias
- LOD** Limit of Detection (Limite de Detecção)
- LOQ** Limit of Quantification (Limite de Quantificação)

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

A composição molecular de sólidos, líquidos e gases pode ser estudada por recurso a diversas técnicas de espectroscopia vibracional, nomeadamente a espectroscopia de Raman, que permite a obtenção de informação relativa aos modos vibracionais das moléculas. A espectroscopia de Raman, sendo não destrutiva e não invasiva, tem aplicação em variadas áreas, como por exemplo na área farmacêutica, no estudo de cápsulas de fármacos, e na área médica no estudo de tecidos biológicos.

A unidade *I&D* Química-Física Molecular-UC possui um espectrómetro de Raman, o SPEX Ramalog 1403, que se encontra desativado há vários anos porque necessita de uma atualização no software de controlo e no hardware de aquisição e deteção do sinal. O facto deste espectrómetro ter um bom desempenho ótico, de elevada rejeição de luz parasita (stray light) e de elevada resolução espectral justifica a sua reativação.

1.2 Objetivos

O projeto tem como objetivo principal a reativação do funcionamento do espectrómetro SPEX Ramalog 1403, realizando uma atualização dos métodos de controlo e software.

Pretende-se também adicionar deteção multicanal (CCD), proporcionando ao SPEX 1403 aquisição de sinal com detetor monocanal (fotomultiplicador), já existente, e com um detetor multicanal.

Também se pretende alterar a configuração de amostragem para realizar espectroscopia Raman de transmissão.

1.3 Análise de Requisitos

O desenvolvimento do projeto, de modo a permitir cumprir os objetivos estabelecidos, apresenta requisitos a cumprir.

A nível de desenvolvimento de software, pretende-se que a plataforma de controlo e de aquisição funcionem com software atualizado, ao invés do software original, de modo a se obter uma interface mais recente e prática para o utilizador. O software a desenvolver tem que permitir replicar a funcionalidade, parcial ou integralmente, obtida com o software original.

Relativamente ao hardware, a configuração de amostragem deve ser alterada para Raman de transmissão. O percurso de excitação (laser) deverá ser redirecionado de forma a obter uma geometria de excitação da amostra a 0° , relativamente à recolha do sinal. No hardware de aquisição de sinal, o detetor multicanal a adicionar deve ser arrefecido termoelectricamente.

1.4 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos: *Introdução*, *Estado da Arte*, *Materiais e Métodos*, *Resultados Obtidos e Discussão*, *Conclusão*.

No capítulo 2, *Estado da Arte*, é descrito o que é a espectroscopia de efeito Raman e espectroscopia de Raman de ressonância. São apresentadas as geometrias de aquisição do sinal de Raman utilizadas na espectroscopia de Raman. É realizada uma descrição da instrumentação necessária para isolar o sinal de Raman. Termina-se o capítulo com a apresentação de metodologias de aquisição de sinal Raman com detetores monocanal e multicanal.

O capítulo 3, *Materiais e Métodos*, apresenta o material escolhido e os diferentes procedimentos executados. É descrita a aquisição dos comandos que permitem controlar o espectrómetro. De seguida são especificados os materiais necessários para efetuar o projeto prosseguindo-se com a explicação da montagem experimental e procedimentos de validação. Ainda se expõe o funcionamento da interface do utilizador, terminando o capítulo com a abordagem de aquisição do sinal de Raman e a sua aplicação na interface do utilizador.

No capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos de acordo com os procedimentos apresentados no capítulo imediatamente anterior. A apresentação dos resultados é acompanhada da respetiva discussão crítica e objetiva destes.

Para finalizar, no capítulo 5 sumariza-se as conclusões obtidas da realização do projeto e faz-se propostas de trabalho a realizar futuramente.

Capítulo 2

Estado da Arte

2.1 Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional que permite estudar os modos vibracionais de uma molécula, obtendo-se o espectro de Raman de cada molécula que, sendo característico de cada molécula, serve como uma impressão digital destas. Esta é baseada no efeito de Raman descoberto por Sir Chandrasekhra Venkata Raman, em 1928 [1].

Quando a radiação interage com moléculas, os seus estados vibracionais podem ser alterados por troca de energia entre a radiação e a molécula, no processo designado de dispersão. O fenómeno de dispersão pode ser dividido em dois: um em que há conservação de energia, que se designa por dispersão de Rayleigh, e um segundo, que se designa de dispersão de Raman, em que há uma dispersão inelástica dos fotões [2–4].

O fotão que incide na molécula tem uma energia superior à energia de vibração da molécula, trocando energia, recebendo ou transferindo, com a molécula que transita para um estado virtual de vibração de maior energia. Este estado virtual, e conseqüentemente o fotão disperso, tem uma energia que depende da frequência da radiação emitida pela fonte de excitação. Posteriormente ocorre a dispersão de um fotão, por parte da molécula, proveniente deste estado virtual. O estado final de vibração da molécula depende do tipo de dispersão existente, bem como do estado de vibração inicial da molécula. Como se pode observar na Figura 2.1, os fotões que sofrem dispersão de Rayleigh têm a mesma energia dos fotões da radiação incidente, uma vez que a molécula, após a dispersão, retorna ao estado vibracional inicial [2–4].

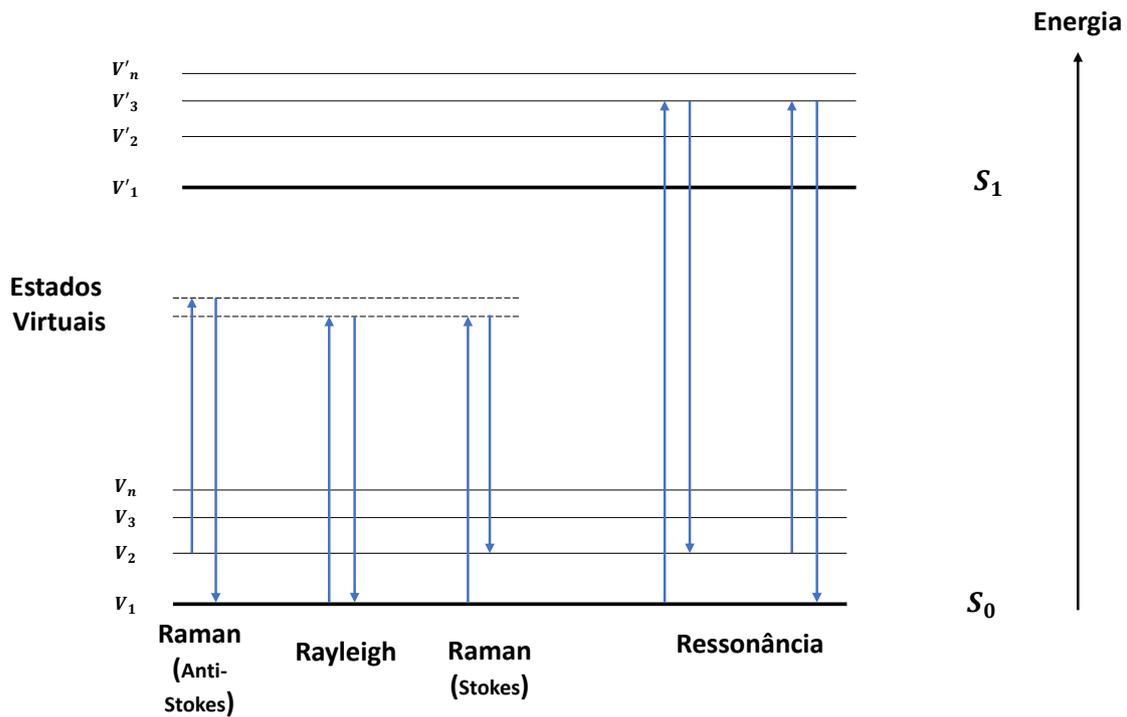


Figura 2.1: Diagrama da dispersão de Rayleigh e de Raman. Na dispersão de Raman, a frequência do fóton incidente é alterada após troca de energia com a molécula. A molécula, após a incidência do fóton, transita para um estado vibracional, virtual ou, no caso de ressonância, estados vibracionais (V'_n) do estado eletrônico excitado (S_1), emitindo um fóton quando transita, novamente, para o estado vibracional (V_n) do estado eletrônico fundamental (S_0). Adaptado de [5].

O mesmo já não acontece quando a dispersão dos fótons ocorre devido ao efeito de Raman. Estando as moléculas à temperatura ambiente, o estado vibracional predominante será o estado fundamental, no entanto uma pequena quantidade das moléculas pode estar num estado de energia vibracional excitado. A Figura 2.1 apresenta os dois tipos de dispersão de Raman: a dispersão de Stokes ocorre quando a molécula inicialmente se encontra no estado vibracional V_1 , que é o estado fundamental de energia, e a dispersão de anti-Stokes acontece se o estado inicial da molécula é um estado excitado, V_n , sendo esta dispersão menos intensa. De acordo com estes tipos de dispersão de Raman o fóton disperso tem uma frequência menor, no caso de Stokes, ou maior, no caso de anti-Stokes. A quantidade de fótons dispersos por efeito de Raman é muito inferior à quantidade de fótons que sofrem dispersão de Rayleigh, numa proporção de um fóton de Raman para 10^6 a 10^8 fótons de Rayleigh, pelo que o sinal de Raman é muito menos intenso [2–4].

Uma variante de espectroscopia de Raman utiliza o efeito de ressonância, observado pela primeira vez por Harrand *et al*, 1946 [6]. Neste tipo de espectroscopia de Raman o comprimento de onda de excitação é cuidadosamente escolhido, pois a frequência de

excitação deve ser tal que coincida, ou seja próxima, com a frequência da transição eletrônica de absorção da amostra [5].

A Espectroscopia de Raman de Ressonância pode aumentar a intensidade do sinal de um fator de 10^2 a 10^6 . A intensidade do sinal de Raman, I_{Raman} , varia de acordo com a Equação, adaptada de [5], (2.1) :

$$I_{Raman} \propto I_0 \times (w_0 - w_{0,q})^4 \times |\alpha|^2 \quad (2.1)$$

onde I_0 é a intensidade da radiação de excitação, w_0 é a frequência da radiação de excitação, $w_{0,q}$ é a frequência vibracional do modo normal e α a polarizabilidade. Neste caso, estando envolvida a transição eletrônica de absorção, são utilizados os estados vibracionais da molécula, e não estados virtuais, como se representa na Figura 2.1, o que aumenta a polarizabilidade, com conseqüente aumento da intensidade do sinal [5].

2.2 Geometrias de Aquisição em Espectroscopia de Raman

A radiação dispersa pela amostra, de modo a se obter o espectro de Raman, tem que ser adquirida. A aquisição desta radiação dispersa é executada utilizando diferentes geometrias de aquisição, sendo as mais usuais a aquisição perpendicular, a 90° , e a aquisição de retrodispersão (convencional), a 180° . A aquisição perpendicular implica que, após a excitação da amostra pelo feixe laser, a radiação que sofre dispersão seja recolhida por componentes óticos num ângulo de 90° relativamente ao feixe laser. A aquisição da radiação dispersa pode ocorrer na mesma direção, mas em sentido oposto, da utilizada para excitar a amostra a analisar, realizando um ângulo de 180° com a radiação incidente, que caracteriza a aquisição de retrodispersão. Apesar de amplamente utilizadas, ambas as geometrias só permitem adquirir informação sobre as camadas superficiais da amostra, algumas dezenas a poucas centenas de micrómetros, dependendo do comprimento de onda de excitação [7, 8].

Uma técnica recente designada de Spatially Offset Raman Spectroscopy (SORS), permite obter informação de camadas mais profundas da amostra. O método de aquisição consiste em iluminar um determinado ponto da amostra e adquirir o sinal, referente à dispersão da radiação, a diferentes distâncias desse ponto. A aquisição a diferentes profundidades vai permitir obter informação do volume total da amostra [8].

A necessidade de obter informação de todo o volume da amostra não é nova, sendo que uma das primeiras técnicas utilizadas para tal efeito é conhecida por Espectroscopia Raman de Transmissão, na sua sigla inglesa (TRS-Transmission Raman Spectroscopy).

Neste método tem-se uma aquisição a 0° , em que a amostra é iluminada num lado e o sinal é adquirido no lado oposto, pelo que toda a amostra é atravessada pelo feixe incidente. A Figura 2.2 apresenta as geometrias enunciadas.

A Espectroscopia Raman de Transmissão permite investigar amostras que absorvem muito pouca, ou nenhuma, luz mas que a difundem no seu interior em todas as direções, bem como amostras de materiais turvos. Utilizando a TRS é possível, relativamente às duas primeiras aquisições apresentadas, eliminar a existência de fluorescência e do sinal de Raman, que tenham origem nas camadas mais superficiais da amostra e que sejam indesejados, bem como adquirir informação para lá das camadas superficiais da amostra [8–10].

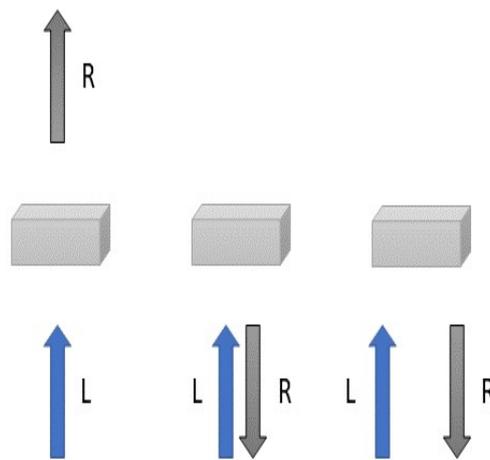


Figura 2.2: Ilustração das geometrias referentes a transmissão de Raman (0°), Retrodispersão (180°) e SORS (da esquerda para a direita). Legenda: R- Sinal Raman, L- Feixe Laser

O facto de a TRS não necessitar que haja preparação prévia da amostra, não ser um processo invasivo nem destrutivo, associado à possibilidade de aquisição de informação em profundidade, da amostra, torna-a atrativa para estudos e investigações na área médica e farmacêutica, como foi comprovado por Matousek et al, 2006 [9] e Ghita et al, 2018 [11].

Em 2007 Matousek *et al*, [10] provaram que a geometria de transmissão permite obter informação bastante detalhada da composição existente no interior de cápsulas farmacêuticas de forma rápida e direta sem apresentar informação sobreposta sobre o material da cápsula, em comparação com a geometria de retrodispersão convencional, como apresentado na Figura 2.3. Também demonstram que o sinal de Raman tem melhor qualidade quando comparado com a técnica de retrodispersão e com a SORS, comparação verificada na Figura 2.4.

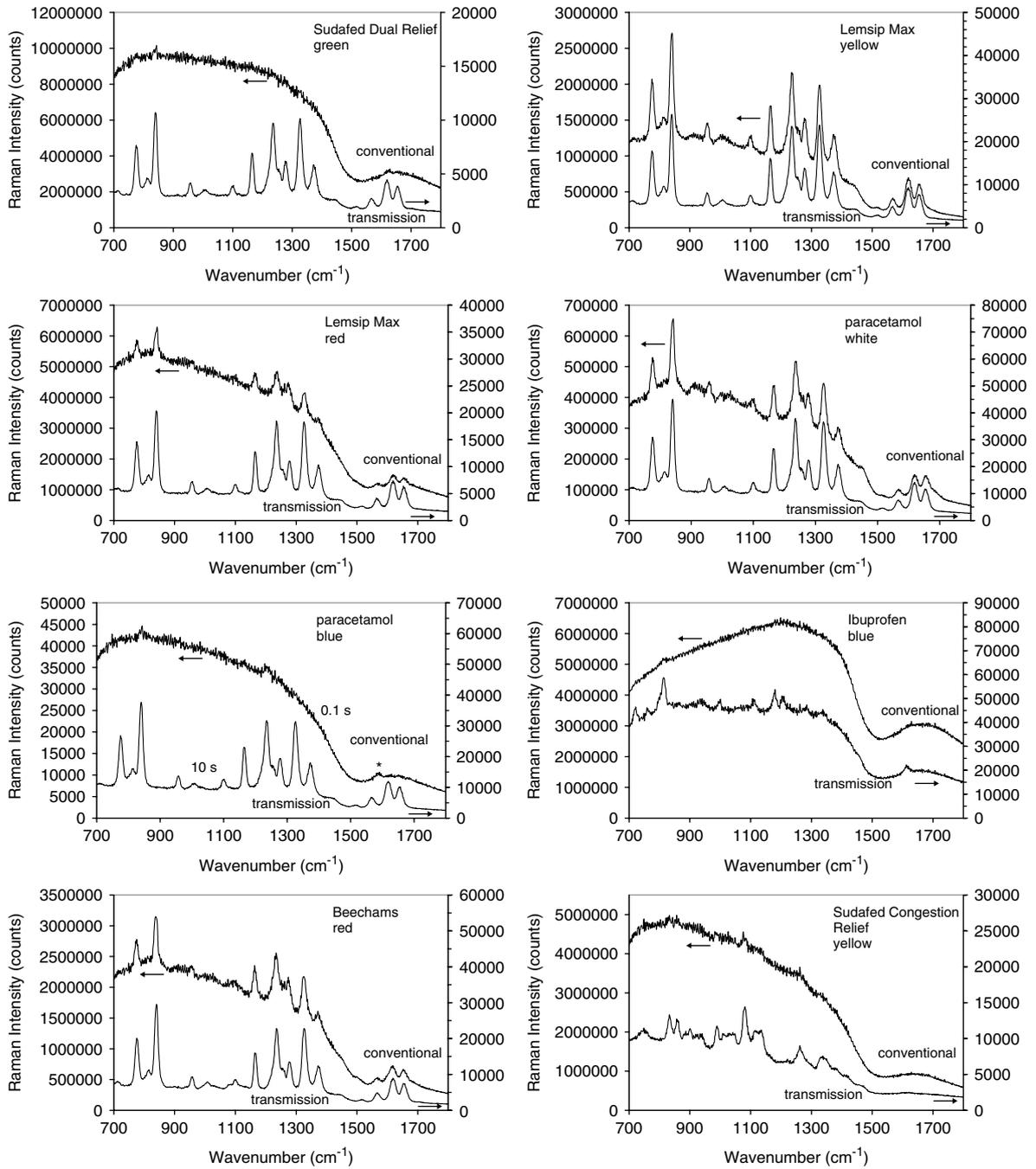


Figura 2.3: Resultados da obtenção do espectro de Raman de conteúdo de diferentes cápsulas farmacêuticas utilizando as geometrias de transmissão e de retrodispersão. Tempo de aquisição de 10s [10].

Apesar do sinal de Raman obtido pela geometria de transmissão ter uma intensidade inferior, verifica-se que os espectros adquiridos apresentam menor interferência do conteúdo superficial da cápsula e as bandas espectrais melhor definidas, bem como uma diminuição significativa da fluorescência [10].

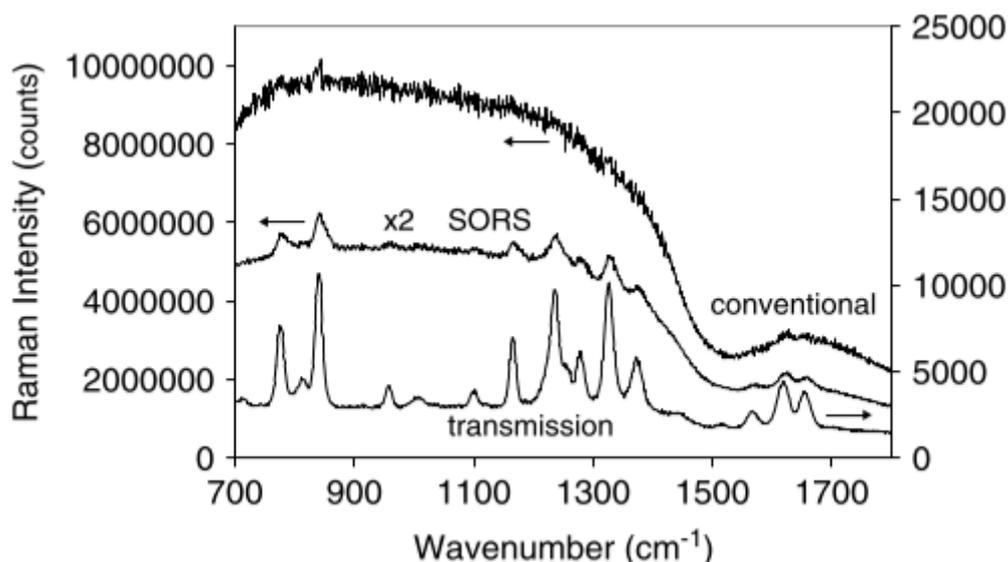


Figura 2.4: Espectro da secção verde da cápsula de Sudafed Dual Relief, com espessura de $150 \mu\text{m}$, utilizando as geometrias de SORS, TRS e Retrodispersão. Tempo de aquisição de 10s [10].

A técnica de transmissão também permitiu a Hargreaves *et al*, 2011 [12], tendo em conta a capacidade da técnica de sondar o interior do volume da amostra, demonstrar que aplicando a geometria de transmissão a quantidade de material no interior da cápsula farmacêutica não influencia a aquisição, pelo que a técnica é insensível à quantidade do conteúdo.

A quantificação de polimorfos também é uma das aplicações da técnica de transmissão, como se verifica em [13] e [14].

A junção da geometria de transmissão com a técnica de ressonância originou um novo método de espectroscopia de Raman, designado Espectroscopia Raman de Ressonância de Transmissão, e que foi implementada em [15], em que se fez um estudo sobre a variação do sinal de Raman com a concentração de β -caroteno numa amostra de espessura fixa. Verificou-se que existe uma relação linear entre a concentração de β -caroteno e a intensidade do sinal de Raman, até um valor de concentração em que se atinge um máximo de intensidade, a partir do qual decresce a intensidade do sinal devido a atenuação resultante da quantidade de β -caroteno. A técnica de Espectroscopia Raman de Ressonância de Transmissão também foi utilizada em [16].

2.3 Radiação de Excitação em Espectroscopia de Raman

Na experiência original que permitiu a observação do efeito de Raman pela primeira vez, foi utilizado um feixe de luz solar que foi focado de modo a incidir na amostra. Posteriormente, C. V. Raman conseguiu observar o mesmo efeito utilizando uma lâmpada de mercúrio quartzo como fonte de luz monocromática [17]. Em espectroscopia de Raman a radiação que incide na amostra consiste num feixe de luz monocromática, pelo que, se inicialmente se utilizavam lâmpadas de mercúrio, o desenvolvimento de lasers permitiu que sejam estes a escolha para fonte de luz monocromática em espectroscopia de Raman [18].

Dos comprimentos de onda da radiação incidente dos lasers utilizados em espectroscopia de Raman, destacam-se os seguintes presentes na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Tabela com valores normais de comprimento de onda dos lasers utilizados em espectroscopia de Raman [19].

Ultravioleta (nm)	Visível (nm)	Infravermelho Próximo (nm)
244	458	785
266	473	830
320	515	980
355	532	1064
405	594	
	633	
	660	

Variando a intensidade do sinal de Raman com λ^{-4} , os lasers no infravermelho diminuem a intensidade do sinal de Raman, em comparação com excitação no visível, mas aumentam a penetrabilidade na amostra. No entanto o sinal devido a fluorescência é suprimido no caso do infravermelho que é uma radiação que não origina absorção nas amostras, uma vez que a maioria das amostras absorve radiação no visível. Apesar de lasers no UV permitirem obter maior sensibilidade e menos fluorescência, pois o espectro de Raman é próximo da linha do laser ao contrário do sinal de fluorescência, também é necessária mais cautela na sua utilização, tanto a nível de utilizador como da amostra. Deste modo, a escolha do comprimento de onda depende não só da técnica utilizada para obter o espectro de Raman bem como do tipo de amostra a analisar [19].

2.4 Espectrômetro Dispersivo

A obtenção do espectro final de Raman necessita que, após a incidência do feixe na amostra, se filtre a radiação dispersa de modo a eliminar a radiação de Rayleigh sobreposta à radiação de Raman. A filtragem deste tipo de radiação permite que no espectro final não haja radiação de um determinado comprimento de onda, igual à do laser, e que se designa de luz parasita (*stray light*), em zonas do espectro correspondentes a outros comprimentos de onda, afetando a interpretação do espectro [20].

O espectrômetro é um dos dispositivos que permite separar a radiação dispersa pela amostra de acordo com o seu comprimento de onda, originando um espectro de intensidade da radiação Raman em função de unidades Desvio de Raman, Δcm^{-1} , que são unidades de número de onda relativo à linha do laser, ou de unidades de número de onda absolutos, cm^{-1} . São constituídos por uma fonte de excitação, um sistema de filtragem e separação dos comprimentos de onda, e pelo menos um detetor [21].

Os espectrômetros são classificados de dispersivos ou não dispersivos de acordo com o modo como ocorre a separação da radiação nos diferentes comprimentos de onda. Nos espectrômetros não dispersivos, há uma modulação em frequência de cada comprimento de onda da radiação, criando-se um único sinal modulado que é adquirido por um único detetor. A separação nos diferentes comprimentos de onda ocorre ao desmodular o sinal utilizando a transformada de Fourier. Os espectrômetros dispersivos realizam uma separação espacial dos diferentes comprimentos de onda, utilizando redes de difração ou prismas, que são posteriormente adquiridos por um detetor monocanal ou multicanal [20].

A discussão seguinte concentra-se em espectrômetros dispersivos baseados em redes de difração.

Os espectrômetros utilizam monocromadores ou espectrógrafos para fazer o espalhamento da radiação de Raman e ainda realizar a filtragem da radiação de Rayleigh.

Na sua constituição os monocromadores apresentam um (Configuração Fastie-Ebert) ou dois espelhos (Configuração Czerny-Turner), duas fendas e uma rede de difração. A conjugação do comprimento entre as fendas de entrada e de saída, com a rotação da rede de difração controla a quantidade de *stray light* associada ao monocromador bem como a gama de comprimentos de onda que atinge o detetor em cada aquisição [4, 21].

A configuração de Czerny-Turner é a configuração mais utilizada, em que se tem dois espelhos em W , em que o primeiro permite colimar a radiação, que entra no monocromador, na rede de difração e o segundo foca a radiação dispersa para a fenda de saída como é possível visualizar na Figura 2.5. Na configuração de Fastie-Ebert o processo de colimação e focagem é realizado por um único espelho esférico [21].

O espectrógrafo é em tudo semelhante ao monocromador à exceção da ausência da fenda de saída. Esta diferença tem implicação no tipo de detetor e na seleção do intervalo de comprimentos de onda que chega a este, uma vez que a largura da fenda de saída limita a gama de comprimentos de onda que atinge o detetor. Na Figura 2.5 verifica-se a diferença entre ambos [21].

Deste modo, os espectrógrafos são utilizados com detetores multicanal ao passo que os monocromadores são sobretudo utilizados com detetores monocanal, ainda assim, são ambos comumente designados por monocromadores.

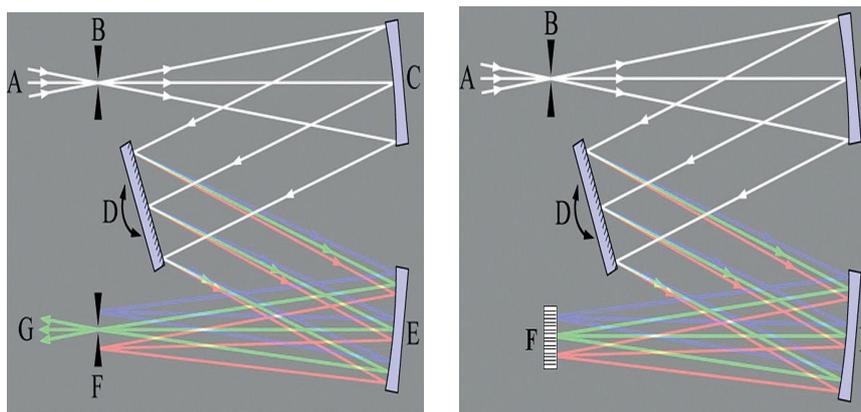


Figura 2.5: Ilustração de um monocromador (esquerda) e de um espectrógrafo (direita) com configuração de Czerny-Turner [21]. Legenda: A- Fonte de Radiação; B- Fenda de Entrada; C- Espelho Colimador; D- Rede de Difração; E- Espelho de Focagem; F- Fenda de Saída (esquerda), Detetor (Direita); G- Detetor.

A resolução espectral é definida como a capacidade de distinguir as diferentes bandas espectrais.

Deste modo, quanto menor a resolução espectral, menor será a possibilidade de identificar as componentes presentes no espectro devido a perda de informação. No caso do espectrómetro dispersivo, a resolução espectral é afetada pela combinação dos seguintes fatores [19]:

1. Distância Focal
2. Rede de Difração
3. Comprimento de Onda do Laser
4. Detetor
5. Largura da Fenda de Entrada

Se só um dos fatores anteriores for variável, então a resolução espectral é maior quanto maior a distância focal ou a densidade de linhas da rede de difração ou, no caso de um detetor multicanal, quanto menor a largura do pixel ou da fenda de entrada. Por outro lado a resolução espectral, tendo em conta as unidades de medida do espectro, é

dependente do comprimento de onda da fonte de excitação, diminuindo com a diminuição do comprimento de onda [20].

2.4.1 Tipos de Sistemas Dispersivos

A filtragem da radiação referente à linha do laser é muito importante para a correta aquisição do espectro de Raman. O monocromador descrito na secção 2.4 é utilizado como a base de filtros de rejeição de luz parasita. Deste modo, o espalhamento da radiação de Raman e a rejeição da radiação de Rayleigh é obtida simultaneamente utilizando múltiplos monocromadores.

2.4.1.1 Duplo Monocromador

O duplo monocromador é constituído por dois monocromadores que são divididos por uma fenda que permite que a radiação que sai da fenda do primeiro monocromador entre no segundo monocromador.

A rejeição da luz parasita (*stray light*) e o espalhamento da radiação de Raman é realizado de acordo com a configuração das duas redes de difração, como se exemplifica na Figura 2.6 [20]:

1. Configuração Aditiva: Neste tipo de configuração as redes de difração têm o seu movimento acoplado, pelo que o espalhamento é realizada na mesma direção. Após a primeira dispersão a largura da fenda central, geralmente muito estreita, determina a quantidade de radiação de Rayleigh que é eliminada. A segunda rede de difração executa novo espalhamento, o que permite eliminar ainda mais a radiação indesejada em conjunto com a largura da fenda de saída. Com este tipo de configuração tem-se o dobro da dispersão.
2. Configuração Subtrativa: Esta configuração é caracterizada pelo facto das redes de difração executarem o espalhamento da radiação em direções contrárias. O primeiro estágio é igual ao da configuração anterior, mas agora a fenda central é que determina a gama de comprimentos de onda que são detetados pelo detetor. Já a segunda rede de difração desfaz a dispersão da primeira rede o que origina um feixe que é transmitido para o detetor em que a radiação indesejada é eliminada pela largura da fenda de saída deste segundo estágio.

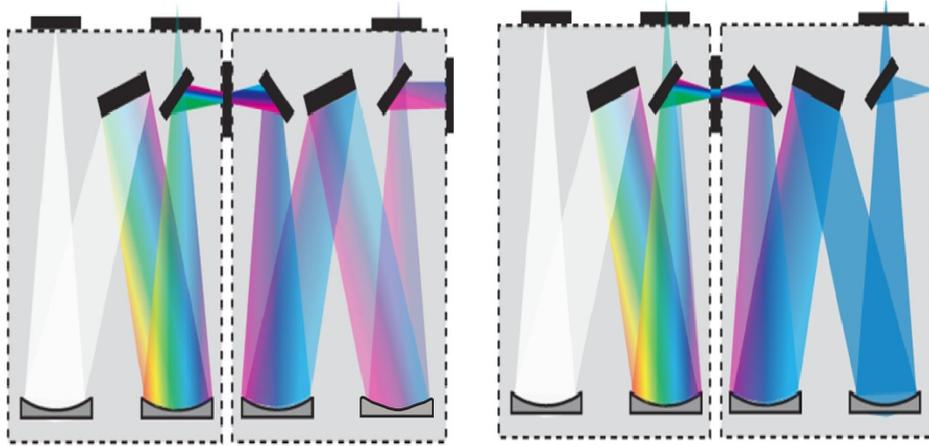


Figura 2.6: Ilustração da geometria aditiva (esquerda) e subtrativa (direita) do monocromador, adaptado de [22].

Este tipo de conjugação de monocromadores, é utilizada sobretudo com detetores fotomultiplicadores, em que há uma elevada rejeição de radiação de Rayleigh, devido a se diminuir a largura da fenda entre os monocromadores [23], sendo exemplos da utilização deste tipo de configuração os estudos em [24] e [25].

No entanto é possível adaptar um duplo monocromador com um detetor multicanal, sendo o mais comum o CCD. Um exemplo é o de Deckert *et al.*, 1995 [23], em que se ajusta a área ativa do CCD de acordo com a largura da fenda para reduzir a luz parasita (stray light), permitindo melhorias relativas ao uso de deteção monocanal. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 2.7, em que se compara a estratégia utilizada com a estratégia de abrir totalmente a fenda intermédia.

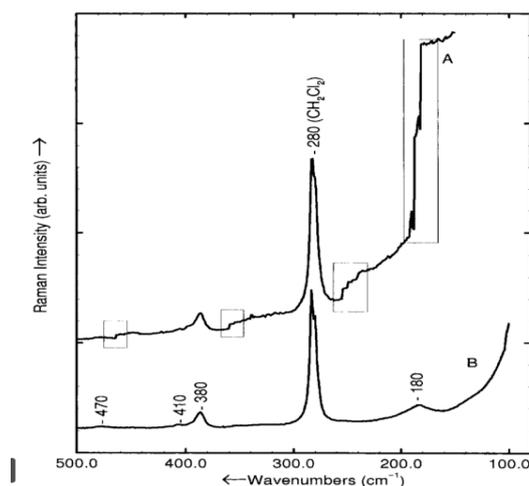


Figura 2.7: Espectro de Raman de baixa frequência do 1,2-bis(fenilfosfino)etileno dissolvido em CH_2Cl_2 . (A)- Fendas médias totalmente abertas com utilização de toda área do detetor. (B)- Fendas médias com 3 mm e área ativa do detetor ajustada [23].

A conjugação da área de detecção com a abertura das fendas médias permitiu que a luz parasita existente no gráfico A, nas caixas retangulares, seja eliminada bem como permitiu a aquisição do espectro para comprimentos de onda próximos da linha do laser [23].

2.4.1.2 Triplo Monocromador

A utilização de espectrómetros dispersivos com detecção multicanal implica que se tenha um monocromador duplo a anteceder um espectrógrafo de modo a perfazer um monocromador triplo. Neste tipo de espectrómetro, o monocromador duplo pode ter uma configuração aditiva, no entanto o mais usual é o monocromador ter uma configuração subtrativa, ambos são apresentados na Figura 2.8. Neste último, o espectrógrafo vai realizar o espalhamento da radiação, proveniente do duplo monocromador, que vai incidir no detetor [18,20].

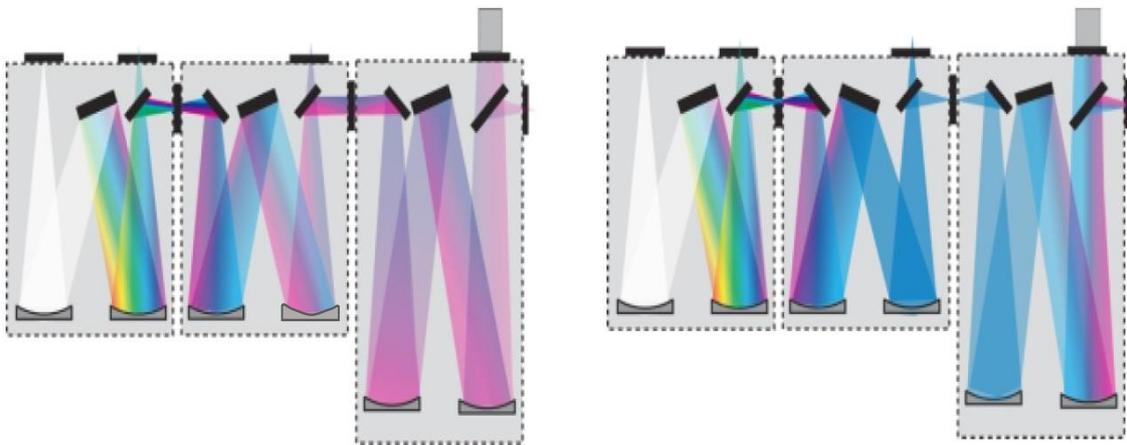


Figura 2.8: Esquema de um espectrómetro triplo com configuração aditiva (esquerda) e subtrativa (direita), adaptado de [26].

As vantagens oferecidas pelos espectrómetros múltiplos, a nível de rejeição de excitação do nível do laser e de resolução espectral, levaram a que um espectrómetro triplo com uma câmara CCD, o Jobin Yvon T64000, tenha sido utilizado por Alejandro Ayala, 2007 [27], para investigar o polimorfismo de substâncias farmacêuticas.

2.4.1.3 Espectrógrafo / Monocromador com Filtro de Rejeição de Luz Parasita

O desenvolvimento de filtros de rejeição da linha do laser permitiu ter espectrómetros que sejam constituídos pelo filtro seguidos de um monocromador ou de um espectrógrafo, dependendo se o detetor é monocanal ou multicanal respetivamente.

Neste tipo de espectrómetro os filtros mais utilizados são:

1. Holographic Notch Filter: São filtros que permitem eliminar a radiação num intervalo de comprimentos de onda muito estreito junto da linha do laser. Fora deste intervalo de rejeição apresentam uma grande transmissão da radiação. Apesar de permitirem

realizar medições da dispersão de Stokes e Anti-Stokes, têm que ser escolhidos em função da linha do laser, não podendo ser reutilizados quando esta se altera. Também apresentam um tempo de vida limitado [19, 28].

2. Dielectric Edge Filter: São mais estáveis e de maior longevidade que os anteriores, mas de performance inferior. Permitem transmissão com uma grande eficiência de comprimentos de onda acima de um comprimento de onda característico, abaixo do qual todos os comprimentos de onda são rejeitados. Obtém-se uma grande rejeição da radiação de Rayleigh, mas não permite medidas de Anti-Stokes [18, 19].

3. Filtros de Absorção

Os espectrómetros triplos, à semelhança dos espectrómetros duplos, conseguem uma grande rejeição da radiação de Rayleigh e obter o espectro de Raman perto da linha do laser, ao contrário de filtros notch e edge [27].

2.5 Detetores para Espectroscopia de Raman

Os detetores utilizados em espectroscopia de Raman podem ser detetores monocanal ou multicanal, dependendo se têm só uma ou mais áreas sensíveis à luz, respetivamente.

2.5.1 Detetores Monocanal

2.5.1.1 Fotomultiplicador

O detetor mais utilizado em espectroscopia de Raman é o fotomultiplicador (PMT) onde a radiação incidente é convertida num sinal elétrico. Neste tipo de detetor tem-se, num tubo de vidro onde existe vácuo, um fotocátodo, um ânodo e uma cadeia de dínodos entre estes, como se apresenta na Figura 2.9. Para que os eletrões se movam ao longo do fotomultiplicador, é necessário ter uma fonte de tensão que permita que o primeiro dínodo esteja a uma tensão positiva relativa ao fotocátodo e que cada dínodo tenha uma tensão mais positiva que o anterior. A radiação incidente no fotocátodo origina a emissão de foto-eletrões em direção ao primeiro dínodo. Por sua vez, de modo a dar início à multiplicação de eletrões o primeiro dínodo deve estar a uma tensão positiva, de centenas de Volts, de modo a que se estabeleça uma diferença de potencial entre o dínodo e o fotocátodo que permita acelerar o eletrão em direção ao dínodo com energia suficiente para provocar emissão de eletrões. Na cadeia de dínodos, a colisão do eletrão com o dínodo provoca a emissão de vários eletrões de baixa energia que são acelerados pelo campo gerado entre os dínodos, produzindo-se a multiplicação de eletrões. Por fim o ânodo recebe os eletrões provenientes do último dínodo. Tendo em conta que a quantidade de eletrões que são gerados na cadeia de dínodos depende da energia dos eletrões que

colidem no dínodo seguinte, e dependendo esta da tensão entre os dínodos, o ganho do fotomultiplicador depende da tensão aplicada aos seus terminais [29].

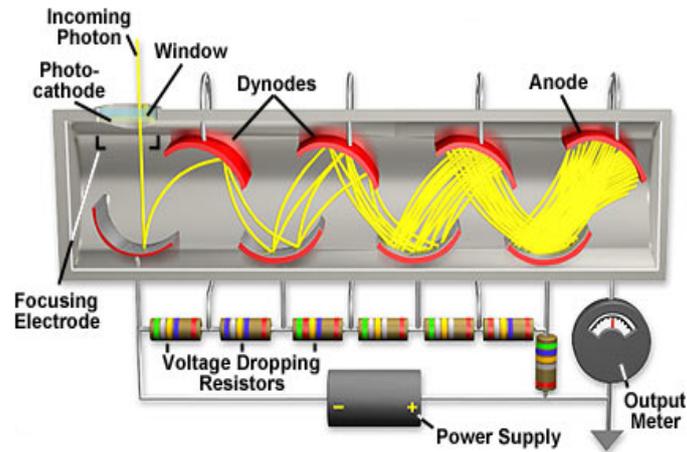


Figura 2.9: Ilustração de um fotomultiplicador [30].

2.5.1.2 Fotodíodo

Os fotodíodos são detetores de semicondutor, tipicamente silício, que convertem a radiação incidente numa fotocorrente. Neste tipo de detetor tem-se um substrato de silício entre duas camadas de semicondutores dopados, uma p (fina para permitir ser atravessada pela radiação) e outra n, como na Figura 2.10. A radiação ao atingir o substrato de silício gera pares de elétron-lacuna. Devido ao campo elétrico criado pela fonte de tensão, em que se tem a camada p com o potencial negativo da fonte de tensão, os elétrons deslocam-se para a camada n e as lacunas para a camada p. Este movimento de elétrões gera uma fotocorrente que é tanto maior quanto maior a intensidade da radiação [29].

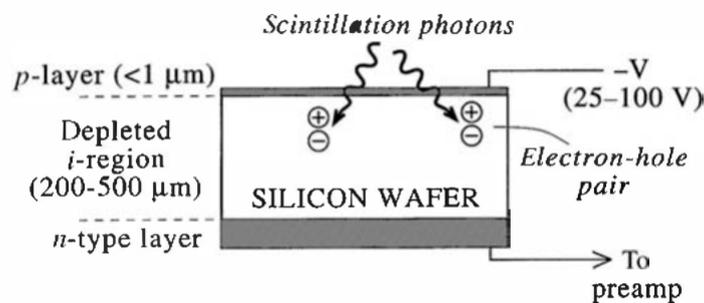


Figura 2.10: Ilustração de um fotodíodo [29].

Um tipo especial de fotodíodo é o fotodíodo de avalanche em que se tem uma tensão de polarização elevada, próxima do limite de tensão a partir do qual ocorre a rutura da junção p-n. Neste tem-se, tipicamente, uma camada p altamente dopada, seguida do substrato

de silício, e duas camadas, uma p e uma n também altamente dopada, como na Figura 2.11. Novamente há geração de pares elétron-lacuna, com o deslocamento do elétron para a camada p. Entre a camada p e a camada n altamente dopada, existe um elevado campo elétrico que acelera os elétrons. A elevada energia cedida aos elétrons pelo campo elétrico permite que estes originem ionização por choque gerando mais elétrons, ocorre então a avalanche que permite multiplicar o sinal elétrico relativamente ao fotodíodo convencional [29].

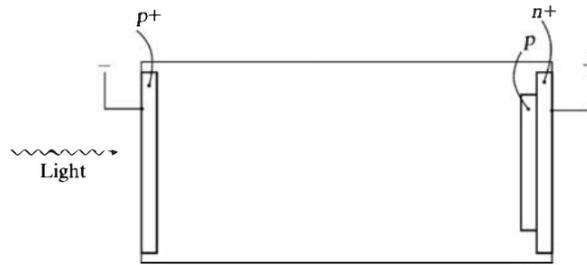


Figura 2.11: Ilustração de um fotodíodo de avalanche, adaptada de [29].

2.5.2 Detetores Multicanal

2.5.2.1 Charged Coupled Device

Os Charged Coupled Devices (CCDs) são detetores de semiconductor constituídos por pixels montados num substrato de silício. Cada pixel apresenta 3 elétrodos que permitem coletar os elétrons, através de poços de potencial, provenientes de pares elétrons-lacuna que se formam devido a incidência de radiação no silício.

Inicialmente um dos elétrodos está a maior potencial, formando-se um poço de potencial onde são depositados os elétrons, Figura 2.12A. De seguida o elétrodo seguinte é elevado ao potencial do anterior, Figura 2.12B, o que permite a deslocação dos elétrons para esta nova zona, e o primeiro elétrodo vê o seu potencial diminuído, criando-se um poço de potencial no segundo elétrodo como demonstrado na Figura 2.12C [31,32].

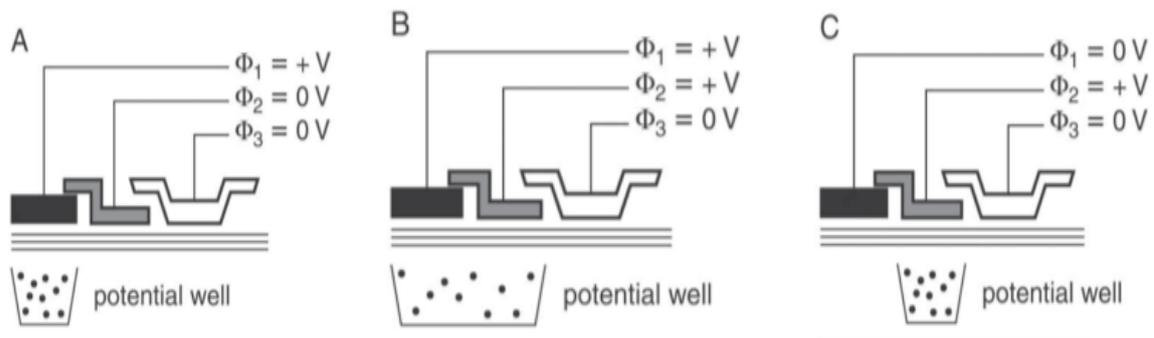


Figura 2.12: Representação da formação dos poços de potencial com a aplicação de tensão dos elétrodos [32].

Repetindo-se este processo deslocam-se os elétrons, de pixel para pixel, para uma coluna, que não é iluminada, que é o registo série, Figura 2.13B. No registo série há um deslocamento da carga, correspondente a cada pixel, para um local de leitura da carga gerada, Figura 2.13C e Figura 2.13D. O processo é repetido até toda a carga gerada ser lida e se ter convertido a radiação incidente num conjunto de sinais elétricos correspondentes à carga gerada em cada pixel [31, 32].

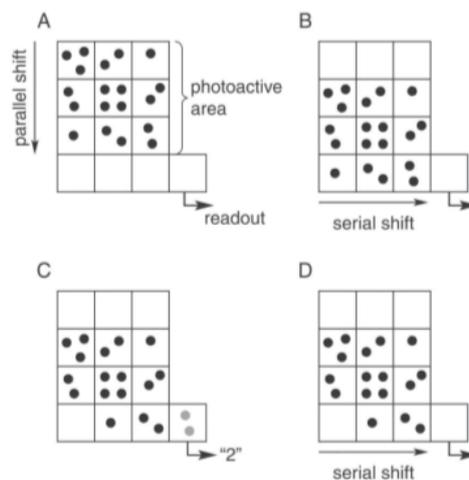


Figura 2.13: Representação do processo de transformação do sinal luminoso em sinal elétrico num CCD [32].

Os CCDs permitem, que antes de se fazer a leitura de cada pixel, se combine a carga de mais que um pixel de modo a gerar um único pixel com a carga total igual à soma dos pixels combinados (em espectroscopia no sentido perpendicular ao da orientação espectral), designado binning, que permite a vantagem de se ter maior rácio sinal-ruído de uma só leitura em vez do correspondente a cada pixel [32].

2.5.3 Comparação dos Detetores

Os detetores apresentam propriedades que os permitem comparar [20]:

1. Eficiência Quântica: Probabilidade de ser gerado sinal por cada fóton incidente. Tem unidades de fotoelétron/fóton, sendo apresentada em percentagem.
2. Curva De Resposta: Curva da variação da eficiência quântica com o comprimento de onda.
3. Área Foto-sensível: Área do detetor que é utilizada para deteção, apresentada em cm^2 .
4. Corrente no Escuro: Corrente gerada, pelo próprio detetor, quando não está exposto a iluminação. Com unidade de medida de $e^-/pixel/s$.

5. Ruído ($e^-/pixel$ rms):

- (a) Ruído Shot: Flutuação estatística introduzida por geração aleatória de elétrons ou emissão de elétrons.
- (b) Ruído Shot de Radiação: Flutuação estatística resultante da detecção de fótons.
- (c) Ruído de Leitura: Ruído introduzido pela eletrônica do detetor.

Os fotomultiplicadores apresentam uma elevada corrente no escuro e baixa eficiência quântica, no entanto comparando com os fotodíodos apresentam uma maior área de sensibilidade. Também apresentam um maior ganho interno que os fotodíodos, pelo que os fotodíodos de avalanche permitem colmatar esta desvantagem. A eficiência quântica dos CCDs é superior à dos fotodíodos e PMTs, pelo que permitem melhorar a intensidade do sinal. Quanto à corrente no escuro, há uma dependência com a temperatura, pelo que os detetores são arrefecidos de modo a diminuí-la. Nos CCDs a corrente diminui cerca de 50% sempre que a temperatura cai 8° C. A temperatura dos CCDs tem que ser tal que permita a baixa corrente no escuro e manter a eficiência de detecção que diminui com a diminuição da temperatura. Os CCDs apresentam um ruído de leitura baixo, entre 2 a 20 elétrons por pixel, o que tendo em conta a sua eficiência quântica, que varia com o comprimento de onda, permite aumento da relação sinal ruído [32].

2.6 Métodos de Aquisição para Espectrómetros Dispersivos

2.6.1 Espectrómetros com Detecção Monocanal

A aquisição do espectro, quando se utiliza um dos detetores monocanal referidos na secção 2.5.1, pode ser efetuada num comprimento de onda específico ou fazendo um varrimento de todos os comprimentos de onda de interesse. Neste último, o monocromador permite a aquisição de um determinado comprimento de onda durante um tempo de aquisição estabelecido. Após a aquisição pelo detetor o monocromador avança para o próximo comprimento de onda a adquirir [20].

2.6.2 Espectrómetros com Detecção Multicanal

Quando se utiliza detetores multicanal com espectrómetros dispersivos, tendo em conta a gama de comprimentos de onda adquiridos em cada aquisição, a aquisição não é realizada como descrito anteriormente. Neste tipo de espectrómetros não se consegue adquirir um espectro com resolução elevada ($\leq 1\text{ cm}^{-1}$) e um intervalo espectral, simultaneamente, grande (intervalo $\geq 3000\text{ cm}^{-1}$ numa única aquisição) [33]. Tem que se fazer uma escolha

entre resolução espectral ou intervalo espectral. Pode-se estabelecer uma posição fixa para o monocromador e fazer a aquisição do espectro referente à posição do monocromador, não se fazendo uso da rotação das redes de difração. No entanto, de modo a se fazer uso da rotação das redes de difração, desenvolveram-se técnicas que permitem tirar partido da aquisição multicanal e do varrimento de comprimentos de onda, o que permite aproximar a performance destes, em termos de resolução e cobertura espectral, dos anteriores, permitindo ter elevada resolução espectral num intervalo espectral grande [20].

2.6.2.1 Aquisição Estática

Neste tipo de aquisição, o monocromador é colocado numa posição fixa que permite a aquisição de uma gama de comprimentos de onda, numa só aquisição. Nesta, é necessário que o tempo de aquisição seja adequado de modo a que se tenha uma relação sinal ruído que permita obter as bandas do espectro definidas corretamente. A comparação do efeito do tempo de integração na Figura 2.14 indica que um tempo de aquisição baixo implica um SNR também baixo e o sinal de Raman é afetado pelo ruído. Se o tempo de aquisição for muito longo ocorre uma truncagem das bandas (saturação) [20].

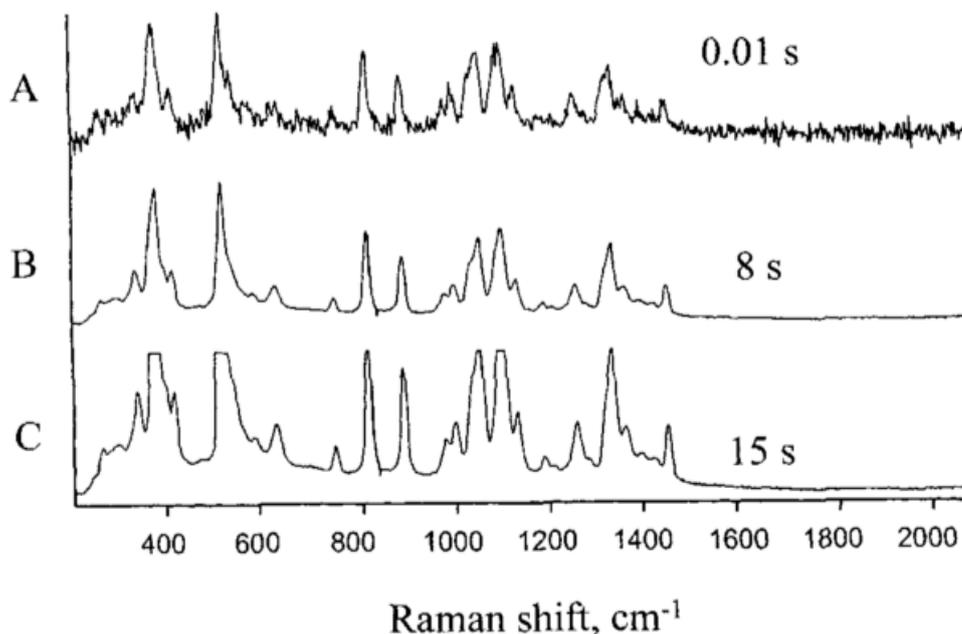


Figura 2.14: Espectro de Raman de dextrose sólida para diferentes tempos de integração: A- 0.01s; B- 8s; C- 15s [20].

2.6.2.2 Aquisição Segmentada

Neste tipo de aquisição, a rede de difração é posicionada de acordo com o intervalo espectral que se pretende adquirir, fazendo a aquisição de um segmento do espectro. A aquisição do segmento seguinte necessita que a rede seja reposicionada para adquirir uma nova gama espectral. O espectro total é obtido pela soma dos segmentos adquiridos. Deste modo consegue-se uma grande resolução em todo o espectro devido a se ter pequenos intervalos de aquisição. A grande desvantagem provém da sobreposição de zonas espectrais, referentes às fronteiras dos segmentos, que não têm sobreposição total devido à deteção ser realizada por diferentes zonas do detetor. A realização de médias das deteções permite diminuir a descontinuidade gerada como se observa na Figura 2.15. Também há aumento do tempo de aquisição [20].

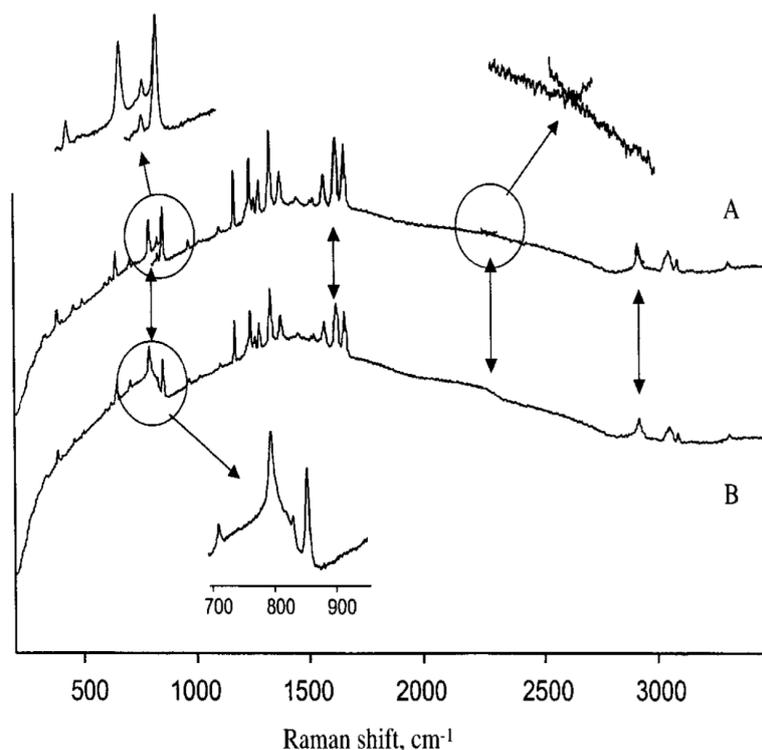


Figura 2.15: Espectro de Raman de acetaminofenol. O espectro resulta da junção de 5 segmentos adquiridos com CCD. Em B as zonas em que há sobreposição foram traçadas após a realização da média dos pontos sobrepostos. As setas verticais indicam as zonas de combinação dos segmentos [20].

O traçado A, na Figura 2.15, apresenta as zonas de união dos segmentos com a sobreposição e deslocação do espectro observável, já o espectro B apresenta uma transição suave entre os segmentos resultante da manipulação dos pontos nas fronteiras dos segmentos.

2.6.2.3 Técnica de Varrimento Multicanal (SMT)

A técnica SMT combina as vantagens de aquisição multicanal com as da aquisição monocanal. É uma melhoria da aquisição segmentada na medida em que a rede de difração sofre pequenos deslocamentos entre as aquisições. Nesta, a rede de difração vai permitir aumentar a área de iluminação do detetor, em cada incremento. Cada movimento da rede, para uma posição fixa, permite a aquisição do espectro durante o tempo de aquisição. Ao longo das aquisições faz-se o rastreamento do comprimento de onda e do pixel que o adquiriu, de modo a que, terminada a aquisição do espectro, se possa fazer a média das zonas de sobreposição dos espectros adquiridos. Assim esta técnica permite que se escolha o número de vezes que a zona de interesse do espectro seja adquirida, sendo designadas de acumulações. O número de espectros obtido é tal que permita que se tenha a zona de interesse do espectro adquirida com o número de acumulações indicado, como se vê na Figura 2.16. No entanto há um aumento do tempo de aquisição [20, 34, 35].

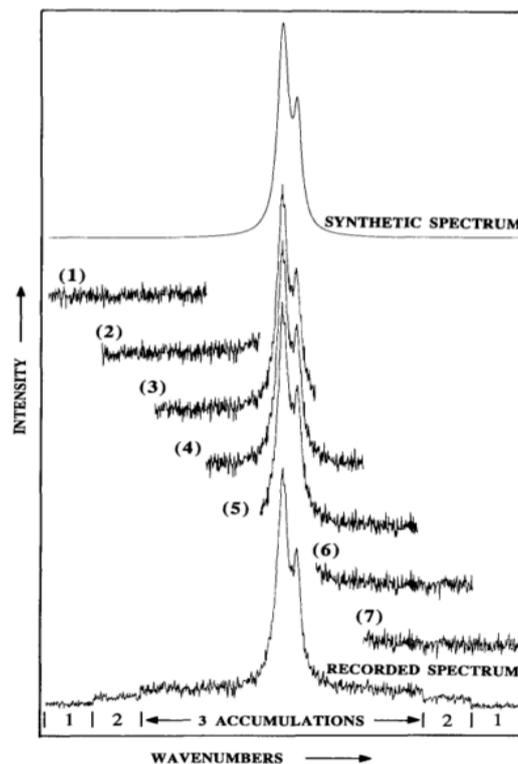


Figura 2.16: Espectro de explicação da técnica SMT. São realizadas 7 aquisições que permitem que a zona central do espectro seja obtida como resultado da média de 3 aquisições. No topo tem-se um espectro sintético, na base da figura tem-se o espectro final [35].

Na Figura 2.16, o espectro é obtido fazendo a aquisição de 7 espectros o que permite que se tenha a banda do espectro reconstruída através da média de três aquisições. A técnica permite a reconstrução total do espectro com qualidade.

A técnica de aquisição SMT, devido a combinar as vantagens de aquisição multicanal com as vantagens do varrimento de comprimentos de onda em sistemas dispersivos, foi aplicada por V. Deckert e W. Kiefer [34] a um espectrómetro com monocromador duplo na configuração aditiva, SPEX 1404.

A técnica SMT permitiu restaurar o espectro, bem como obter um espectro com melhor qualidade, relativamente à técnica de aquisição estática, para uma única posição da rede de difração, utilizada na aquisição A da Figura 2.17.

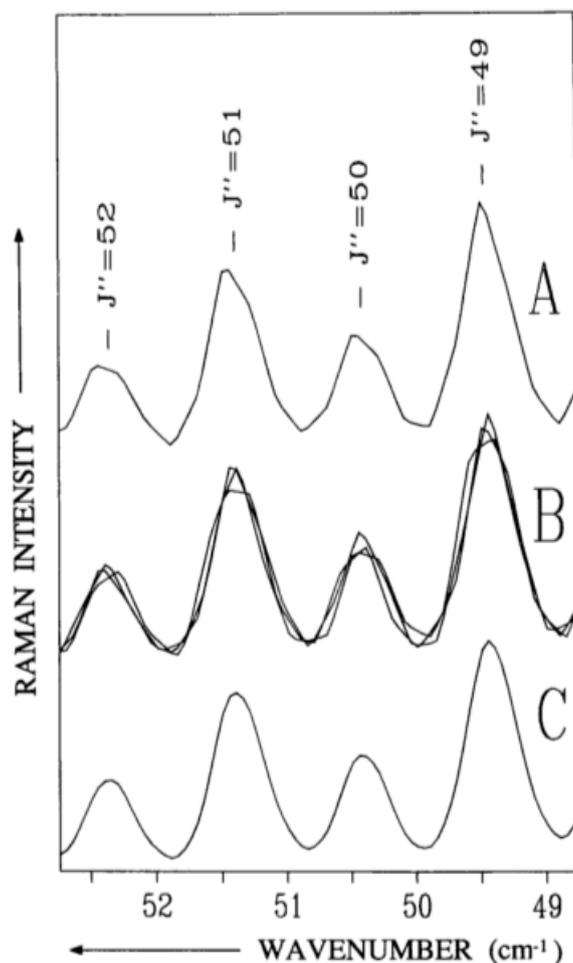


Figura 2.17: Representação do espectro da rotação pura do $^{35}\text{Cl}_2$. A- Espectro utilizando só uma acumulação; B- Espectro obtido com a técnica SMT em 3 posições da rede de difração; C- Espectro obtido de 8 posições da rede de difração pela técnica SMT [34].

2.6.2.4 Técnica de Varrimento Contínua Prolongada (CEST)

Esta técnica, desenvolvida por Chris Dyer e Brian J. E. Smith [36], permite combinar a aquisição multicanal, com um espectrómetro dispersivo em que se tem varrimento de comprimentos de onda obtendo-se uma gama espectral alargada. A deteção do espectro engloba uma sincronização entre o movimento das redes de difração e o movimento da

carga gerada, em cada pixel, no detetor. A rede de difração, desde o início da aquisição, vai permitir que os comprimentos de onda se desloquem ao longo do detetor, rodando continuamente. À medida que um comprimento de onda se desloca de pixel para pixel, a carga gerada por este em cada um também se desloca e adiciona-se à do pixel seguinte, até chegar ao pixel de registo para leitura. O tempo que um comprimento de onda demora a percorrer a área do detetor é igual ao tempo de integração. O processo repete-se até que se leia todos os comprimentos de onda do intervalo estabelecido. Esta técnica permite que cada comprimento de onda tenha, na sua leitura, associado ruído de uma só leitura ao contrário da técnica SMT. A intensidade do sinal vai depender do tempo de integração, uma vez que quanto maior for maior a carga gerada e maior o sinal [36].

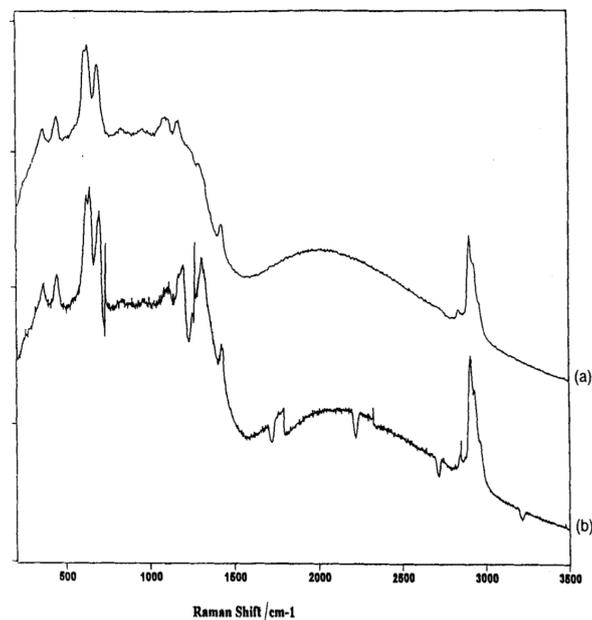


Figura 2.18: Comparação da técnica de aquisição segmentada (b) com a técnica CEST (a) [36].

Pela Figura 2.18, este tipo de aquisição permite restaurar o espectro com menor ruído, obtendo-se um espectro com melhor definição das bandas espectrais e sem descontinuidades no espectro.

As técnicas apresentadas permitem que se consiga uma maior rapidez de aquisição, devido a aquisição multicanal, obtendo-se um espectro que tem elevada resolução e intervalo spectral sem se ter que optar por uma em detrimento de outra. No entanto, a aquisição de um só espectro, através de uma aquisição numa só posição da rede de difração, permite uma maior rapidez de aquisição relativamente às técnicas de aquisição segmentada, CEST e SMT.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Interface com o SPEX 1403

Um dos requisitos do projeto é o de se ter uma interface de utilizador recente que permita reproduzir a funcionalidade da interface original. De modo a se obter uma interface funcional foi necessário adquirir os controlos, e respetivas respostas, trocados entre o software original e o controlador. Com esse objetivo desenvolveu-se um programa, em Python, que efetuou a função de uma interferência 'Man in the Middle'. Para se executar a aquisição, o programa desenvolvido teve que correr num computador que foi colocado entre o computador , com o software de controlo, e o controlador, quebrando-se a ligação física existente entre estes.

A comunicação com o controlador é realizada por RS-232, utilizando um cabo null modem de 25 pinos, ao qual se adiciona um adaptador de 25 para 9 pinos, para comunicação com o computador. Quebrar a ligação física significa que se desconectou o cabo que faz a ligação entre o controlador e o computador. Assim, utilizando dois adaptadores RS-232, de 9 pinos, para USB, fez-se a conexão entre computador, portátil e controlador. Para tal, utilizando um cabo null modem de 9 pinos, fez-se a conexão entre o computador com o software original e o portátil, onde corre o programa intruso à comunicação, e entre o portátil e o controlador a ligação física deveu-se ao cabo, original, de 25 pinos com adaptador para 9 pinos.

O programa desenvolvido, que se encontra no Apêndice A, faz uso de *threads* para obter os controlos enviados, pelo software, e as respostas, aos controlos, enviadas pelo controlador e fazer o armazenamento destes.



Figura 3.1: Representação da ligação entre os dispositivos de modo a executar a interferência 'Man in The Middle'. Quebrou-se a ligação física entre o computador, com o software de controlo do SPEX 1403, e o controlador do SPEX 1403 e foi introduzido um computador, onde é executado o programa 'Man in The Middle', entre estes.

Duas das *threads* são utilizadas para lerem as portas COM, associadas aos objetos serial criados, sendo que uma porta COM permite a comunicação com o computador e a outra com o controlador. A terceira *thread* permite gravar a informação intercetada, pelas *threads* anteriores, em dois documentos *.txt*, um que armazena os controlos enviados e o outro que grava as respostas recebidas. Também é esta última *thread* que executa a escrita nas portas COM.

O fluxograma que descreve o seu funcionamento é apresentado na Figura 3.2.

O programa, após o seu início de funcionamento, cria um evento e dois objetos serial, bem como os dois ficheiros que vão armazenar os comandos, e respetivas respostas, provenientes do computador e do controlador, respetivamente. De seguida são criadas, e inicializadas, as três *threads* que permitem a interferência *man in the middle*, e duas filas, uma para a *thread* que lê a porta de comunicação com o computador e outra para a *thread* de leitura do controlador, que permitem a comunicação entre as *threads* de leitura e a *thread* de escrita.

A execução, de ambas as *threads* de leitura, segue a mesma lógica. Em ciclo, é verificado se há informação a ser trocada. Sempre que há troca de informação, esta é enviada por uma fila para a *thread* de escrita. No início de cada ciclo é verificado se o evento foi ativado.

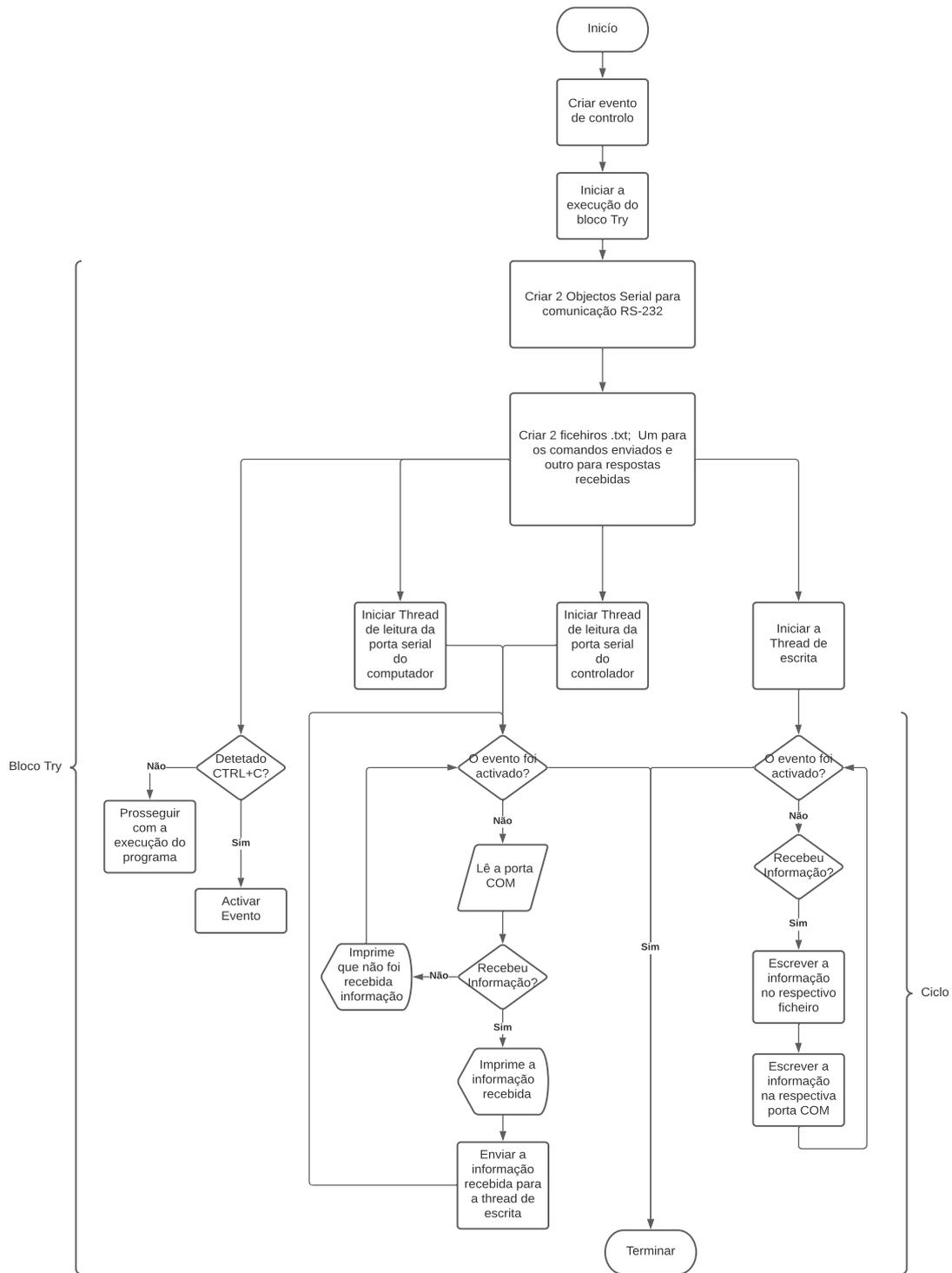


Figura 3.2: Fluxograma do 'Man in the Middle'.

A *thread* de escrita também funciona em ciclo, que se mantém ativo enquanto o evento não for ativado. Após iniciar a sua execução, verifica se há informação nas filas de comunicação. Caso haja informação, numa das filas, é gravada no ficheiro correspondente e escrita na porta COM que faz a comunicação com o dispositivo a que se destinava a informação.

O programa termina a sua execução quando se pressiona a combinação de teclas, CTRL + C, que gera um sinal que é interpretado com o objetivo de terminar a execução do programa. Deste modo, quando se pressionam estas teclas, na ordem indicada, o evento, criado no início do programa, é ativado e ambas as *threads* são terminadas, colocando-se um término no funcionamento do programa.

3.1.1 Teste ao Funcionamento do 'Man in The Middle'

A obtenção de controlos, utilizando o código descrito no Apêndice A, foi primeiramente testada utilizando uma balança de precisão, KERN CKE/CDS que permitia comunicação utilizando RS-232. Fazendo uso do monitor série da plataforma Arduino foi possível simular a comunicação entre utilizador e a balança e testar o programa desenvolvido.

Os comandos enviados pelo utilizador foram adquiridos pelo programa e enviados para a balança, tal como as respostas provenientes desta para o utilizador, de modo a verificar se se estava a executar a interferência de *man in the middle*. Os comandos enviados foram os seguintes:

1. t - Permite tarar a balança;
2. w - Permite obter um valor pesado, dos valores variáveis a serem medidos;
3. s - Permite obter um valor fixo referente ao valor medido na balança;

Após cada comando enviado, a balança enviava, de acordo com o comando inserido pelo utilizador, o valor apresentado no seu ecrã.

3.2 Geometria de Transmissão

A geometria de transmissão, em espectroscopia de Raman, consiste, como descrito na secção 2.2, na incidência da radiação de excitação num lado da amostra com a aquisição a ser realizada no lado oposto, atravessando o feixe laser toda amostra.

No capítulo 2, foram discutidas configurações de aquisição e detetores utilizados em espectroscopia de Raman. Nesta secção far-se-á uma descrição do material escolhido para conseguir a geometria pretendida, de acordo com os objetivos estabelecidos, bem como dos métodos utilizados na montagem da dita geometria.

3.2.1 Material para Espectroscopia Raman de Transmissão

Na configuração anterior (de 90°), fazia-se uso de espelhos e lentes, existentes na estrutura original, para fazer incidir o feixe laser na amostra. Por sua vez, a amostra, encontrava-se colocada numa peça de suporte que seria fixada na estrutura inicial. A atual configuração

faz uso da base da peça de suporte, da amostra, para suportar uma segunda peça que serve de suporte para uma estrutura, uma gaiola, que contém os componentes necessários para realizar a geometria de transmissão. No entanto, já não se utiliza a estrutura original para encaminhar o feixe laser para a amostra, tendo-se criado um caminho alternativo.

De seguida faz-se uma descrição do material que constitui o sistema que permite efetuar a geometria de transmissão.

Fibra ótica: É uma fibra multimodo, com uma AN de 0,22 e 50 μm de diâmetro do núcleo, constituído por sílica. Apresenta conectores FC/PC em ambas as terminações.

Suporte de Translação: A fibra encontra-se acoplada, por um conector (SM05FC2, Thorlabs, EUA) a este suporte (CXYZ05/M, Thorlabs, EUA), em ambas as extremidades. Este apresenta translação ao longo dos eixos x, y e z de modo a controlar mais facilmente a focagem, tanto do feixe do laser na fibra como do feixe, proveniente da fibra, na amostra.

Lente Plano-Convexa de Focagem (L1): A lente (LA1700, Thorlabs, EUA) é colocada em frente do laser, de modo a que se consiga focar o feixe laser na fibra ótica. Tem uma distância focal de 3 cm e é constituída pelo substrato N-BK7. Tendo em conta que o feixe, ao atravessá-la, diminui o seu diâmetro, permite que o ponto focado no núcleo da fibra seja inferior a 50 μm .

Lente Plano-Convexa de Colimação (L2): Após o feixe ser transmitido ao longo da fibra, desde o local do laser até à estrutura da gaiola, é necessário fazer a sua colimação. Ao se fazer incidir luz, proveniente de um ponto de luz, esta permite colimá-la. Deste modo, escolheu-se uma lente (LA1116, Thorlabs, EUA) com uma distância focal de 1 cm, para colimar o feixe após a fibra. É também constituída pelo substrato N-BK7.

Lente Plano-Convexa de Focagem (L3): Para se focar o feixe na amostra, utiliza-se, novamente, uma lente plano-convexa (LA1213, Thorlabs, EUA) com o mesmo substrato, mas agora com 5 cm de distância focal, que permite que se tenha um ponto focado na amostra com uma dimensão reduzida, na ordem dos μm . Após esta lente, o feixe ainda atravessa um filtro.

Filtro Passa-Banda: De modo a se incidir na amostra só radiação de comprimento de onda do laser, 514,5 nm, é necessário eliminar possível radiação resultante do substrato da lente e da sílica do núcleo da fibra. Assim, após o filtro (10LF10-515, Newport, EUA), tem-se só radiação correspondente à linha do laser. Este apresenta uma transmissão de pico de 60%, de acordo com a Figura G.1 do Apêndice G, para o comprimento de onda de 514,5 nm. Este filtro já pertencia ao laboratório.

Filtro Passa-Alto: Após a incidência de radiação na amostra utiliza-se este filtro, que é um filtro edge passa-alto, de modo a reduzir a radiação indesejada, referente à linha do laser, que entra no duplo monocromador. Sendo um filtro passa-alto que tem um comprimento de onda de corte de 514 nm, apresenta uma transmissão de 0% abaixo deste comprimento e uma transmissão acima de 90% para os comprimentos de onda superiores, de acordo com a Figura G.2 do Apêndice G, toda a radiação com comprimento de onda inferior ao de corte é filtrada. Encontra-se suportado numa peça em plástico, desenhada em CAD no software Autodesk® Inventor® Professional - 2021, da Autodesk, Inc., e impressa em plástico numa impressora Ultimaker 2⁺ (Ultimaker, Países Baixos). O filtro BLP01-514R-25 foi adquirido na Semrock (IDEX Health&Science, NY, EUA).

Suporte de Amostra: É uma peça que permite suportar cuvettes e ser atravessada por radiação, de modo a permitir a geometria de aquisição de transmissão. Também apresenta os 4 orifícios compatíveis com a gaiola de 30 mm. Esta peça, bem como todas as peças de plástico utilizadas ao longo do projeto, foi desenhada em CAD no software Autodesk Inventor Professional - 2021, da empresa Autodesk, Inc., e impressas em plástico numa impressora Ultimaker 2⁺ (Ultimaker, Países Baixos).

Peças em Alumínio: O suporte da gaiola, de 30 mm, é realizado através de varas que, para além de atravessarem os suportes das lentes L2 e L3, do filtro e da peça onde se coloca a amostra, também atravessam uma peça de suporte. Esta peça de suporte apresenta 4 orifícios compatíveis com a gaiola de 30 mm e um, central, de 14 mm de diâmetro, que permite que a radiação a atravesse. Por sua vez, encontra-se aparafusada a uma peça, também ela de alumínio, com uma estrutura compatível com a colocação na estrutura inicial do instrumento. A peça que suporta diretamente a gaiola apresenta dois parafusos de ajuste das coordenadas x e y, possibilitando um ajuste mínimo de 200 μm e um ajuste máximo de 1 mm, em ambos os sentidos, para as duas coordenadas. Estas duas peças foram fabricadas pela oficina do LIP-UC.

Com o objetivo de se escolher o material, que permitisse ter um ponto de focagem na amostra na ordem dos 300 μm , foi necessário calcular o diâmetro do feixe que foi focado na entrada da fibra, bem como o diâmetro do ponto focado na amostra. Tendo em conta a natureza gaussiana do feixe, antes de ser focado na fibra ótica, e o facto de ser necessário fazer a colimação e focagem do feixe, proveniente da fibra, antes de incidir na amostra, foram realizadas simulações que permitiram calcular o diâmetro final do ponto de incidência, da radiação de excitação, na amostra. Nas simulações realizadas utilizaram-se as Equações (3.1), (3.2), (3.3) e (3.4), que permitiram fazer a escolha da combinação de material descrita.

$$D = \frac{4 \times \lambda \times f}{\pi \times d} \quad (3.1)$$

$$AN_{lente\ focagem} = \sin(\tan^{-1}(r/f)) \quad (3.2)$$

$$M = 0,22/AN_{lente\ focagem} \quad (3.3)$$

$$D_{pontofocado} = M \times d_{fibra} \quad (3.4)$$

Na equação (3.1), que permite calcular o diâmetro do feixe quando é focado na fibra ótica, tem-se os seguintes parâmetros:

1. λ - Comprimento de onda do laser
2. f - Distância focal da lente
3. d - Diâmetro do feixe laser na posição da lente

As equações (3.2), (3.3), (3.4), permitiram obter o diâmetro final do feixe ao incidir na amostra, e têm os seguintes parâmetros:

1. r - Raio do feixe colimado
2. f - Distância focal da lente
3. M - Ampliação do sistema lente de colimação e lente de focagem
4. $D_{pontofocado}$ - Diâmetro do ponto iluminado na amostra
5. d_{fibra} - Diâmetro da fibra ótica.

3.2.2 Montagem Experimental

A montagem da geometria de transmissão causou a alteração da configuração original de aquisição. Deste modo a incidência do feixe laser na amostra não foi realizada utilizando os mecanismos existentes na estrutura do espectrômetro (lentes e espelhos que orientavam a radiação laser para a amostra), mas sim fazendo uso de uma fibra ótica. Devido a se utilizar uma fibra ótica para a transmissão do feixe laser necessitou-se de fazer um acoplamento da radiação laser para a fibra e, posteriormente, colimar e focar a radiação laser, proveniente da fibra, na amostra. A radiação laser, até incidir na amostra, sofre uma diminuição da sua potência ótica nos componentes óticos que atravessa mas também no acoplamento da radiação laser na fibra. Não se podendo alterar as características dos componentes óticos, foi importante otimizar a montagem do acoplamento do feixe laser na fibra.

Duas montagens foram utilizadas para se conseguir um acoplamento eficaz do feixe laser na fibra ótica. Destas, que se discutem de seguida, escolheu-se a segunda para a montagem final, devido às vantagens que proporciona.

Em ambas as montagens, a colocação das lentes, nos suportes, seguiu sempre a ordem que permite diminuir a introdução de aberração esférica. Esta aberração ótica deve-se ao facto de os raios mais afastados do centro da lente, após atravessarem a lente, sofrerem uma maior convergência e conseqüentemente focarem antes do ponto focal da lente. A correta iluminação das lentes permite diminuir esta aberração, deste modo fez-se incidir a radiação colimada na face curva da lente e feixes divergentes, que é o caso da radiação proveniente da fibra ótica, na face plana da lente.

Selecionados os componentes necessários, a montagem experimental assumiu a forma apresentada na Figura 3.3.

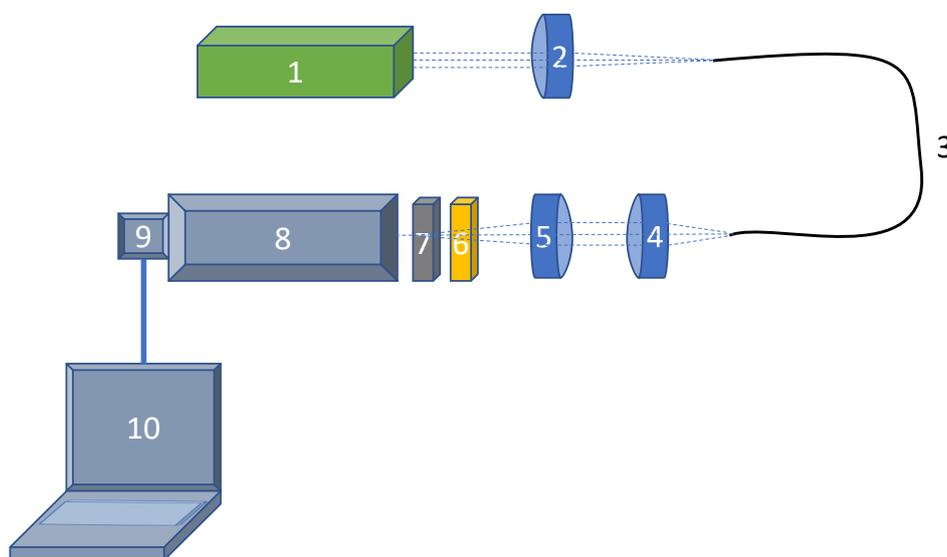


Figura 3.3: Esquema da montagem experimental do instrumento. 1 - Laser de íons de Argon (514,5 nm); 2 - Lente plano-convexa ($f=30$ mm); 3 - Fibra ótica; 4 - Lente plano-convexa ($f=10$ mm); 5 - Lente plano-convexa ($f=50$ mm); 6 - Filtro passa-banda; 7 - Porta amostra; 8 - Duplo Monocromador SPEX Ramalog 1403; 9 - Fotomultiplicador Hamamatsu R928 (arrefecido termoelectricamente); 10 - Computador;

3.2.2.1 Acoplamento Utilizando Postes

Nesta montagem o acoplamento entre o feixe do laser e a fibra ótica é executado com a ajuda de postes, e respetivos suportes, para suportar a lente de 3 cm de distância focal e o suporte que contém a fibra ótica. Fazendo uso de bases móveis, que permitem variar a posição ao longo da mesa ótica, e de garfos de fixação foi possível controlar a posição da lente e da fibra para realizar o acoplamento.

Estando a saída do feixe a uma altura de 11.5 cm da mesa ótica, ajustou-se a altura do poste da lente de modo a que o feixe incidisse no centro da lente. Fixou-se esta posição vertical e colocou-se a lente o mais próximo possível da saída do feixe, fixando-se a posição horizontal com o garfo de fixação.

Com a ajuda de um papel branco foi possível seguir o feixe, após a lente, até à posição em que se encontrava o feixe focado. Nesta posição foi colocado o suporte da fibra ótica, ajustando-se em altura de modo a que o feixe incidente se encontra-se no centro do conector. De modo a se verificar que o feixe se encontrava a incidir na totalidade no núcleo da fibra utilizou-se um alvo, em frente da saída da fibra, de modo a se conseguir verificar o aparecimento de um feixe com a forma correspondente a um feixe gaussiano. Fixada a posição da entrada da fibra, ajustou-se, utilizando os parafusos de precisão do suporte da fibra, a posição em x e y de modo a otimizar a potência ótica de saída do feixe. Também se ajustou a posição em z, utilizando o mecanismo do suporte da fibra que permite movimentar nesta direção a fibra, para otimizar o acoplamento. Otimizada a potência de saída, para o valor máximo obtido, verificou-se que se pode otimizar o sistema utilizando a abordagem seguinte.

3.2.2.2 Acoplamento Utilizando uma Gaiola

Esta montagem consistiu na colocação da lente de focagem, com uma distância focal de 3 cm, e do suporte da fibra num sistema em gaiola. O sistema montado permitiu que os suportes, da lente e da fibra, estivessem corretamente alinhados horizontalmente e verticalmente, ao contrário da montagem descrita anteriormente. Deste modo, o acoplamento do laser na fibra ótica foi efetuado mais facilmente devido à possibilidade de deslocação, de um dos suportes, relativamente ao outro, com a consequente vantagem de se manter o feixe do laser alinhado com o centro da lente e do núcleo da fibra ao longo deste deslocamento de um dos suportes. O facto de se conseguir fazer este deslocamento ao longo da gaiola, sem desalinhamento da posição lateral entre a fibra, a lente e a saída do feixe laser, permitiu otimizar o acoplamento do feixe na fibra ótica, com aumento da potência ótica após a saída da fibra, conseguindo-se uma maior potência de incidência na amostra.

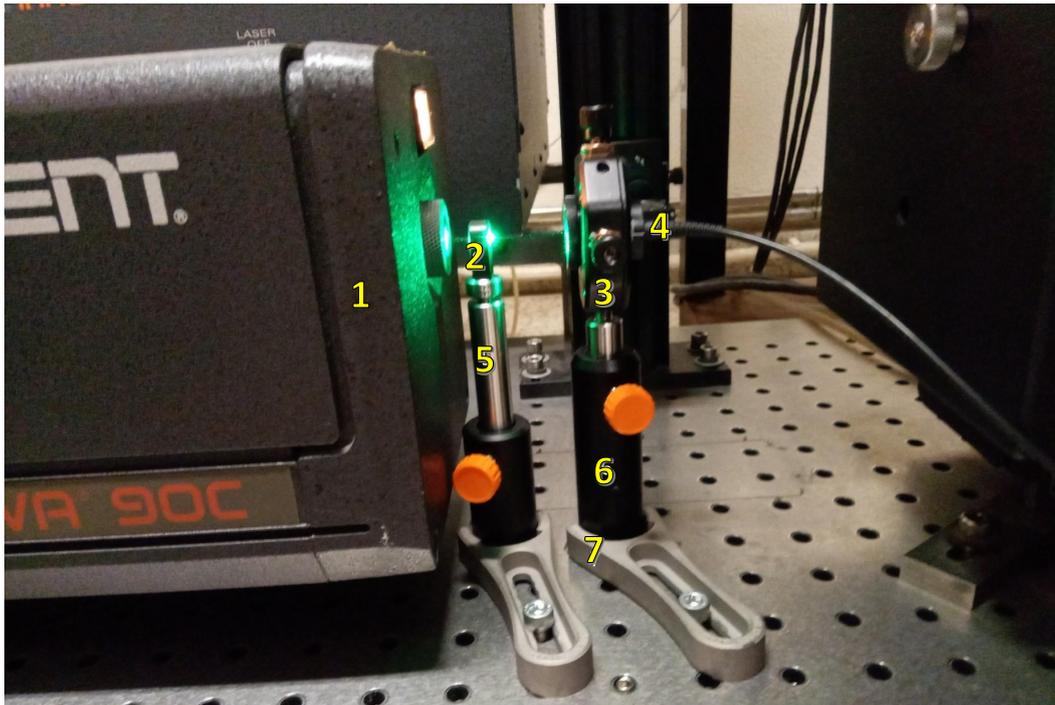


Figura 3.4: Montagem do acoplamento do feixe laser na fibra ótica, com utilização de postes. Legenda: 1- Laser Innova Coherent 90C; 2- Suporte de lente com lente plano-convexa ($f=30$ mm); 3- Suporte de fibra ótica; 4- Fibra ótica; 5- Poste de suporte; 6- Suporte de poste; 7- Garfo de fixação;

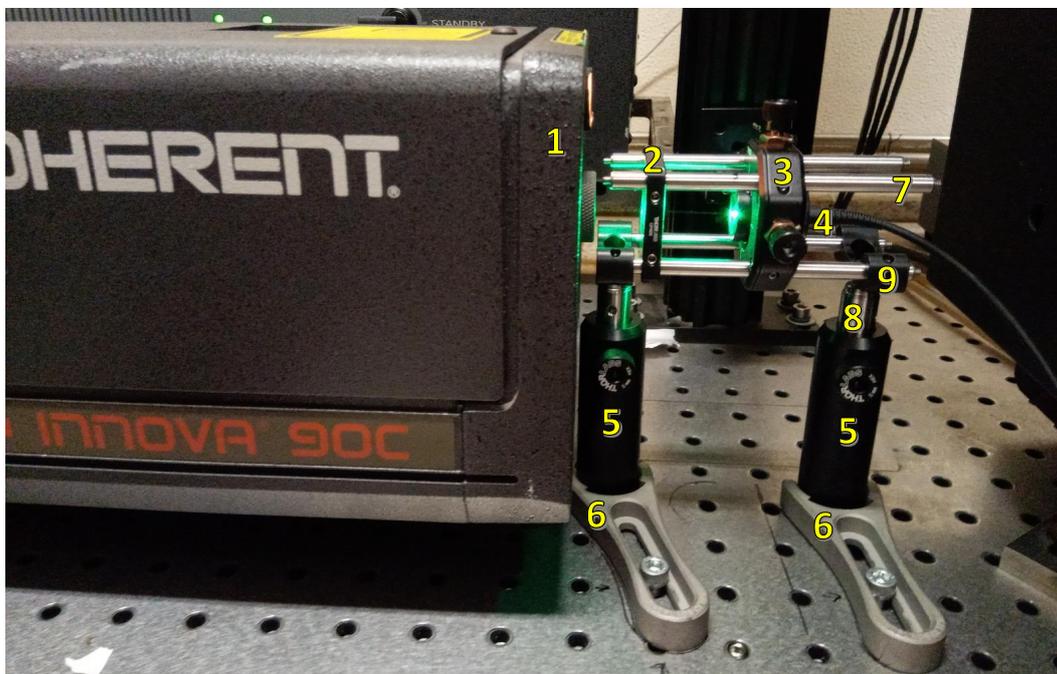


Figura 3.5: Montagem do acoplamento do feixe laser na fibra ótica, utilizando uma gaiola. Legenda: 1- Laser Innova Coherent 90C; 2- Suporte de lente com lente plano-convexa ($f=30$ mm); 3- Suporte de fibra ótica; 4- Fibra ótica; 5- Suporte de poste; 6- Garfo de fixação; 7- Vara da gaiola; 8- Poste de suporte; 9- Suporte de vara da gaiola;

3.2.2.3 Incidência na Amostra

Nesta parte da montagem tem-se a saída da fibra ótica, no respectivo suporte de fibra ótica, a iluminar a superfície plana da lente de colimação. Após a lente de colimação foi colocada a lente de focagem, seguida do filtro passa-banda e do suporte da amostra, com a amostra.

O feixe proveniente da fibra ótica é um feixe divergente, pelo que para se incidir homogeneamente, num ponto específico da amostra, é necessário que o feixe proveniente da fibra ótica seja colimado. Deste modo, numa primeira fase da montagem que permite excitar a amostra, foi necessário determinar a posição, relativa, da lente em relação à fibra ótica de modo a se conseguir obter um feixe colimado. Tendo em conta as dimensões do núcleo da fibra, de $50\mu\text{m}$, esta considerou-se como uma fonte pontual. A colimação de uma fonte pontual implica que esta seja colocada numa posição correspondente à distância focal da lente de modo a que se obtenha um feixe emergente, após a lente, constituído por um conjunto de raios paralelos, que constituem o feixe colimado. A colimação de um feixe proveniente de uma fonte pontual depende do diâmetro do feixe incidente na lente, pelo que depende da abertura numérica da fibra e da distância focal da lente utilizada para colimação. Feixes com um diâmetro de incidência, na lente, maiores manter-se-ão colimados ao longo de uma maior distância. Feixes de menor dimensão sofrerão maior divergência, com consequente diminuição da distância em que se consideram colimados.

Na montagem realizada, é observável a divergência do feixe a grandes distâncias, neste caso verificou-se a 2 m, no entanto mantém a sua colimação durante cerca de 50 cm. Sendo o espaço disponível, para manter o feixe colimado e fazer a sua focagem e filtragem de modo a incidir na amostra, de apenas 15 cm, o feixe mantém-se colimado, durante a distância necessária, para a geometria de aquisição de transmissão.

A radiação emergente da amostra sofre refração nesta, em consequência do índice de refração da amostra ser diferente da do meio de proveniência do feixe, pelo que o feixe é desviado. Este desvio pode ser, unicamente, vertical ou horizontal, mas pode ocorrer em ambas as direções pelo que tem que ser compensado antes de o feixe incidir na fenda de entrada do duplo monocromador.

A estrutura que antecede a entrada do duplo monocromador, apresenta um conjunto de óticas, num suporte, que permitem recolher e incidir o feixe, que contém radiação de Rayleigh e de Raman, proveniente da amostra na fenda de entrada. Este suporte, que apresenta um grau de liberdade, permite variar a posição horizontal, do conjunto de óticas, de modo a compensar o desvio existente nesta direção.

A compensação do desvio vertical, que possa existir, teve que ser obtida, numa primeira fase em que se utilizou as peças impressas em plástico, através da regulação da altura das duas peças que suportam a estrutura que contém as componentes que permitem a realização da geometria de transmissão. Com as peças fabricadas em alumínio, havendo possibilidade de ajuste da posição da gaiola, o desvio após a amostra é compensado utilizando os parafusos de ajuste da peça fabricada. A verificação da, correta, entrada do feixe no monocromador é obtida quando o feixe, após as compensações introduzidas, se encontra centralizado num alvo, para o qual é possível desviar o feixe através de um espelho, que permite ajustar a posição do feixe de entrada. Os sistemas referidos encontram-se nas Figuras 3.6, 3.7 e 3.8.

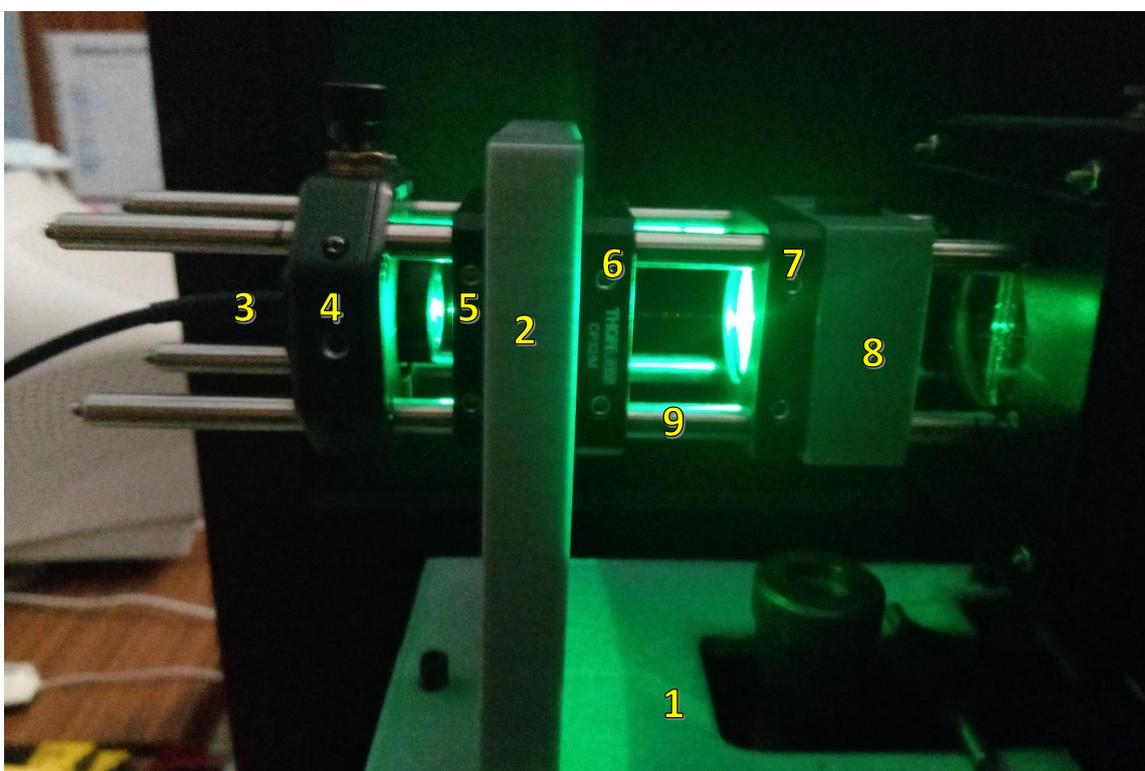


Figura 3.6: Sistema que permite a incidência do feixe laser na amostra, utilizando as peças de plásticos impressas em impressora 3D. Legenda: 1- Peça base de suporte; 2- Peça de suporte da gaiola; 3- Fibra ótica; 4- Suporte de fibra ótica; 5- Suporte de lente com lente plano-convexa ($f=10$ mm); 6- Suporte de lente com lente plano-convexa ($f=50$ mm); 7- Suporte de filtro e filtro passa-banda; 8- Suporte de amostra com amostra; 9- Vara de gaiola;

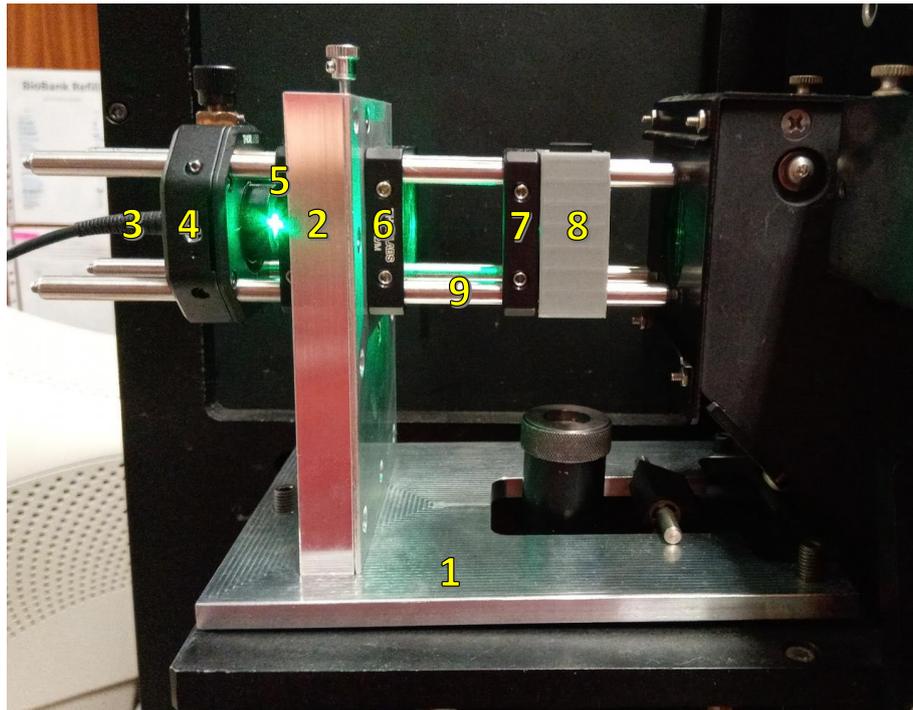


Figura 3.7: Sistema que permite a incidência do feixe laser na amostra, utilizando as peças fabricadas em alumínio. Legenda: 1- Peça base de suporte; 2- Peça de suporte da gaiola com ajuste x e y; 3- Fibra ótica; 4- Suporte de fibra ótica; 5- Suporte de lente com lente plano-convexa ($f=10$ mm); 6- Suporte de lente com lente plano-convexa ($f=50$ mm); 7- Suporte de filtro e filtro passa-banda; 8- Suporte de amostra com amostra; 9- Vara de gaiola;

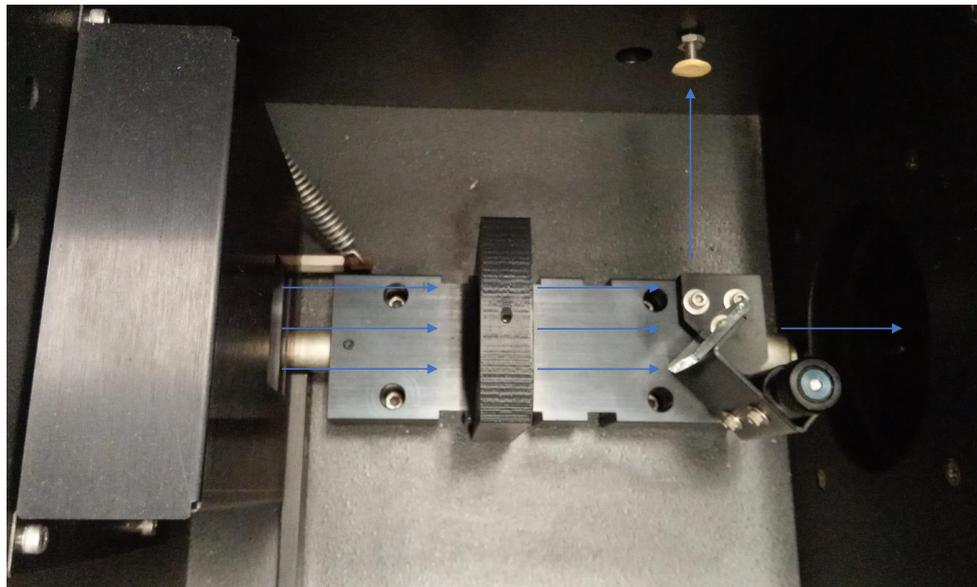


Figura 3.8: Sistema que permite a incidência do feixe, após a amostra, na entrada do duplo monocromador. As setas indicam o caminho percorrido pela radiação, desde o sistema de recolha do feixe até à fenda de entrada ou o espelho, quando colocado em frente da fenda de entrada, e conseqüentemente para o alvo. No percurso, a radiação é filtrada pelo filtro colocado no suporte de plástico (a preto).

3.3 Detecção do Sinal Raman

3.3.1 Pré-Processamento de Sinal

Os espectros adquiridos pelo espectrómetro SPEX 1403, apesar do software original apresentar algumas funções de processamento de sinal, são sujeitos a um processamento utilizando funções desenvolvidas pelos utilizadores do espectrómetro, não se fazendo uso das existentes no software original.

Desse tratamento de dados realizado sobre os espectros adquiridos destacam-se a subtração do sinal de fundo ao espectro e suavização do sinal.

3.3.1.1 Subtração do Sinal de Fundo

No software original, uma das opções possíveis é retirar o sinal existente no espectro devido à corrente do escuro, característica do detetor. No entanto, no espectro existe ainda sinal proveniente do meio onde se encontra o instrumento a realizar a aquisição. Este sinal, designado de sinal de fundo, é aquele que é subtraído pelo utilizador. Das abordagens para a subtração deste sinal, estabelecendo-se uma base de referência para o sinal de Raman obtido, destacam-se as seguintes:

1. Ajuste Polinomial: Neste método utiliza-se uma função que recebe como parâmetros de entrada o sinal, o número de pontos que se pretende ajustar, em ambos os extremos do intervalo, e o grau do polinómio que se pretende ajustar. A função permite então obter o número de pontos indicados, em cada extremo do intervalo, e fazer o ajuste polinomial com o grau introduzido. Por sua vez, efetua a subtração do sinal de fundo, a que foi ajustado o polinómio, e devolve o sinal final, resultante da subtração do sinal de fundo, e o sinal de fundo retirado. Este método é utilizado quando existe uma linha de base, ao longo de todo o espectro adquirido, que permita efetuar o ajuste corretamente.
2. Média do sinal de fundo: Este método é utilizado para se realizar o processamento do sinal de fundo quando o sinal que se pretende analisar se encontra rodeado por outras bandas próximas, não permitindo que se obtenha uma base do sinal de fundo suficiente para se utilizar o método anterior. Neste, faz-se uma média aos pontos referentes ao sinal de fundo, na zona onde é possível obter uma amostra significativa deste sinal, e procede-se à subtração do valor obtido a todos os valores do intervalo do espectro a analisar.

O sinal de fundo não afeta de igual modo cada ponto adquirido, pelo que os métodos utilizados não retiram na sua totalidade o sinal de fundo existente no espectro.

3.3.1.2 Filtro de Suavização do Sinal Raman

No espectro final, para além do sinal de fundo, existe ruído associado à deteção de radiação e eletrónica do detetor. Dependendo da intensidade do sinal da amostra, que depende do tempo de exposição do detetor à radiação incidente, este ruído pode afetar o sinal adquirido. Também o sinal de fundo pode não ser totalmente minimizado pela conjugação da largura das fendas e após o processamento do sinal, descrito na secção anterior. A consequência é que, esta conjugação de sinal de fundo e ruído, vai afetar o perfil das bandas constituintes do espectro. O desfasamento entre o perfil obtido, para as diferentes bandas do espectro, devido ao ruído, e aquele que seria obtido caso este não alterasse o perfil, é corrigido através de uma função que executa uma filtragem aos dados, suavizando o perfil das bandas espectrais.

Esta função permite, como dados de entrada, os valores das contagens em cada ponto adquirido e o grau de suavização que se pretende. Sobre estes dados executa uma interpolação, seguido da suavização do espectro. A suavização dos dados é tanto maior quanto maior o grau indicado, sendo este escolhido de modo a não se filtrar mais sinal do que o necessário, mantendo a informação do sinal de Raman intacta. Finalmente, a função devolve o espectro suavizado.

3.3.2 Caracterização da Resolução com Fotomultiplicador

3.3.2.1 Determinação da Resolução do Espectrómetro

No capítulo 2, fez-se uma breve discussão relativamente aos parâmetros que depende a resolução de um espectrómetro. Empiricamente, a resolução do espectrómetro pode ser determinada através da Full Width Half Maximum (FWHM), designada largura a meia altura. Num espectro, em que existam bandas espectrais, a largura a meia altura é obtida pela diferença entre os dois valores, no eixo das abcissas da representação da banda, correspondentes a metade do valor máximo, da banda, no eixo das ordenadas do gráfico da banda espectral.

De acordo com a discussão do capítulo 2, a resolução do espectrómetro depende da largura da fenda de entrada e, no caso de um detetor monocanal, da largura da fenda de saída. Deste modo, para calcular a resolução do espectrómetro, com o detetor monocanal, fixou-se as fendas centrais, que permitem filtrar a luz indesejada que passa do primeiro monocromador para o segundo, nos $700\ \mu\text{m}$ e fez-se variar, simultaneamente, as fendas de entrada e de saída para os valores de $16\ \mu\text{m}$, $18\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m}$, $22\ \mu\text{m}$, $30\ \mu\text{m}$, $40\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m}$, $60\ \mu\text{m}$, $70\ \mu\text{m}$ e $80\ \mu\text{m}$.

A determinação da resolução de um espectrómetro pode ser realizada utilizando uma linha espectral, bem conhecida, de uma lâmpada espectral. Para determinar a resolução do SPEX 1403, com um fotomultiplicador, determinou-se a largura a meia altura da linha espectral correspondente a 579,1 nm, de uma lâmpada de mercúrio.

A cada posição das fendas de entrada e saída foram realizadas três aquisições, com um incremento ponto-a-ponto de $0,5 \text{ cm}^{-1}$ e um tempo de integração de 2s, da banda a 579,1 nm, às quais se realizou um processamento de sinal ajustando um polinómio de grau 0 ao sinal de fundo, de acordo com a Secção 3.3.1.1. Também se efetuou uma normalização ao dados, dividindo cada ponto do espectro pelo máximo da linha espectral a 579,1 nm, seguindo-se uma interpolação de modo a determinar a largura a meia altura da linha espectral em cada aquisição.

3.3.2.2 Otimização da Resolução Espectral de Aquisição

Dependendo do tipo de amostra que se pretende analisar, obtendo o espectro de Raman, as bandas espectrais obtidas podem apresentar um perfil Gaussiano, no caso dos sólidos, ou um perfil Lorentziano, no caso dos gases. Quando a amostra a analisar é um líquido, as bandas obtidas apresentam um perfil que é uma junção dos dois perfis anteriores. Neste último caso, a banda espectral pode ser aproximada por uma função Voigt, que corresponde à convolução de uma função gaussiana com uma função lorentziana, ou por uma função designada pseudo-Voigt, que é uma função resultante da soma pesada de uma função gaussiana com uma função lorentziana, cujo peso de cada função corresponde à quantidade de cada perfil, individual, para o perfil final da banda.

Para se conseguir observar bandas espectrais utilizou-se, como amostra, o ciclo-hexano que apresenta bandas espectrais de Raman de grande intensidade. A otimização da resolução espectral concentrou-se nas bandas do espectro de Raman do ciclo-hexano correspondentes a $801,3 \Delta\text{cm}^{-1}$ e $2852,9 \Delta\text{cm}^{-1}$, como se mostra na Figura 3.9. Para cada posição das fendas fizeram-se três aquisições com um tempo de integração de 5 segundos e um incremento, entre cada ponto do espectro adquirido, igual a $0,5 \Delta\text{cm}^{-1}$. O intervalo de aquisição para a primeira banda foi de $775 \Delta\text{cm}^{-1}$ a $820 \Delta\text{cm}^{-1}$ e para a banda de $2852,9 \Delta\text{cm}^{-1}$ fez-se as aquisições no intervalo de $2785 \Delta\text{cm}^{-1}$ a $2880 \Delta\text{cm}^{-1}$.

Os espectros adquiridos, referentes às bandas enumeradas, necessitaram de processamento de sinal de modo a se conseguir determinar o valor da largura a meia altura de cada banda, de acordo com a secção 3.3.1. O facto de, no caso da banda de $2852,9 \Delta\text{cm}^{-1}$, haver zonas do espectro que apresentam uma sobreposição entre diferentes bandas implicou que o tratamento dos dados obtidos não fosse igual para ambas as bandas adquiridas. A grande diferença neste tratamento consiste no modo como se retirou o espectro relativo ao sinal de fundo.

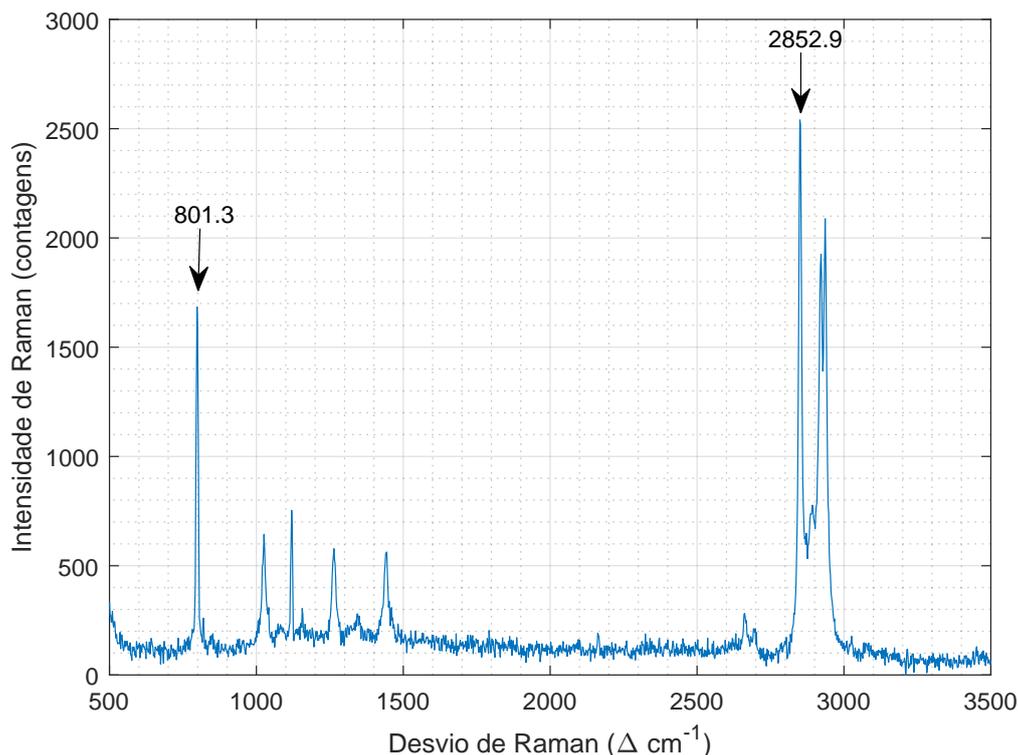


Figura 3.9: Espectro de Raman do ciclo-hexano, obtido em configuração de transmissão. As setas indicam as bandas de interesse para a caracterização da resolução.

O tratamento do sinal de fundo na banda de $801,3 \Delta \text{cm}^{-1}$ consistiu na utilização de pontos adquiridos nos extremos do intervalo de aquisição de modo a se ter uma referência do sinal de fundo. A esses pontos foi ajustado um polinómio de grau 0, de modo a se estabelecer uma base de referência, para o espectro obtido, que consiste no sinal de fundo. Por sua vez, ao sinal de Raman da banda obtida foi retirado o sinal de fundo resultante do ajuste polinomial, de modo a se ter o sinal de Raman sem sinal de fundo. Na banda de $2852,9 \Delta \text{cm}^{-1}$ a retirada do sinal de fundo ao espectro obtido não seguiu o procedimento anterior, pois, sendo esta banda seguida de duas outras bandas, bastante pronunciadas, o procedimento anterior seria inválido. Neste caso, fez-se uma maior aquisição de dados numa zona do espectro, perto desta banda de interesse, onde o sinal de fundo fosse predominante. Seleccionada a zona de maior predominância de sinal de fundo, fez-se uma média aos valores adquiridos nesta zona, cujo valor foi retirado ao restante espectro da banda adquirida.

Sendo a única diferença, na otimização da resolução do sistema, o tratamento do fundo da aquisição do sinal, o restante tratamento, até à obtenção da variação da resolução com a fenda, foi igual para ambas as bandas. Tendo-se ficado com o espectro, com o sinal de fundo removido, das bandas indicadas fez-se uma normalização aos dados. A normalização realizada permite que se obtenham valores da largura a meia altura, de cada aquisição da respetiva banda, que podem ser comparáveis. Neste caso, a normalização

consistiu na divisão de todos os dados, que constituem cada uma das bandas adquiridas, pelo valor máximo da respetiva banda, obtendo-se um espectro cuja intensidade varia de 0 a 1. Para além desta manipulação dos dados, também se efetuou uma suavização do perfil da banda, através da aplicação de um filtro aos dados. Sendo o espectro um conjunto de pontos que apresentam um intervalo entre si, foi necessário realizar extrapolação de dados de modo a se conseguir obter os valores da banda adquirida que permitiram determinar a largura a meia altura. O cálculo da largura a meia altura consistiu na determinação das coordenadas dos dois pontos em que se tem metade do valor de contagens do máximo da banda, linha a vermelho nos gráficos das Figuras 4.2 e 4.3, e realizar a subtração da posição, em Desvio de Raman, destes pontos.

3.3.3 Aquisição de Sinal com Detetor Multicanal

Um dos objetivos deste projeto era o de acrescentar um detetor CCD, termoelectricamente arrefecido, de modo a se adicionar as vantagens de aquisição multicanal ao SPEX 1403. No entanto, não sendo possível adquirir um CCD em tempo útil, foi utilizada uma câmara CMOS, *Guppy F-036B*, da Allied Vision, para efetuar esta parte do projeto.

Na configuração original, o SPEX apresenta um espelho que foca a radiação para o fotomultiplicador. Antes da radiação incidir no fotomultiplicador, existe uma fenda que permite selecionar os comprimentos de onda que incidem no fotomultiplicador diminuindo a área que é iluminada. Utilizando um detetor multicanal, não há necessidade de se ter uma fenda de saída antes do detetor, como explicado no Capítulo 2. Para se conseguir obter uma região espectral considerável no detetor é necessário que as fendas intermédias do espectrómetro, que com o fotomultiplicador serviam para controlar a quantidade de radiação que passava do primeiro para o segundo monocromador, estejam totalmente abertas de modo a se iluminar toda a área fotossensível da câmara, dado que é, agora, esta fenda que controla a quantidade de radiação que incide no detetor. Tendo em conta que se queria ter ambos os detetores, foi necessário desviar o feixe de modo a incidir na câmara *Guppy F-036B*, para tal utilizou-se um espelho plano, de 50 mm de diâmetro, numa posição que permitisse centrar o feixe desviado no chip da *Guppy F-036B*. A colocação do espelho na posição correta foi realizada utilizando o laser Innova Coherent 90C, em que se fez incidir o laser na entrada do SPEX 1403, e se verificou, iterativamente, qual a posição do espelho que permitia que o feixe estivesse centrado no espelho e, simultaneamente, na saída para o CCD após o desvio. De seguida, ajustou-se a posição da câmara *Guppy F-036B*, de modo a que a posição desta coincidissem com o centro da saída para CCD, permitindo centrar o feixe desviado no chip de aquisição.

A aquisição de espectros utilizando a câmara *Guppy F-036B* implicou a utilização de um método designado por Empilhamento de Imagens (*Image Stacking*). O empilhamento de

imagens é um método que permite melhorar a sensibilidade de aquisição da câmara através da formação de uma única imagem resultante da média de várias imagens adquiridas. Em cada imagem adquirida, cada pixel pode conter informação relativo ao sinal, ao ruído ou ambos, pelo que efetuando a aquisição de várias imagens e produzindo uma única imagem média, reduz-se o ruído aleatório e mantém-se o sinal de interesse. O resultado de empilhamento de imagens é uma única imagem com uma relação sinal ruído melhorada, em que se consegue detetar o sinal pretendido. Com este método pretendia-se melhorar a sensibilidade da *Guppy F-036B*.

3.4 Espectroscopia de Raman de Ressonância de Transmissão

No Capítulo 2 discutiu-se o processo de dispersão de Raman, e como a geometria de transmissão permite o aumento da intensidade do sinal de Raman, bem como a união desta geometria com a técnica de ressonância. Nesta secção descreve-se a aplicação da técnica de espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão.

3.4.1 Preparação de Soluções de Diferentes Concentrações de β -Caroteno

O β -caroteno apresenta transições de absorção na zona do visível, apresentando um máximo de absorção a 451 nm e um segundo máximo de absorção a 477 nm. A fonte de excitação apresenta um comprimento de excitação de 514,5 nm, que é um comprimento que se encontra na zona de absorção do β -caroteno, obedecendo-se à condição de ressonância com conseqüente presença do efeito de ressonância no espectro.

A validação da configuração de transmissão consistiu na obtenção de uma curva de calibração por efeito de Raman de ressonância e respetiva quantificação de concentração de duas amostras problema. Para tal, procedeu-se à aquisição de espectros de Raman de soluções de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano. Esta validação teve por base a reprodutibilidade do comportamento observado em [15], para a variação da intensidade do sinal de Raman com a concentração de β -caroteno, em condições de ressonância. Com esse objetivo, numa primeira fase, gerou-se uma curva de calibração e, numa segunda etapa, determinou-se a concentração, de duas soluções de validação, utilizando o ajuste resultante da curva de calibração e comparou-se com a concentração com que, estas duas soluções, foram preparadas.

A determinação da curva de calibração implicou que tivesse sido necessário preparar cinco soluções, de diferentes concentrações, de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano. Para tal, preparou-se uma solução de maior concentração, a solução mãe, de 0,08 mg mL^{-1} de

β -caroteno, e efetuou-se a diluição desta de modo a preparar as quatro soluções restantes, ficando-se assim com cinco soluções com concentrações de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano.

A solução de maior concentração foi preparada, de modo a se obter uma concentração de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$, medindo 4 mg de β -caroteno, na balança AS 220.R2 PLUS Analytical Balance, da RADWAG, que foram diluídos em ciclo-hexano, num balão volumétrico de $50,00 \pm 0,06 \text{ mL}$.

Tendo em conta a Equação (3.5) foi possível calcular as quantidades de volume, da solução mãe, necessárias para se obter as concentrações desejadas.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (3.5)$$

Nesta, tem-se os seguintes parâmetros:

1. C_i : Concentração da solução inicial;
2. C_f : Concentração da solução final;
3. V_i : Volume necessário da solução inicial;
4. V_f : Volume da solução final;

Tendo em conta que se pretendeu preparar 4 soluções, em balões volumétricos de $10,000 \pm 0,025 \text{ mL}$, de $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,04 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, foram necessários medir, com recurso a uma pipeta volumétrica de 10 mL, volumes de 7,5 mL, 5 mL, 2,5 mL e 1,25 mL, respetivamente, da solução inicial de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$, completando os 10 mL com ciclo-hexano. A preparação das soluções de validação, de $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, também seguiu o procedimento descrito, mas utilizando 8,75 mL e 6,25 mL, respetivamente, da solução mãe de $0,08 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.4.2 Obtenção da Curva de Calibração e Quantificação de Concentração de Amostras Problema

As aquisições de todas as soluções foram realizadas com a mesma fonte de excitação com uma potência ótica de 100 mW. Após as aquisições, foi necessário processar o sinal para se obter a curva de calibração. O processamento de sinal consistiu na retirada da linha de base, referente ao sinal de fundo, por ajuste polinomial de grau 1, de acordo com o descrito na secção 3.3.1.1. Também se procedeu a uma normalização dos espectros à banda de $1263 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ do ciclo-hexano, que permaneceu invariante em todas as aquisições.

Após o processamento de sinal, os resultados necessários, para produzir a reta de calibração, foram obtidos pela integração da área e determinação do máximo das bandas, de β -caroteno, de interesse, sendo essas as bandas existentes nos $1154 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ e $1519 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$. Tendo em conta que se tem β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano, também se efetuou o mesmo processo para uma amostra de ciclo-hexano, efetuando-se a integração e determinação do máximo de intensidade na zona referente ao espectro de Raman do β -caroteno.

3.5 Nova Interface do Utilizador

Um dos objetivos estabelecidos para o projeto era o de desenvolver uma interface de utilizador, de fácil utilização, que permitisse controlar o SPEX 1403 e que funcionasse em sistemas operativos atuais. O cumprimento deste objetivo estava dependente de se conseguir obter informação sobre os comandos que permitem controlar os motores das redes de difração, de se conseguir controlar o fotomultiplicador sem recurso ao software original e se conseguir adquirir um CCD para se adicionar aquisição multicanal ao SPEX 1403. Não se tendo conseguido ultrapassar o software original, de modo a se controlar a aquisição do sinal com o fotomultiplicador, nem se ter adquirido o CCD, a interface foi desenvolvida de modo a se controlar a câmara *Guppy F-036B*. Ainda assim, tendo em conta que foi possível determinar a sequência de comandos a utilizar para adquirir espectros com fotomultiplicador, também se acrescentou na interface métodos que permitem efetuar o varrimento efetuado pelo SPEX 1403.

3.5.1 Descrição das Características da Interface Desenvolvida

A interface foi desenvolvida em MATLAB®, no App Designer (MATLAB 2020b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). A interface desenvolvida, cuja descrição mais detalhada se encontra no Apêndice F, inicia o seu funcionamento efetuando um *Handshake* com o controlador. Após terminar o *Handshake* é disponibilizada, ao utilizador, a janela que permite executar as funções pretendidas.

Na janela da interface são apresentados, na barra de menus, os menus *Ficheiro*, *Aquisição* e *Espectro*, bem como o local onde serão apresentados os espectros ao utilizador. A interface tem uma apresentação que consiste na abertura de novas janelas para efetuar diferentes ações na interface.

As principais funções, acessíveis pelos menus, que constituem a interface são:

1. **Guardar Ficheiro:** Após iniciar o seu funcionamento, a única opção possível é a de criar e guardar o ficheiro na localização pretendida, de modo a se poder efetuar uma aquisição. Também em cada nova aquisição há a possibilidade de criar novo ficheiro ou substituir os dados do ficheiro criado.
2. **Escolher os Parâmetros de Aquisição e Iniciar a Aquisição:** A interface permite escolher o tipo de aquisição que se pretende efetuar, monocanal ou multicanal, e os parâmetros constituintes de cada modo de aquisição. Após a seleção do método de aquisição, e dos respetivos parâmetros, é criado um ficheiro que guarda os parâmetros da aquisição e só está acessível a opção de iniciar a aquisição referente ao método escolhido. No fim da aquisição os dados são gravados no ficheiro inicialmente criado.
3. **Manipulação do Gráfico:** Os dados são apresentados, sob a forma de gráfico, na janela principal da interface. A este gráfico é possível efetuar alterações da escala do eixo das ordenadas, acrescentar títulos aos eixos e ao gráfico, adicionar uma grelha, fazer zoom no gráfico, deslocar os dados bem como selecionar um ponto constituinte do gráfico.

O ponto principal da interface é o de mostrar ao utilizador o resultado da aquisição efetuada com o detetor escolhido. No entanto, apesar de os controlos utilizados para controlar as redes de difração serem comuns a ambos os métodos de aquisição, pelas condicionantes já referidas, só foi possível apresentar gráficos referentes à aquisição com deteção multicanal. Na aquisição com fotomultiplicador, a interface está habilitada a efetuar o movimento necessário para corresponder ao varrimento original do SPEX, de acordo com o explicado no capítulo 2 para a aquisição monocanal, excluindo o processo de aquisição do sinal do fotomultiplicador. Relativamente ao método de deteção com detetor multicanal, e tendo em conta os métodos explicados no Capítulo 2, escolheu-se o método de aquisição segmentada para efetuar a aquisição de um espectro. De acordo com este tipo de aquisição, tem-se um intervalo espectral para cada posição do monocromador.

No desenvolvimento da interface decidiu-se estabelecer um incremento fixo entre as diferentes posições do monocromador e, devido a baixa sensibilidade da câmara, foi necessário depender o primeiro posicionamento do monocromador da posição inicial indicada pelo utilizador. A interface permite ao utilizador escolher a posição final e inicial

do espectro a adquirir fixando um intervalo espectral, assim, de acordo com o incremento entre cada posição do monocromador, é calculado o número de segmentos a adquirir de modo a que a janela espectral total adquirida contenha o intervalo espectral definido pelo utilizador.

A aquisição com a câmara *Guppy F-036B* necessitou que se tivesse que utilizar empilhamento de imagens. Por consequência, a interface adquire cada segmento como resultado do binning do empilhamento de um número de imagens escolhido pelo utilizador. No fim da aquisição é apresentado ao utilizador o espectro total adquirido, resultante da soma dos diferentes segmentos que representam diferentes intervalos espectrais.

Ao longo da aquisição, tanto com detetor monocanal como multicanal, é apresentada a posição do monocromador, como informação, e ainda um botão que permite terminar imediatamente a aquisição o que permite ao utilizador aceder, novamente, aos menus que ficam bloqueados durante a aquisição.

3.5.2 Calibração da Representação Gráfica de Espectros

Sendo um dos objetivos da interface apresentar ao utilizador o espectro referente à amostra que se está a analisar, é necessário que esta apresente o espectro com as unidades corretas e com a conversão correta entre o comprimento de onda, adquirido, e a respetiva unidade em que se pretende apresentar o espectro ao utilizador.

Quando se utiliza um detetor multicanal, na sua área fotossensível vão incidir diferentes comprimentos de onda, simultaneamente, pertencentes a um determinado intervalo espectral. Tal significa que, ao serem adquiridos vários comprimentos de onda pelo detetor, é necessário efetuar uma conversão entre o pixel onde se localiza a radiação incidente e o comprimento de onda dessa radiação, de modo a se apresentar um espectro ao utilizador em que se tenha uma correspondência correta entre cada ponto do espectro e a unidade, *Desvio de Raman* ou *Número de Onda*, em que se pretende apresentar o espectro.

A correspondência descrita é obtida através de uma calibração, que seria efetuada utilizando as linhas espectrais de uma lâmpada de mercúrio. Tendo em conta o método que se escolheu para a aquisição de espectros com detetor multicanal, a aquisição segmentada descrita na Secção 2.6.2.2, a calibração consiste no posicionamento do monocromador em diferentes posições, e para cada posição fazer a aquisição das linhas espectrais, da lâmpada de mercúrio, presentes nessa janela espectral. Por sua vez, para cada intervalo, dever-se-ia de fazer a correspondência entre as linhas espectrais observadas em cada janela de aquisição e as linhas espectrais obtidas utilizando o fotomultiplicador. A essa correspondência seria ajustado um polinómio, cuja equação permitiria converter os valores de pixel em comprimento de onda, e finalmente na unidade de aquisição pretendida.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Caracterização da Resolução Espectral

No capítulo anterior, na secção 3.3.2, descreveu-se o método de aquisição e tratamento dos dados adquiridos que permitiram determinar e otimizar a resolução do espectrómetro utilizado. Nesta secção serão apresentados os resultados, e a respetiva discussão, relativamente à determinação, e respetiva otimização, da resolução do sistema.

4.1.1 Resolução Espectral do SPEX 1403

O método descrito na secção 3.3.2.1, permitiu obter a resolução do espectrómetro através do cálculo da largura a meia altura da linha espectral a 579,1 nm da lâmpada de mercúrio. O resultado da variação da largura a meia altura com a variação da fenda é apresentado na Figura 4.1 e na Tabela 4.1.

Pelo gráfico apresentado verifica-se que, para os valores das fendas de entrada e saída em que a linha espectral se apresenta resolvida, a largura a meia altura da linha espectral apresenta uma tendência de se manter dentro de um intervalo de valores entre os $0,9 \Delta cm^{-1}$ e $1,5 \Delta cm^{-1}$, o que corresponde ao intervalo de 0,03 nm a 0,05 nm. Tal tendência indica que a resolução do espectrómetro se encontra neste intervalo de valores.

As barras de erro, presentes na Figura 4.1, permitem verificar que para valores de fenda menores há uma maior incerteza associada comparativamente aos valores de *FWHM* para maior largura das fendas. Tal se deve ao facto de, para uma menor largura das fendas de entrada e saída, se estar perto do limite inferior para a linha espectral se apresentar resolvida relativamente a linhas espectrais que se encontrem próximas, ao sinal de fundo e ao ruído. Já para maior largura da fenda de entrada e saída, a linha espectral apresenta-se distinguível do sinal de fundo e do ruído, e de linhas espectrais próximas, encontrando-se bem resolvida sendo menor a incerteza associada a cada medida da largura a meia altura.

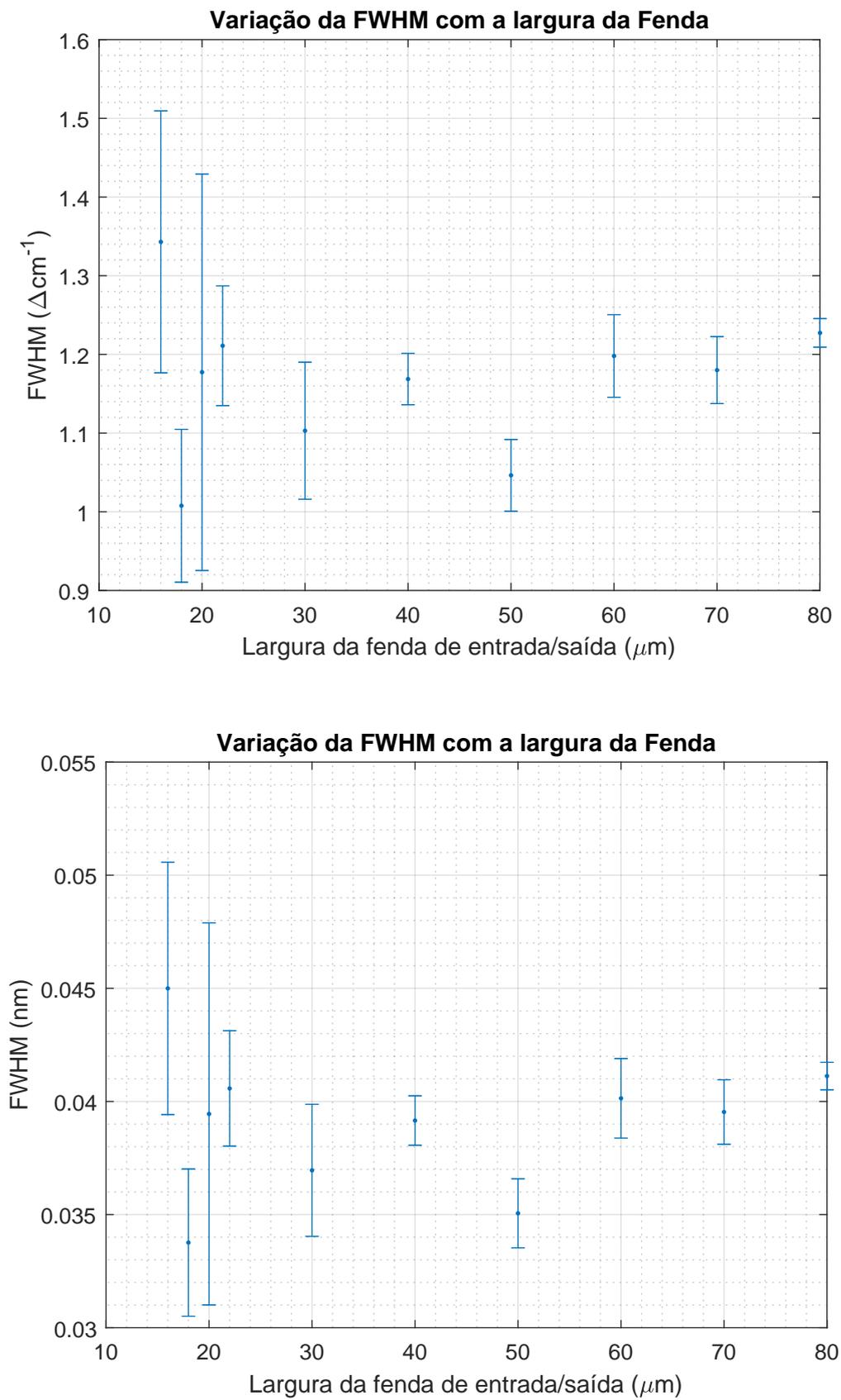


Figura 4.1: Variação da largura a meia altura com a largura das fendas de entrada e saída para a linha espectral a 579,1 nm da lâmpada de mercúrio.

A resolução do espectrómetro SPEX 1403, tendo em conta o discutido, é então considerada como o valor médio das medidas de largura a meia altura efetuadas, sendo esse valor igual a $1,2 \pm 0,1 \Delta cm^{-1}$, ou de $0,039 \pm 0,003$ nm. Tal significa que só bandas cuja distância entre elas seja superior a este valor serão distinguíveis com este espectrómetro.

Tabela 4.1: Tabela com os valores, médios, da largura a meia altura da linha espectral a 579,1 nm, da lâmpada de mercúrio, para cada valor das fendas de entrada e saída. Cada valor é resultante da média de três aquisições.

Largura da Fenda de Entrada\Saída (μm)	Largura a Meia Altura (FWHM) da Banda a 579,1 nm (Δcm^{-1})
16	$1,34 \pm 0,17$
18	$1,07 \pm 0,10$
20	$1,18 \pm 0,25$
22	$1,21 \pm 0,08$
30	$1,10 \pm 0,09$
40	$1,17 \pm 0,03$
50	$1,05 \pm 0,04$
60	$1,20 \pm 0,05$
70	$1,18 \pm 0,04$
80	$1,23 \pm 0,02$

4.1.2 Resolução Otimizada do SPEX 1403

De acordo com os métodos descritos para a otimização da resolução do instrumento, obteve-se um conjunto de dados relativos a cada banda. Um exemplo do resultado obtido após o tratamento dos dados, de acordo com o processo descrito, em 3.3.2.2, é o das Figuras 4.2 e 4.3.

As aquisições realizadas, após o tratamento de dados realizado, permitiram obter a curva de variação da FWHM com a abertura das fendas para cada banda, como se representa nas Figuras 4.4 e 4.5. Nestas apresentam-se as curvas em que a FWHM é apresentada com unidades de Δcm^{-1} , no Apêndice D são apresentados as tabelas referentes a estes dados bem como os gráficos com as unidades da FWHM em nanometros.

Pelos gráficos é possível verificar que a variação da largura a meia altura, para ambas as bandas, apresenta uma variação semelhante. Tem-se um conjunto de valores decrescentes até um valor mínimo seguindo-se uma zona de crescimento da largura a meia altura com a largura da fenda.

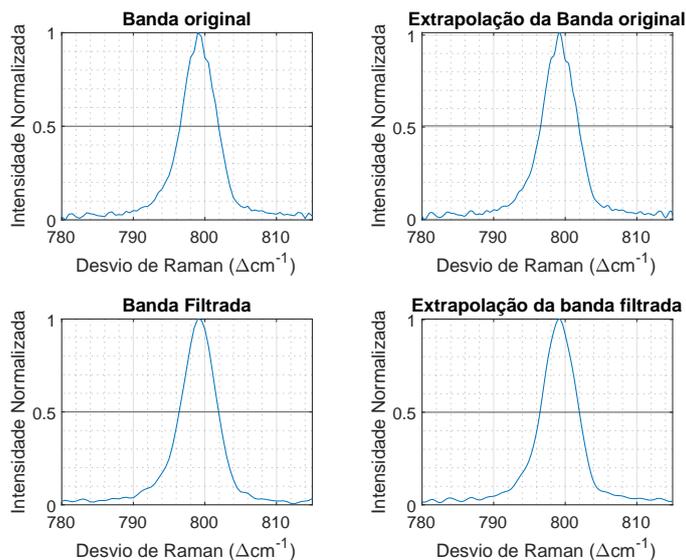


Figura 4.2: Banda a $801,3 \Delta cm^{-1}$ do espectro de Raman do ciclo-hexano obtido com as fendas de entrada e de saída com uma largura de $400 \mu m$.

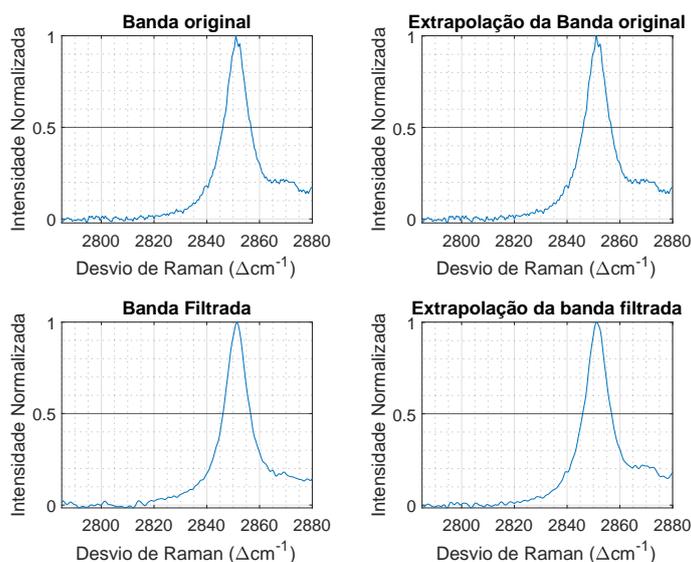


Figura 4.3: Banda a $2852,9 \Delta cm^{-1}$ do espectro de Raman do ciclo-hexano obtido com as fendas de entrada e de saída com uma largura de $400 \mu m$.

A comparação entre as curvas, para a banda de $801,3 \Delta cm^{-1}$, sugere que os dados obtidos não são substancialmente afetados de ruído, o que não acontece na banda de $2852,9 \Delta cm^{-1}$. Nesta última, é observável que há uma oscilação, em ambos os gráficos, da largura a meia altura após o valor mínimo. Também se percebe que, comparando os gráficos da Figura 4.5, que antes de se fazer a suavização dos perfil da banda adquirida, se tem o valor mínimo, para a FWHM, para uma abertura da fenda correspondente a $80 \mu m$ ao contrário

do que acontece nos dados após filtração, em que o mínimo ocorre a $200 \mu\text{m}$ de abertura da fenda. Tal sugere que, nesta banda, o sinal de fundo e o ruído presentes alteraram o perfil da banda e que a reconstrução obtida com a filtragem dos dados permitiu restaurar o perfil desta, de acordo com o que seria suposto obter, como se pode comprovar pelo facto de se conseguir obter uma curva, gráfico inferior da Figura 4.5, com um mínimo bem definido como nos gráficos da Figura 4.4.

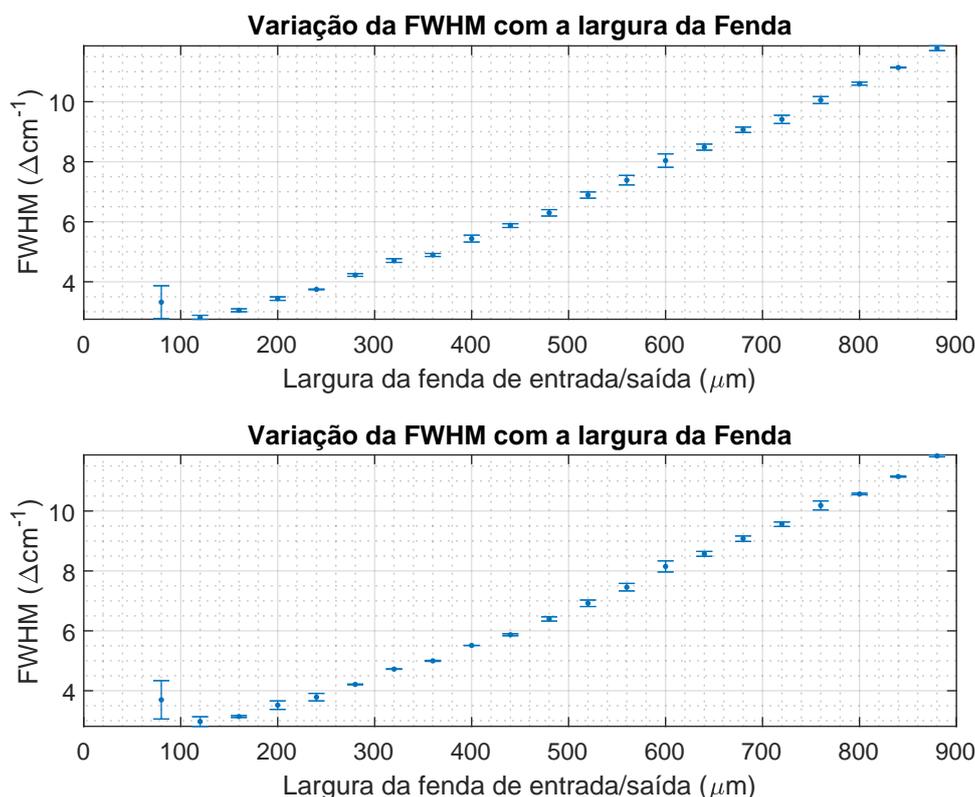


Figura 4.4: Curva da variação da FWHM com a abertura da fenda para a banda de $801,3 \Delta\text{cm}^{-1}$ do ciclo-hexano, com dados sem suavização do sinal (superior) e com suavização do sinal com o método descrito em 3.3.1.2 (inferior).

No entanto, o facto de se suavizar e reconstruir o perfil da banda, em que há interferência de ruído na representação da banda, provoca um aumento do erro associado a cada medida devido ao facto da deformação existente não se apresentar de igual maneira em todas as aquisições.

Os erros nas medidas referentes à banda de $801,3 \Delta\text{cm}^{-1}$ são menores, quando comparados com os obtidas para a banda de $2852,9 \Delta\text{cm}^{-1}$, pelo que o intervalo de variação do valor medido para a FWHM é menor, situando-se a variação na sua maioria nas centésimas de Δcm^{-1} , ao contrário do que acontece na banda de $2852,9 \Delta\text{cm}^{-1}$, em que a incerteza no valor medido ocorre nas décimas de Δcm^{-1} , consequência da interferência do ruído.

Comparando o erro de cada medida realizada, para a mesma banda, verifica-se que as

medidas de FWHM obtidas para menor largura de fenda de entrada e de fenda de saída apresentam um maior erro na medida efetuada, o que indica que o sinal adquirido pelo detetor é bastante afetado de ruído. Tal está de acordo com o esperado, tendo em conta que o sinal de Raman é pouco intenso, logo, sendo introduzido pouco sinal no monocromador, este é sobreposto por ruído. Deste modo, apesar de se verificar um maior intervalo de variação para os valores de FWHM medidos para a banda de $2852,9 \Delta cm^{-1}$, verifica-se que se mantém a tendência para a variação da FWHM com a largura da fenda de entrada e de saída.

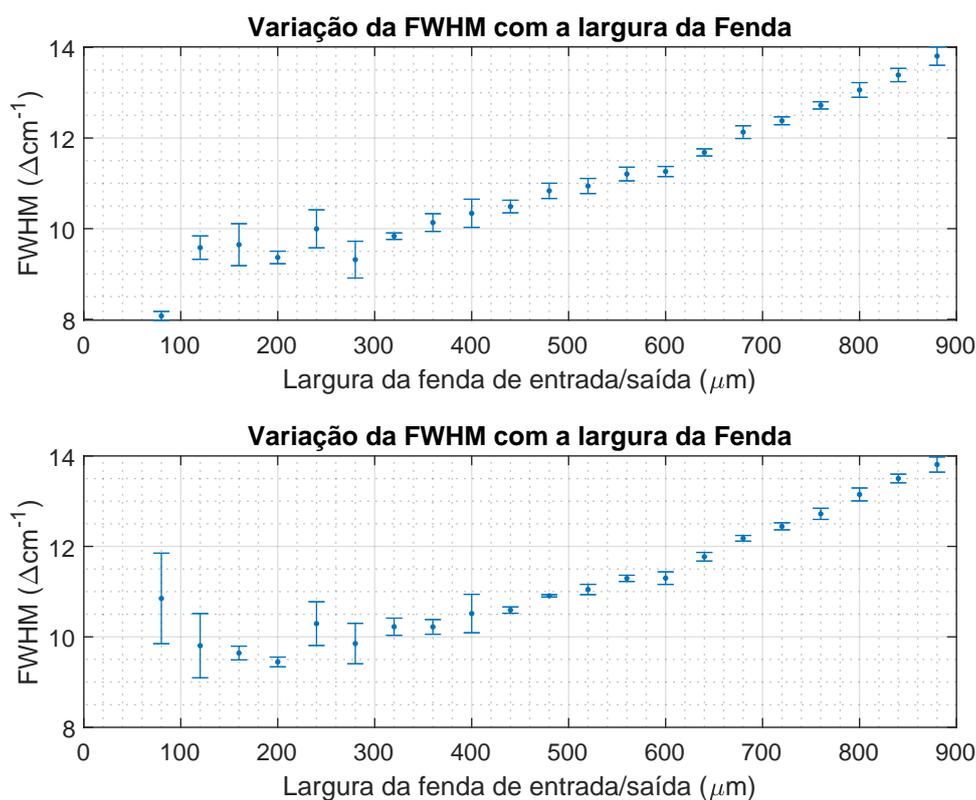


Figura 4.5: Curva da variação da FWHM com a abertura da fenda para a banda a $2852,9 \Delta cm^{-1}$ do ciclo-hexano. No gráfico inferior com o sinal Raman suavizado e o gráfico superior com dados sem suavização.

O facto de se observar uma maior influência do sinal de fundo, e do ruído, na forma da banda para a banda de maior intensidade do espectro do ciclo-hexano, sugere que nesta zona do espectro existe maior quantidade de luz indesejada a não ser filtrada pela fenda central. Os gráficos observados, permitem perceber que o mínimo de resolução depende da zona do espectro, isto é, duas zonas do espectro não se conseguem obter com a mesma resolução na mesma configuração da fenda de entrada e de saída. É necessário então ajustar a abertura das fendas, para um valor intermédio, de modo a se conseguir obter a melhor resolução comum para todo o espectro. Pelos gráficos pode-se concluir que a

melhor resolução do espectrómetro, para se conseguir espectros com boa resolução, se obtém quando se utiliza uma abertura de fenda de entrada e da de saída entre os 120 e os 200 μm .

4.2 Soluções de β -caroteno em Ciclo-hexano de Diferentes Concentrações

A determinação da curva de calibração, para soluções de β -caroteno, implicou, como descrito na secção 3.4.1, a preparação de 5 soluções de diferentes concentrações, e respetiva aquisição do espectro de Raman, utilizando a técnica de Raman de ressonância de transmissão. As soluções preparadas são apresentadas nas Figuras 4.6 e 4.7.



Figura 4.6: Soluções de β -caroteno dissolvidas em ciclo-hexano. Legenda: A-E - Soluções padrão de β -caroteno dissolvidas em ciclo-hexano com concentrações 0,08, 0,06, 0,04, 0,02 e 0,01 mg mL^{-1} , respetivamente. F-G - Soluções teste de β -caroteno em ciclo-hexano de concentrações 0,07 e 0,05 mg mL^{-1} , respetivamente.



Figura 4.7: Soluções de β -caroteno dissolvidas em ciclo-hexano em frascos para medição. Legenda: A-E - Soluções padrão de β -caroteno dissolvidas em ciclo-hexano com concentrações 0,08, 0,06, 0,04, 0,02 e 0,01 mg mL^{-1} , respetivamente. F-G - Soluções teste de β -caroteno em ciclo-hexano de concentrações 0,07 mg mL^{-1} e 0,05 mg mL^{-1} , respetivamente.

A aquisição dos espectros de Raman, para as diferentes soluções e para o ciclo-hexano, resultaram nos gráficos presentes na Figura 4.8. Nesta, tendo-se realizado 5 aquisições de cada espectro para cada uma das amostras, apresentam-se os espectros resultantes da média dos espectros adquiridos. Os espectros de Raman das soluções de β -caroteno apresentam duas bandas de maior intensidade, referentes às bandas do β -caroteno, a $1154 \Delta cm^{-1}$ e $1519 \Delta cm^{-1}$ e uma de menor intensidade a $1007 \Delta cm^{-1}$. Estas bandas devem-se a modos vibracionais de alongação em fase identificada por $\nu(C = C)$, a $1519 \Delta cm^{-1}$, e $\nu(C - C)$, a $1154 \Delta cm^{-1}$, e no caso da banda a $1007 \Delta cm^{-1}$ tem-se uma combinação de modos vibracionais de oscilação no plano, $\delta(C = CH)$, e de modos vibracionais de deformação angular fora do plano da molécula, $\delta(C - H)$ [37].

A observação destes gráficos permite verificar que há um aumento da intensidade do sinal de Raman com o aumento da concentração de β -caroteno, dissolvido em ciclo-hexano, e que as bandas de ciclo-hexano mantém a sua intensidade ao longo de todas as aquisições, resultados que eram esperados, uma vez que a concentração de ciclo-hexano praticamente não varia nas diferentes soluções. As bandas de β -caroteno apresentam-se com maior intensidade que as bandas de ciclo-hexano, apesar da quantidade de ciclo-hexano ser maior que a de β -caroteno, o que significa que se está em condições de ressonância para a molécula de β -caroteno, com conseqüente aumento do sinal das bandas desta molécula. A intensidade da banda de $1154 \Delta cm^{-1}$ tem ainda um acréscimo devido ao facto de nesta zona do espectro se ter uma pequena contribuição da banda de ciclo-hexano, a $1155 \Delta cm^{-1}$, que aumenta, ainda que ligeiramente, a intensidade desta banda no espectro final, no entanto, como a intensidade da banda de ciclo-hexano não varia nos espectros das soluções de β -caroteno, é só um fator de escala.

As curvas de calibração foram obtidas para as bandas de $1154 \Delta cm^{-1}$ e $1519 \Delta cm^{-1}$, do β -caroteno.

4.2.1 Determinação da Curva de Calibração para Quantificação por Raman de Ressonância

De acordo com o processo descrito na secção 3.4, os resultados obtidos para as concentrações das soluções preparadas, bem como os resultados da integração da área e determinação do máximo das bandas de interesse, são apresentados na Tabela 4.2.

Os valores apresentados reafirmam a variação crescente da intensidade do sinal de Raman com o aumento de concentração da soluções de β -caroteno. Os dados da Tabela 4.2 estão representados graficamente nas Figuras 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12.

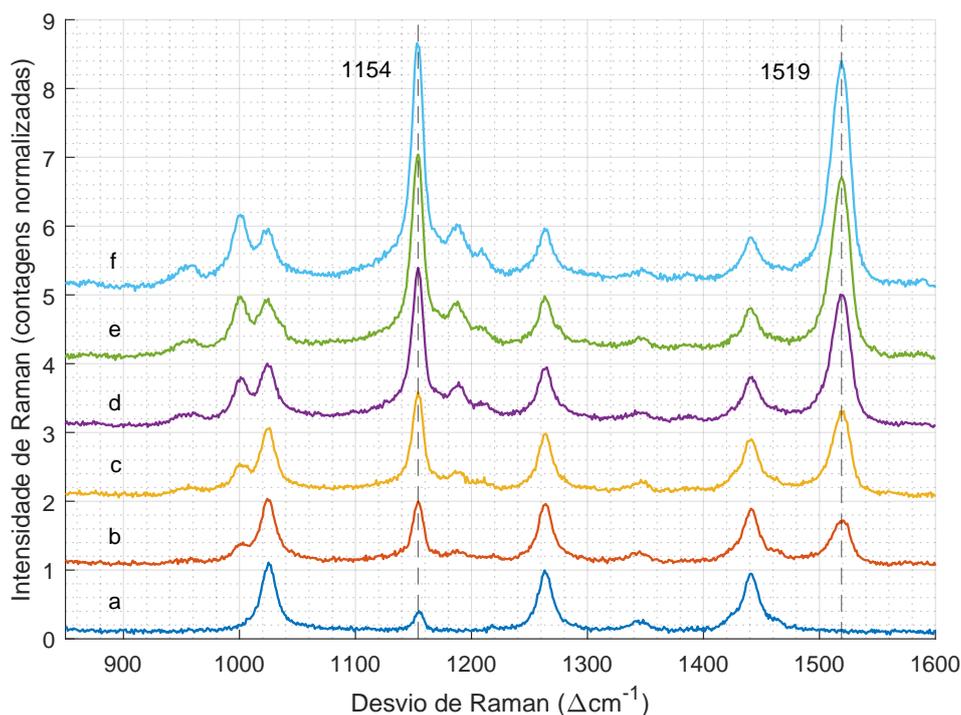


Figura 4.8: Espectros médios de Raman (5 aquisições) de, ciclo-hexano puro (a) e de soluções de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano (b-f) de concentrações 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08 mg mL^{-1} respectivamente. Cada espectro das soluções de β -caroteno é apresentado com um deslocamento vertical de 1 contagem normalizada, relativamente ao espectro de Raman imediatamente anterior. Os espectros são obtidos com um tempo de integração de 2,5s, por cada ponto, e um incremento de 1 Δcm^{-1} .

Tabela 4.2: Valores médios, e respetivos erros associados, para a área integrada (em unidades arbitrárias) e máximo de intensidade da banda de 1154 Δcm^{-1} e 1519 Δcm^{-1} , respetivamente, para cada solução preparada.

Concentração de β -caroteno (mg mL^{-1})	Banda de 1154 Δcm^{-1}		Banda de 1519 Δcm^{-1}	
	Área Integrada (u.a.)	Intensidade de Raman (contagens)	Área Integrada (u.a.)	Intensidade de Raman (contagens)
0,080±0,0020	70,436±2,894	3,675±0,205	78,862±7,584	3,422±0,395
0,060±0,0015	59,259±1,774	3,098±0,140	62,805±1,204	2,751±0,030
0,040±0,0010	46,175±1,296	2,400±0,082	47,960±2,286	2,030±0,124
0,020±0,0005	30,168±1,398	1,595±0,042	31,241±1,220	1,337±0,044
0,010±0,0003	19,229±0,789	1,021±0,052	18,776±1,062	0,777±0,041
0,000±0,000	8,662±0,163	0,430±0,044	5,406±0,734	0,217±0,018

Tabela 4.3: Reta de calibração, R^2 , LOD e LOQ para cada ajuste executado. São apresentados os valores obtidos correspondentes ao ajuste utilizando os pontos da área de integração, bem como do máximo da banda, correspondentes às bandas de 1154 Δcm^{-1} e de 1519 Δcm^{-1} .

	Banda de 1154 Δcm^{-1}		Banda de 1519 Δcm^{-1}	
	Área	Máximo	Área	Máximo
	Integrada	de Intensidade	Integrada	de Intensidade
Reta	A=876,8×C	I=45,9×C	A=959,9×C	I=42,3×C
de Calibração	+8,778	+0,546	+7,354	+0,2578
R^2	0,99	0,97	0,98	0,99
LOD (mg mL^{-1})	6,13E-04	0,0032	0,0025	0,0014
LOQ (mg mL^{-1})	0,0019	0,0096	0,0076	0,0042

A cada conjunto de pontos foi efetuado um ajuste polinomial de grau 1. Deste ajuste obteve-se, para cada método utilizado nas bandas de interesse, para cada gráfico uma equação de uma reta, que foi considerada a equação de calibração. Devido ao facto do β -caroteno estar dissolvido em ciclo-hexano também se inclui no ajuste uma amostra de ciclo-hexano puro, uma vez que para este valor de concentração, apesar de não haver sinal de Raman de β -caroteno, há sinal de Raman referente ao solvente a que se chamou branco. Este ponto, resultante de 5 medidas de branco, serviu como uma retificação à reta de ajuste, de tal modo que para concentração nula o ajuste correspondesse ao sinal de Raman do ciclo-hexano.

Analisando os gráficos das Figuras 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12 e a Tabela 4.2, verifica-se que se tem um maior erro associado, dos parâmetros de interesse, para concentrações mais elevadas.

O limite de deteção, LOD, é a menor concentração de uma substância, presente numa amostra, que é possível distinguir estatisticamente do ruído (amostra sem a substância). O limite de quantificação, LOQ, é o mínimo de concentração, de uma dada substância, que se consegue quantificar com precisão e exatidão. Estes limites determinaram-se, seguindo o ICH Guideline Q2B [38], de acordo com as Equações (4.1) e (4.2):

$$LOD = 3.3 \times \frac{\sigma}{s} \quad (4.1)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{s} \quad (4.2)$$

em que se tem σ como o desvio padrão das medições da amostra de ciclo-hexano e s o

declive das equações da reta de ajuste. O LOD médio, resultante da média dos valores da Tabela 4.3 para o respetivo método, tendo em conta o método de integração da área é de $0,0016 \pm 0,0013 \text{ mg mL}^{-1}$ e pelo método de máximo de intensidade é de $0,0023 \pm 0,0016 \text{ mg mL}^{-1}$ o que sugere que, pela definição de LOD, a menor concentração de β -caroteno que é possível detetar em ciclo-hexano é de cerca de $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$, aceitando a informação resultante da integração da área da banda como a mais credível. Já o LOQ médio, pela mesma abordagem anterior, é, para o método de integração das área, de $0,0048 \pm 0,0040 \text{ mg mL}^{-1}$, e, pelo método do máximo de intensidade, de $0,0069 \pm 0,0049 \text{ mg mL}^{-1}$. Tal indica que a concentração mínima que é possível determinar quantitativamente é de $0,005 \text{ mg mL}^{-1}$, assumindo que o método de integração de área produz informação mais correta. Este resultado está de acordo com o observado uma vez que, para a concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, já se obtém um sinal de Raman do β -caroteno a ser sobreposto pelo do ciclo-hexano.

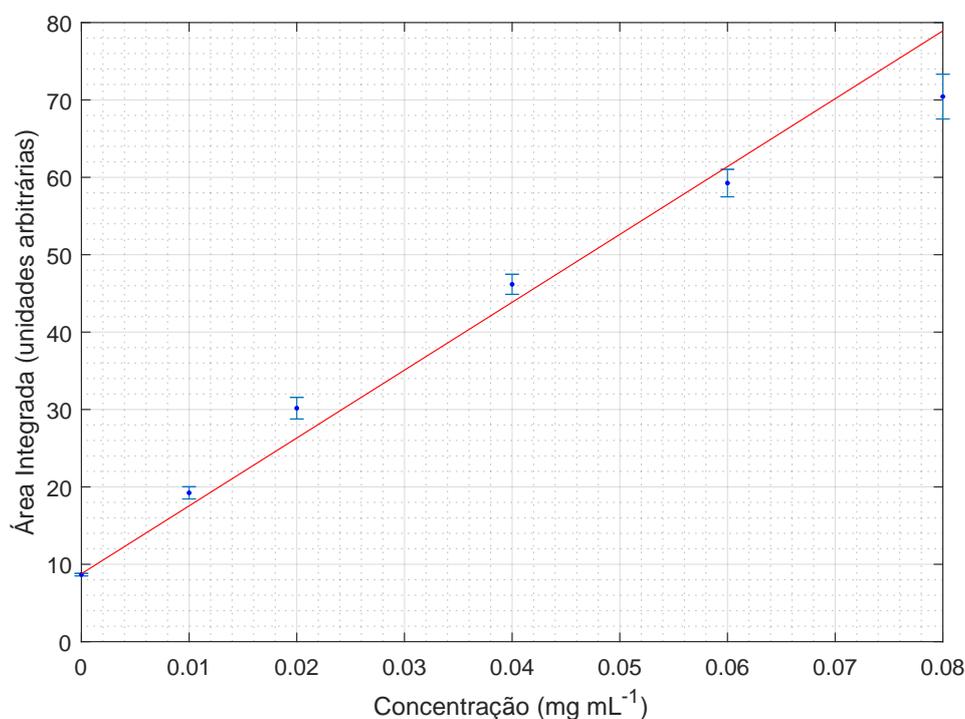


Figura 4.9: Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de 1154 cm^{-1} , utilizando a integração da área da banda.

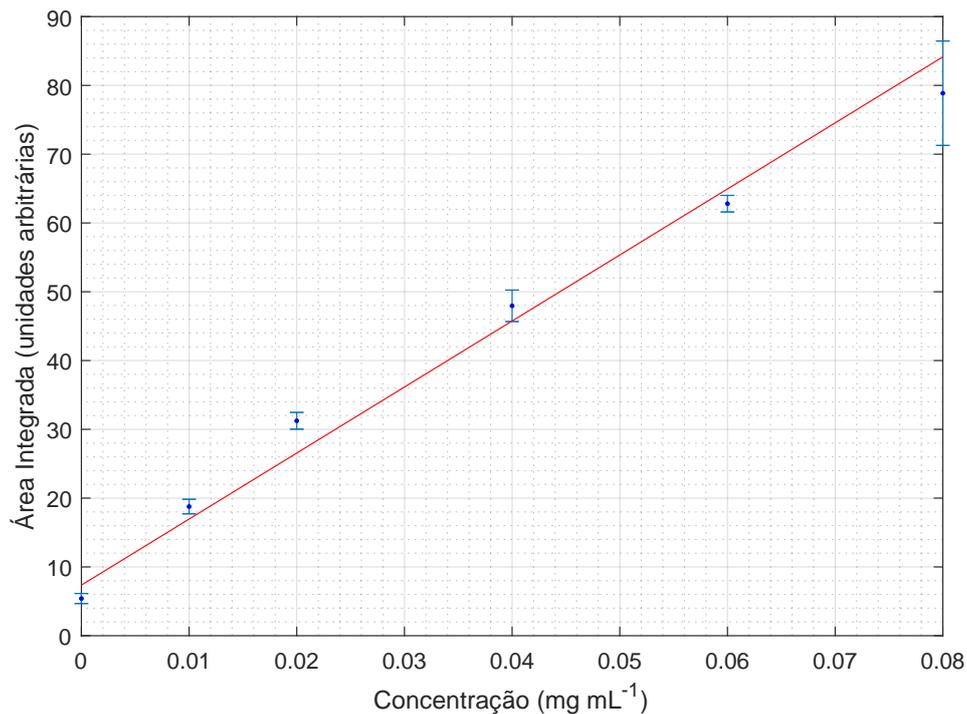


Figura 4.10: Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de $1519 \Delta cm^{-1}$, utilizando a integração da área da banda.

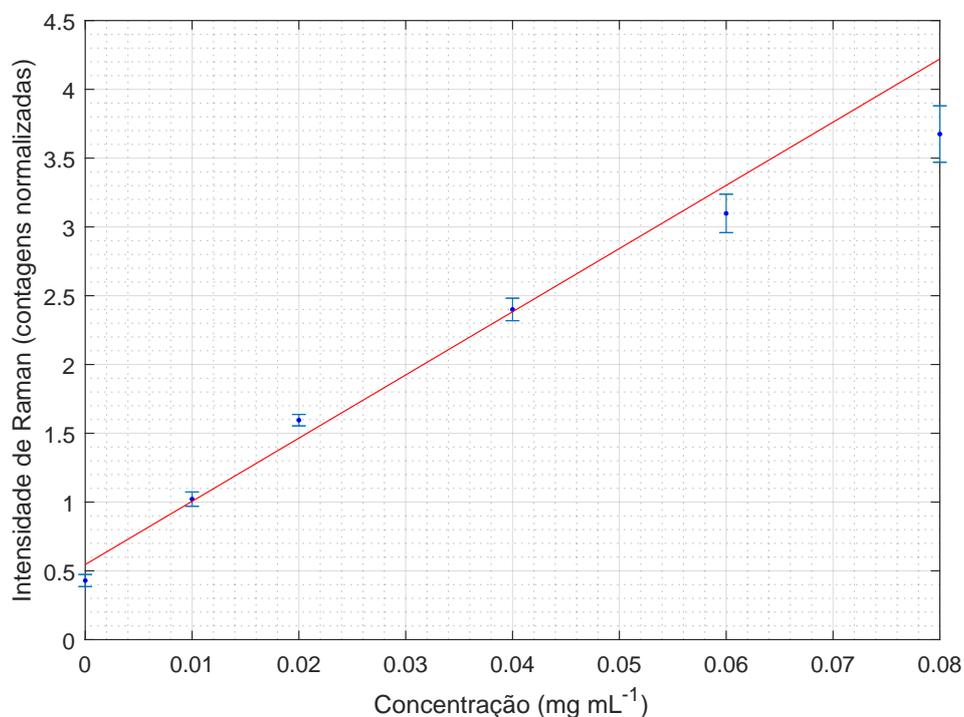


Figura 4.11: Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de $1154 \Delta cm^{-1}$, utilizando o máximo de intensidade da banda.

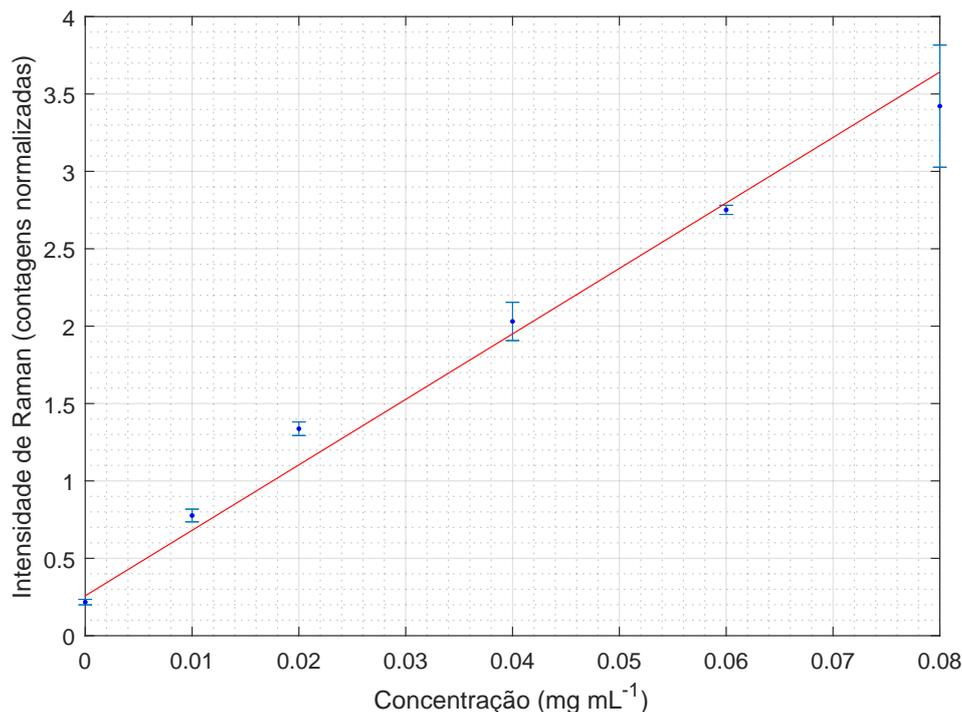


Figura 4.12: Curva de calibração de conteúdo de β -caroteno utilizando espectroscopia de Raman de ressonância de transmissão, para a banda de $1519 \Delta cm^{-1}$, utilizando o máximo de intensidade da banda.

4.2.2 Validação da Curva de Calibração

As curvas de calibração obtidas foram validadas fazendo a quantificação da concentração das duas amostras problema e comparando com a concentração de β -caroteno com que foram preparadas. Tendo-se preparado duas soluções de validação, de acordo com o procedimento apresentado em 3.4.1, com concentração de $0,070 \pm 0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,050 \pm 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$, obtiveram-se os espectros de Raman de ressonância de transmissão, resultantes da média de 4 aquisições cada, apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14, respectivamente.

As concentrações obtidas, tendo em conta os ajustes executados para cada banda, são apresentados na Tabela 4.4. Comparando os valores apresentados, verifica-se que as concentrações obtidas pelas equações das retas de calibração, referentes à integração das áreas das bandas, apresentam um valor médio mais próximo da concentração real do que as concentrações médias obtidas pelas retas de calibração ajustadas ao método do máximo de intensidade. Salienta-se ainda o facto de os primeiros valores, tendo em conta a incerteza associada, conterem o valor da concentração real da solução preparada a que são associados. Deste modo, não só se valida as retas de calibração obtidas como se verifica que a melhor informação é obtida utilizando a integração da área da banda.

Tabela 4.4: Concentração, média, das soluções de validação da curva de calibração. São apresentados os valores obtidos pela integração da área e pelo máximo de intensidade das bandas de $1154 \Delta cm^{-1}$ e de $1519 \Delta cm^{-1}$, respetivamente. As soluções de validação apresentam uma concentração de $0,070 \pm 0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,050 \pm 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ de β -caroteno em ciclo-hexano.

	Concentração determinada pela reta obtida pelo método de integração da área da banda (mg mL^{-1})	Concentração determinada pela reta obtida pelo método de intensidade máxima da banda (mg mL^{-1})
Banda de	$0,0671 \pm 0,0053$	$0,0593 \pm 0,0015$
$1154 \Delta cm^{-1}$	$0,0490 \pm 0,0030$	$0,0458 \pm 0,0023$
Banda de	$0,0684 \pm 0,0020$	$0,0628 \pm 0,0054$
$1519 \Delta cm^{-1}$	$0,0492 \pm 0,0028$	$0,0502 \pm 0,0033$

De acordo com a Tabela 4.4 são apresentados dois valores, médios, de concentração da solução, para a mesma solução de teste. Considera-se, para cada método, a média destes dois valores como o valor da concentração de cada solução. Assim, obtém-se as concentrações de $0,0491 \pm 0,0001 \text{ mg mL}^{-1}$ e de $0,0678 \pm 0,0009 \text{ mg mL}^{-1}$ para as concentrações de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$, respetivamente, utilizando o método de integração da área. De igual modo, obtém-se o valor de $0,048 \pm 0,003 \text{ mg mL}^{-1}$ e de $0,061 \pm 0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ para as concentrações de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$, respetivamente, de acordo com o método do máximo de intensidade. Sendo estes valores concordantes com os valores teóricos, apresentando um erro percentual de 1,8% e 3,1% pelo método de integração das áreas, respetivamente, e de 4% e de 12,6% pelo método do máximo de intensidade, respetivamente, permitem verificar a montagem experimental de transmissão.

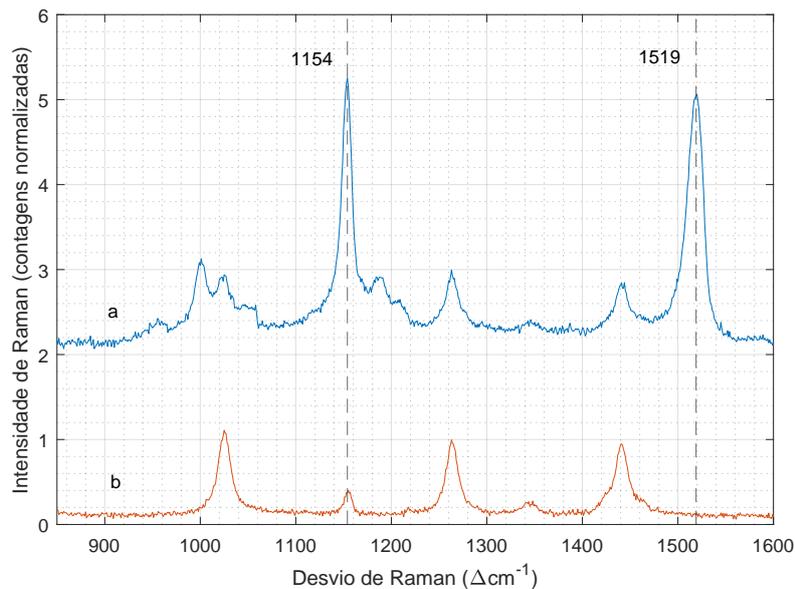


Figura 4.13: Espectro de Raman de ressonância de transmissão da solução de concentração de $0,070 \pm 0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ (a), deslocado verticalmente de 2 unidades normalizadas relativamente ao espectro de Raman do ciclo-hexano (b). Ambos os espectros foram adquiridos com um tempo de integração de 2,5s no intervalo de 850-1600 Δcm^{-1} .

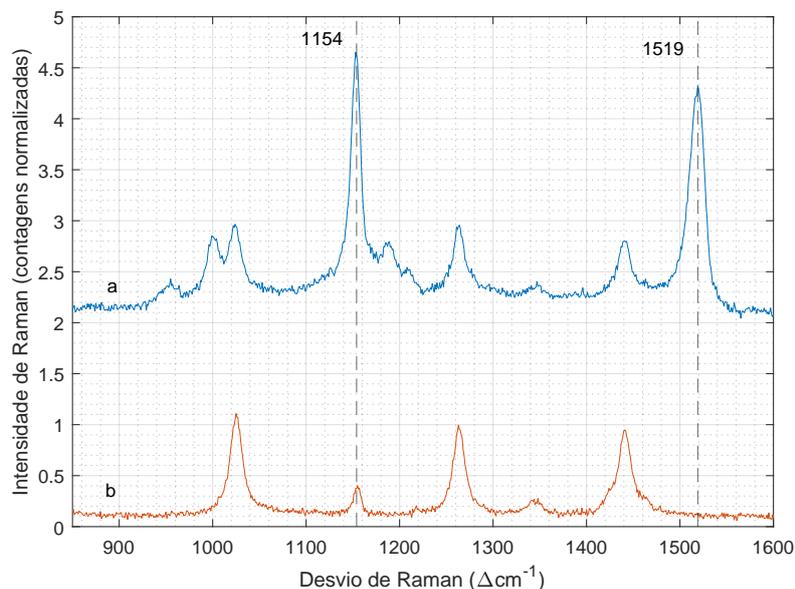


Figura 4.14: Espectros de Raman de ressonância de transmissão da solução de concentração de $0,050 \pm 0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ (a), deslocado verticalmente de 2 unidades normalizadas relativamente ao espectro de Raman do ciclo-hexano (b). Ambos os espectros foram adquiridos com um tempo de integração de 2,5s no intervalo de 850-1600 Δcm^{-1} .

4.3 Validação do Funcionamento da Interface Desenvolvida

A interface desenvolvida, tendo em conta os objetivos e requisitos apresentados, deveria reproduzir o funcionamento do software original, controlando os motores que permitem movimentar as redes de difração. Deveria ainda possibilitar a aquisição do sinal utilizando um detetor multicanal, apresentando o resultado da aquisição efetuada num gráfico com as unidades de aquisição corretamente calibradas.

A calibração que é necessária realizar, para cada posição do monocromador, implicava observar pelo menos 3 linhas espectrais em cada posição do monocromador, de modo a se fazer uma correta correspondência entre as linhas espectrais observadas e as adquiridas utilizando o fotomultiplicador, permitindo determinar, para cada posição do monocromador, os respetivos intervalos espectrais observados. No entanto, devido a baixa sensibilidade da câmara *Guppy F-036B*, ao longo do espectro da lâmpada de mercúrio só foi possível detetar três linhas espectrais, a $1122,5 \Delta cm^{-1}$ (546,03 nm), a $2101 \Delta cm^{-1}$ (576,86 nm) e a $2164 \Delta cm^{-1}$ (578,96 nm), apresentadas nas Figuras 4.16 e 4.17, impossibilitando a realização da calibração.

O facto de não ser possível detetar mais que três linhas espectrais, não permitiu realizar a aquisição segmentada com base no intervalo espectral correspondente a cada posição do monocromador. Em consequência, este método de aquisição depende da posição inicial, da aquisição, indicada pelo utilizador para posicionar o monocromador para adquirir o espectro.

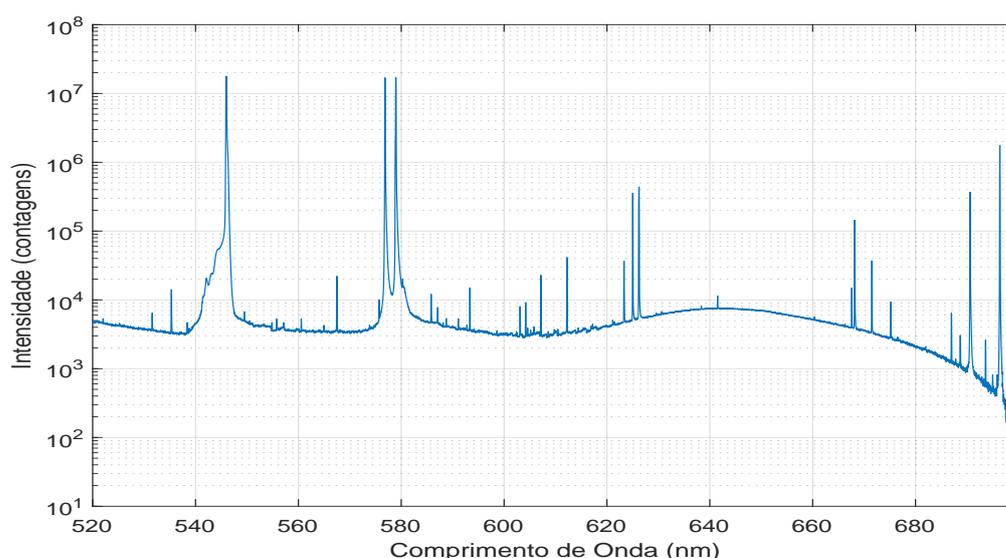


Figura 4.15: Espectro da lâmpada de mercúrio obtido no SPEX 1403. O intervalo de aquisição é 520-700 nm e tempo de integração de 2.5s por ponto.

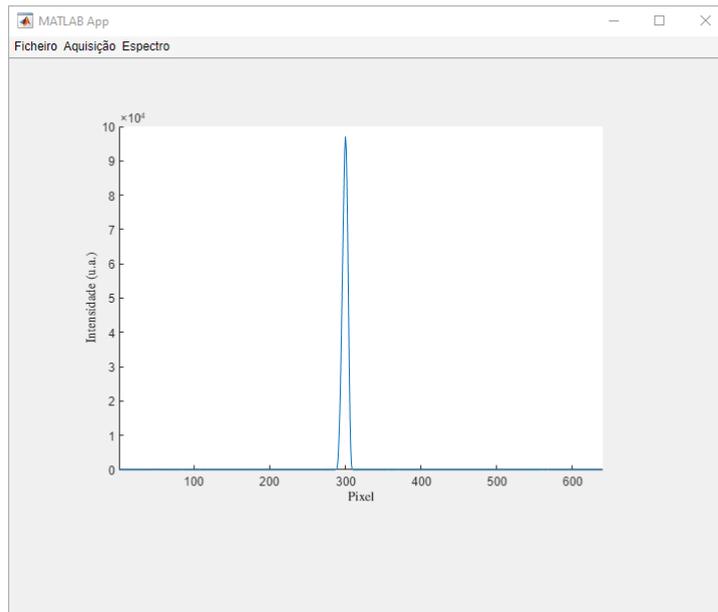


Figura 4.16: Apresentação da linha espectral a $1122,5 \Delta cm^{-1}$, da lâmpada de mercúrio, na interface desenvolvida. O espectro obtido resulta da média de 2 aquisições compostas por 3500 frames, cada.

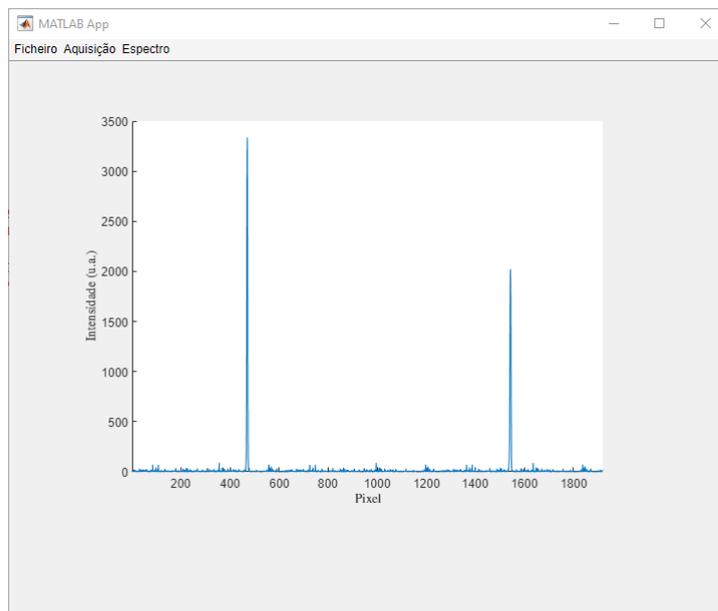


Figura 4.17: Apresentação das linhas espectrais a $2101 \Delta cm^{-1}$ e a $2164 \Delta cm^{-1}$, da lâmpada de mercúrio, na interface desenvolvida. O gráfico apresentado é resultado da média de 2 aquisições, constituídas por 3 segmentos de 3500 frames cada.

Os gráficos obtidos permitem verificar que a interface está a produzir o efeito desejado, ao apresentar ao utilizador os gráficos pretendidos e realizar aquisição segmentada, ainda que sem saber a que região espectral corresponde os diferentes segmentos, com a possibilidade de sobreposição, ou perda, de zonas do espectro.

Capítulo 5

Conclusão

Terminado o projeto, é necessário retirar conclusões relativamente aos resultados obtidos no decurso do projeto comparando com os objetivos, e requisitos, inicialmente estabelecidos. Os objetivos do trabalho eram o de fazer uma atualização dos métodos de aquisição e controlo do SPEX 1403, desenvolvendo uma interface de utilizador com características atuais e adicionando um CCD para aquisição de sinal Raman, e ainda alterar a geometria de amostragem para configuração de transmissão.

A primeira fase do projeto incidiu na aquisição dos controlos e respostas trocados entre o software original, DM3000, e o controlador do SPEX 1403. Com o programa desenvolvido foi possível introduzir um computador externo, entre a ligação física existente, o que permitiu obter a informação trocada entre o software original e o controlador, durante o arranque do software, o chamado *Handshake*, e durante a aquisição de espectros, que se designou por *Varrimento*. A aquisição destes controlos permitiu, posteriormente, desenvolver a interface.

No seguimento do projeto alterou-se a configuração de amostragem para configuração de transmissão. Para obter esta configuração recorreu-se a fibra ótica e a lentes, montados em sistemas de gaiola. Este método permitiu maior robustez e versatilidade ao sistema ao mesmo tempo que facilitou o alinhamento dos diversos constituintes de modo a se obter um feixe incidente, focado, na amostra, com reduzidas perdas de potência ótica desde o laser até à amostra. A validação do método utilizado fez-se utilizando a técnica de Espectroscopia de Raman de Ressonância de Transmissão, em que é necessário que o comprimento de onda de excitação seja coincidente, ou perto, com o comprimento de onda relativo à transição eletrónica de absorção. Para tal escolheu-se, como amostra, o β -caroteno e fez-se um estudo de quantificação utilizando soluções de β -caroteno dissolvido em ciclo-hexano. Tendo-se adquirido espectros de Raman, tanto de ciclo-hexano como das soluções preparadas, com as bandas definidas corretamente, foi possível produzir

curvas de calibração. Assim conseguiu-se determinar a concentração de duas soluções problema cuja comparação, com a concentração de preparação de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e de $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$, determinou um erro percentual de 1,8% e de 3,1%, respetivamente. O facto de se conseguir determinar a concentração de duas soluções utilizando a calibração, obtida com a aquisição de espectros de Raman obtidos com a geometria de transmissão, permite validar o método utilizado para a amostragem de transmissão bem como permite concluir que há uma relação linear entre a intensidade do sinal Raman e a concentração de β -caroteno na amostra, no intervalo de concentrações considerado.

No decurso do trabalho também se determinou a resolução do espectrómetro, quando utilizado com deteção monocanal. Determinou-se então a largura a meia altura da linha espectral de $579,1 \text{ nm}$, da lâmpada de mercúrio, para diferentes posições de fenda de entrada e da fenda de saída em que a linha espectral se apresenta resolvida. Dado que os valores calculados de largura a meia altura se concentram num intervalo reduzido, conclui-se que a resolução do espectrómetro pode ser considerada como o valor médio dos valores calculados, obtendo-se uma resolução de $1,2 \pm 0,1 \text{ } \Delta \text{cm}^{-1}$. Também se fez uma otimização da resolução do SPEX 1403, para a geometria de transmissão, utilizando ciclo-hexano. Esta otimização permitiu validar, novamente, a geometria de transmissão, bem como permitiu concluir qual a melhor posição das fendas, de entrada e de saída, que permite obter um espectro de Raman com transmissão com a melhor resolução ao longo de todo o espectro.

Por fim, desenvolveu-se a interface de utilizador, utilizando os controlos adquiridos na primeira fase do projeto, e utilizando uma câmara CMOS, *Guppy F-036B*, como detetor multicanal controlado pela interface. Nesta fase do projeto, a aquisição de três linhas espectrais da lâmpada de mercúrio permitiu verificar o correto funcionamento das funções da interface que se puderam testar. Nesta fase, não foi possível calibrar a apresentação gráfica dos espectros na interface, nem detetar Raman, devido ao facto de o empilhamento de imagens não ter aumentado significativamente a sensibilidade da câmara, o que fez com que só se conseguisse detetar três linhas espectrais, de maior intensidade, da lâmpada de mercúrio.

Dos objetivos traçados para o projeto, conseguiu-se efetuar a amostragem de sinal com a geometria de transmissão e conseguiu-se desenvolver, de forma simples, uma interface de utilizador recente. Não foi possível adquirir um CCD, pelo que não se conseguiu adicionar aquisição multicanal ao SPEX 1403.

5.1 Trabalho Futuro

Concluído o projeto, é necessário projetar o trabalho que ainda é necessário realizar.

Primeiro, tendo em conta que se pretende um sistema de transmissão, que permita analisar todo o tipo de amostras, é necessário proceder a uma atualização do sistema de recolha do feixe, utilizado pelo SPEX, após a amostra. Para tal, deve-se proceder a uma substituição dos espelhos existentes neste sistema. Para adquirir toda a radiação dispersa após a amostra deve-se utilizar uma lente que produza um feixe colimado, sem perda de radiação, que após ser desviado pelo novo sistema de espelhos deverá ser focado, por uma nova lente, para a fenda de entrada do SPEX 1403, garantindo que o sistema permite adquirir sinal Raman, de todo o tipo de amostras, utilizando a geometria de transmissão.

Sendo um dos objetivos do projeto a aquisição de um CCD, arrefecido termoelectricamente, será necessário adquirir um CCD com estas características. A aquisição do CCD deve ter em conta que será necessário desviar o feixe, focado do último espelho antes de incidir no fotomultiplicador, para o qual se deve utilizar um espelho plano, que se demonstrou ser eficaz no desvio deste feixe. Também será necessário ter um conhecimento mais concreto a cerca da distância focal de saída para o CCD, de modo a ser possível produzir a peça que fixe o CCD ao SPEX 1403.

A nível de interface, numa continuação do trabalho, deveria receber melhoramentos ao nível da aquisição e da apresentação ao utilizador do espectro final, através da inclusão do método de aquisição do sinal fornecido pelo CCD. Estes dois melhoramentos devem ser realizados simultaneamente, na medida em que será necessário calibrar o CCD, para cada posição do monocromador para estabelecer uma relação entre o intervalo espectral e a posição do monocromador e determinar o correto incremento a utilizar no processo de aquisição segmentada. Assim, será possível estabelecer uma relação entre a posição do monocromador e o intervalo espectral apresentado ao utilizador, permitindo apresentar os espectros corretamente. Adicionalmente será necessário efetuar a união dos diferentes segmentos, fazendo a média das zonas de intersecção. Quanto aos parâmetros de aquisição deverão ser redefinidos de modo a corresponderem às características do futuro CCD, nomeadamente, deverá ser possível indicar o tempo de exposição necessário para cada aquisição. Também deverá ser melhorada a indicação da posição, no espectro, da aquisição, que dependerá da calibração.

A estrutura atual do SPEX 1403 não permite que se tenha uma total independência do software original, uma vez que é este que controla a aquisição com o fotomultiplicador. Futuramente seria uma mais valia adquirir um novo fotomultiplicador, mais recente, e integrar a aquisição do sinal na interface e efetuar a respetiva calibração, tornando o sistema independente do software original.

Referências

- [1] C. V. Raman and K. S. Krishnan, “A new type of secondary radiation [11],” *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, 1928.
- [2] E. Smith and G. Dent, *Introduction, Basic Theory and Principles*, ch. 1, pp. 1–21. John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- [3] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, and C. W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, second edi ed., 2003.
- [4] P. J. Larkin, *IR and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation*. Amsterdam: Elsevier, 1st ed., 2011.
- [5] C. F. G. C. Geraldès, “Introduction to infrared and raman-based biomedical molecular imaging and comparison with other modalities,” *Molecules*, vol. 25, no. 23, 2020.
- [6] M. Harrand and R. Lennuier, “Exalation de l’intensité Raies dans les Spectres Raman Émis par des Corps Présentant au Voisinage de la Raie Excitatrice,” *Comptes rendus de l’Académie des Sciences*, no. 223, pp. 356–359, 1946.
- [7] E. Smith and G. Dent, *The Raman Experiment – Raman Instrumentation, Sample Presentation, Data Handling and Practical Aspects of Interpretation*, ch. 2, pp. 23–70. John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- [8] N. A. Macleod and P. Matousek, “Emerging non-invasive raman methods in process control and forensic applications,” *Pharmaceutical Research*, vol. 25, no. 10, pp. 2205–2215, 2008.
- [9] P. Matousek and A. W. Parker, “Bulk Raman analysis of pharmaceutical tablets,” *Applied Spectroscopy*, vol. 60, no. 12, pp. 1353–1357, 2006.
- [10] P. Matousek and A. W. Parker, “Non-invasive probing of pharmaceutical capsules using transmission Raman spectroscopy,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 38, pp. 563–567, 2007.

-
- [11] A. Ghita, P. Matousek, and N. Stone, “High sensitivity non-invasive detection of calcifications deep inside biological tissue using Transmission Raman Spectroscopy,” *Journal of Biophotonics*, vol. 11, no. 1, pp. 1–8, 2018.
- [12] M. D. Hargreaves, N. A. Macleod, M. R. Smith, D. Andrews, S. V. Hammond, and P. Matousek, “Characterisation of transmission Raman spectroscopy for rapid quantitative analysis of intact multi-component pharmaceutical capsules,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 54, pp. 463–468, 2011.
- [13] J. A. Griffen, A. W. Owen, J. Burley, V. Taresco, and P. Matousek, “Rapid quantification of low level polymorph content in a solid dose form using transmission Raman spectroscopy,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 128, pp. 35–45, 2016.
- [14] C. M. McGoverin, M. D. Hargreaves, P. Matousek, and K. C. Gordon, “Pharmaceutical polymorphs quantified with transmission Raman spectroscopy,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 43, no. 2, pp. 280–285, 2012.
- [15] A. G. González, *Espectroscopia Raman Laser de Substancias de Interés Biológico y Nutricional Laser Raman Spectroscopy in Substances of Biological and Nutritional Interest*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- [16] A. Gonzalez, D. Martin, K. Slowing, and A. Gonzalez Ureña, “Insights into the β -carotene distribution in carrot roots,” *Food Structure*, vol. 2, no. 1, pp. 61–65, 2014.
- [17] R. S. Krishnan and R. K. Shankar, “Raman effect: History of the discovery,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 10, pp. 1–8, 1981.
- [18] S. A. Asher and R. Bormett, “Raman Instrumentation,” in *Weber W.H., Merlin R. (eds) Raman Scattering in Materials Science. Springer Series in Materials Science, vol 42.*, pp. 35–54, Springer, Berlin, Heidelberg, 2000.
- [19] Horiba, “Instrument Presentation - HORIBA.” https://www.horiba.com/en_en/ramanspectrometerpresentation/. [Online; accessed 10-January-2021].
- [20] R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000.
- [21] Horiba, “Spectrometers, Monochromators and Spectrographs - HORIBA.” https://www.horiba.com/en_en/technology/measurement-and-control-techniques/spectroscopy/spectrometers-and-monochromators/spectrometer-monochromator/. [Online; accessed 10-January-2021].
-

-
- [22] S. GmbH, “Double-Spectrometer.” <http://www.s-and-i.eu/index.php/products/double>, 2020. [Online; accessed 10-January-2021].
- [23] V. Deckert, C. Fickert, D. Gernet, P. Vogt, T. Michelis, and W. Kiefer, “Stray Light Rejection in Double Monochromators with Multichannel Detection,” *Applied Spectroscopy*, vol. 49, no. 2, pp. 253–255, 1995.
- [24] A. J. Melveger, J. W. Brasch, and E. R. Lippincott, “Laser Raman Spectra of Liquid and Solid Bromine and Carbon Disulfide Under High Pressure,” *Applied Optics*, vol. 9, no. 1, p. 11, 1970.
- [25] R. Bhattacharjee, Y. S. Jain, and H. D. Bist, “Laser Raman and infrared spectra of tartaric acid crystals,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 20, no. 2, pp. 91–97, 1989.
- [26] S. GmbH, “Triple-Spectrometer.” <http://www.s-and-i.eu/index.php/products/triple>, 2020. [Online; accessed 10-January-2021].
- [27] A. P. Ayala, “Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering,” *Vibrational Spectroscopy*, vol. 45, pp. 112–116, nov 2007.
- [28] B. Yang, M. D. Morris, and H. Owen, “Holographic Notch Filter for Low-Wavenumber Stokes and Anti-Stokes Raman Spectroscopy,” *Applied Spectroscopy*, vol. 45, no. 9, pp. 1533–1536, 1991.
- [29] G. F. Knoll, *Radiation Detection and Measurement*. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 4th ed. ed., 2010.
- [30] M. Abramowitz and M. W. Davidson, “Hamamatsu Learning Center: Photomultiplier Tubes.” <http://hamamatsu.magnet.fsu.edu/articles/photomultipliers.html>. [Online; accessed 10-January-2021].
- [31] R. B. Bilhorn, J. V. Sweedler, P. M. Epperson, and M. B. Denton, “Charge Transfer Device Detectors for Analytical Optical Spectroscopy - Operation and Characteristics.,” *Applied Spectroscopy*, vol. 41, no. 7, pp. 1114–1125, 1987.
- [32] S. C. Denson, C. J. Pommier, and M. B. Denton, “The impact of array detectors on Raman spectroscopy,” *Journal of Chemical Education*, vol. 84, no. 1, pp. 67–74, 2007.
- [33] I. InPhotonics, “Guide to Raman Instrumentation.” <https://www.inphotonics.com/ramanspecs.htm>, 2021. [Online; accessed 19-August-2021].
- [34] V. Deckert and W. Kiefer, “Scanning Multichannel Technique for Improved Spectrochemical Measurements with a CCD Camera and its Application to Raman Spectroscopy,” *Applied Spectroscopy*, vol. 46, no. 2, pp. 322–328, 1992.
-

- [35] P. Knoll, R. Singer, and W. Kiefer, “Improving spectroscopic techniques by a scanning multichannel method,” *Applied Spectroscopy*, vol. 44, no. 5, pp. 776–782, 1990.
- [36] C. Dyer and B. J. Smith, “Application of continuous extended scanning techniques to the simultaneous detection of Raman scattering and photoluminescence from calcium disilicates using visible and near-infrared excitation,” *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 26, no. 8-9, pp. 777–785, 1995.
- [37] C. Marshall and A. Olcott Marshall, “The potential of raman spectroscopy for the analysis of diagenetically transformed carotenoids,” *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, vol. 368, pp. 3137–44, 07 2010.
- [38] A. Procedures, “Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology,” vol. 20857, no. November, pp. 301–827, 1996.

Apêndice A

Man In The Middle

```
# -*- coding: utf-8 -*-
import csv
import queue
import signal
import time
import threading
import datetime
import serial

class ServiceExit(Exception):
    pass

def main():
    signal.signal(signal.SIGTERM, signal_handler)
    signal.signal(signal.SIGINT, signal_handler)

    evento = threading.Event()
    try:
        ser1 = serial.Serial(port='COM1',
                             baudrate=19200, bytesize=serial.EIGHTBITS,
                             parity=serial.PARITY_NONE,
                             stopbits=serial.STOPBITS_ONE, timeout=1.5)
        ser2 = serial.Serial(port='COM2',
                             baudrate=19200, bytesize=serial.EIGHTBITS,
                             parity=serial.PARITY_NONE,
                             stopbits=serial.STOPBITS_ONE, timeout=1.5)

        with open('computador', 'w', newline='') as csvfile1:
            ficheiro_inter = csv.writer(csvfile1)
            ficheiro_inter.writerow(['Dispositivo', 'Tempo',
```

```

        'Numero de Bytes',
        'Comando Recebido(bytes)'])

with open('controlador', 'w', newline='') as csvfile2:
    ficheiro_retrans = csv.writer(csvfile2)
    ficheiro_retrans.writerow(
        ['Dispositivo', 'Tempo',
         'Numero de Bytes',
         'Comando Aceite', 'Informacao Recebida'])

ser1_queue = queue.Queue()
ser2_queue = queue.Queue()
porta1 = threading.Thread(target=read,
                          args=(ser1, ser1_queue,
                                ser2_queue, ser1.name, evento))
porta2 = threading.Thread(target=read,
                          args=(ser2, ser1_queue,
                                ser2_queue, ser1.name, evento))
escrita = threading.Thread(target=write_to_file,
                          args=(ser1, ser2,
                                ser1_queue, ser2_queue, evento))

porta1.start()
porta2.start()
escrita.start()

while True:
    time.sleep(0.001)
except ServiceExit:
    evento.set()
    print('O programa terminou.')

def read(ser_r, ser_queue_1, ser_queue_2, nome, evento):
    while not evento.is_set():
        by_num = ser_r.inWaiting()
        if by_num == 0:
            if ser_r.name == nome:
                print('Nao foi recebido nenhum comando! \n')
            else:
                print('Nao foi recebida informacao! \n')
        else:
            lido = ser_r.read(by_num)
            if ser_r.name == nome:
                print('O computador leu: ' + str(lido) + '\n')
                ser_queue_1.put([by_num, lido])
            else:
                print('O controlador enviou: ' + str(lido) + '\n')

```

```

        ser_queue_2.put([by_num, lido])

def write_to_file(ser_1, ser_2, ser_queue_1, ser_queue_2, evento):
    global retransmitido, ans
    while not evento.is_set():
        if not ser_queue_1.empty():
            indicador_1 = True
            interceptado = ser_queue_1.get()
            ser_queue_1.task_done()
            ser_2.write(interceptado[1])
            with open('computador', 'a', newline='') as csvfile1:
                ficheiro_inter = csv.writer(csvfile1)
                ficheiro_inter.writerow(['computador',
                                         datetime.datetime.now(),
                                         interceptado[0],
                                         interceptado[1]])

        else:
            indicador_1 = False

    indicador_2 = False
    if not ser_queue_2.empty():
        indicador_2 = True
        retransmitido = ser_queue_2.get()
        ser_queue_2.task_done()
        ser_1.write(retransmitido[1])
        if indicador_1:
            ans = 'Sim'
        else:
            ans = 'Nao'
    else:
        if indicador_1 is True:
            indicador_2 = True
            ans = 'Sim'
            retransmitido = [0, '----']
    if indicador_2 is True:
        with open('controlador', 'a', newline='') as csvfile2:
            ficheiro_retrans = csv.writer(csvfile2)
            ficheiro_retrans.writerow(
                ['controlador',
                 datetime.datetime.now(),
                 retransmitido[0], ans, retransmitido[1]])

def signal_handler(signum, frame):
    print('Foi apanhado um sinal! \n')
    print('A preparar para terminar as Threads')
```

```
    raise ServiceExit

if __name__ == '__main__':
    main()
```

Apêndice B

Controles Adquiridos

B.1 Descrição do Processo do *Handshake* Inicial

O handshake processa-se do seguinte modo:

1. Inicialmente são comunicados os comando 248 e 222, aos quais não é devolvida nenhuma resposta. Permitem colocar o controlador no modo de comunicação inteligente.
2. É enviado um comando de espaço, seguido do comando 247, com uma função semelhante ao comando 248.
3. A sequência de inicio prossegue com o envio do quinto comando, válido só se o controlador estiver no modo de comunicação inteligente, que permite a passagem do controlador do programa 'BOOT' para o programa 'Main'.
4. De seguida há a verificação do estado do programa, cuja resposta ao comando 6, 'F', indica que a comunicação ocorre com o programa 'Main'.
5. Após a comunicação inicial com o controlador, estabelece-se os parâmetros para o movimento do monocromador. Envia-se então o comando B, que tem associado os parâmetros 0 (indica o monocromador), 1000 (frequência mínima do motor do monocromador), 24000 (frequência máxima do motor do monocromador), e o intervalo de tempo, 1150 ms, que demora a atingir a frequência máxima.
6. Conseqüentemente inicia-se o movimento do monocromador, na posição inicial, com o comando 'A'. Fecha-se o shutter ativo. Envia-se o comando que pede a posição inicial do monocromador.
7. Os comandos 11 até 17 constituem uma sequência que é repetida 2 vezes.
 - (a) O primeiro passo da sequência lê, novamente, a posição do monocromador.

Seguido do comando que permite adquirir informação sobre limites do movimento. É retornado o valor de 0, logo não há nenhum limite excedido.

- (b) É comunicado ao controlador o número de passos que o monocromador se deve mover, de modo a fazer a correção de backlash.
 - (c) É enviado o comando 'E', para verificar a execução do movimento, cuja resposta é 'oq' durante o movimento e 'oz' para indicar que o movimento terminou.
 - (d) De seguida, há o envio do comando 'K'.
 - (e) É, novamente, pedido a posição do motor, seguido do comando 'K'.
8. A primeira sequência é terminada com o restabelecimento da posição do motor à posição inicial (comando 18).
9. A segunda sequência, em tudo igual à primeira, é terminada com o envio do comando que estabelece a posição do motor (comando 19).

Os controlos enviados para o controlador e as respetivas respostas estão apresentados na Tabela B.1

Tabela B.1: Sequência de comandos, e respetivas respostas, trocados durante o handshake inicial.

Ordem	Função do Comando	Comando Enviado (Computador)	Resposta Recebida (Controlador)
1	Util Set Intelligent Mode	248	Nada
2	Util Re-Boot If Hung	222	Nada
3	Util Where Am I	Espaço	*\x1bY \x1bJ BOOT VER: V2.4\x1bY! Press [ENTER] \r
4	Util Startup Intelligent Mode	247	=
5	Util Start Main Program	O2000\x00	*
6	Util Where Am I	Espaço	F
7	Motor Set Speed	B0,1000,24000,1150\r	o
8	Motor Init	A	o
9	Acc Shutter Close	X0\r	o
10	Motor Read Position	H0\r	o0\r
11	Motor Read Position	H0\r	o0\r
12	Motor Limit Status	K	o0\r
13	Motor Move Relative	F0,-20000\r	o
14	Motor Busy Check	E	oq até enviar oz
15	Motor Limit Status	K	o0\r
16	Motor Read Position	H0\r	o-20000\r
17	Motor Limit Status	K	o0\r
18	Motor Move Relative	F0,20000\r	o
19	Motor Set Position	G0,posição\r	o

B.2 Descrição do Processo de Varrimento

A aquisição de um espectro de Raman, segue os seguintes passos, quando se utiliza um detetor monocanal:

1. O controlador recebe o comando para fechar o shutter. Logo a seguir pede a posição (em passos) do motor do monocromador. É também verificado se não são ultrapassados nenhuns limites do movimento do motor.
2. Seguidamente, é enviado um número de passos que permite posicionar o motor de acordo com a posição que permite iniciar o varrimento. Em consequência é enviada uma sequência de comandos para verificar a realização dos passos do motor até que este termine o movimento (resposta oz do comando E). Segue-se uma sequência dos comandos 'E' e 'K', comandos(5 e 6) alternados. Após esta sequência tem-se o envio de 2 comandos 'E' e 1 comando 'K' (comandos 7, 8 e 9).
3. É questionado ao controlador a posição do motor. Após verificação e confirmação de não ultrapassagem de limites é enviado o número de passos que permitem a correção devido a backlash.
4. É executada nova sequência de comandos que permite verificar o estado do movimento do motor. Assim que o motor termina o movimento é verificado se há problemas relativamente aos limites do movimento.
5. Antes de se iniciar o varrimento, é pedido novamente a posição (em passos) do motor, e é ordenada a abertura do shutter.
6. A realização do varrimento que permite obter o espectro de raman, tem a seguinte sequência:
 - (a) Envio do comando com o número de passos a incrementar, após conversão, a posição do motor (comando 19) de acordo com o incremento introduzido pelo utilizador.
 - (b) Verificação do estado do motor até que este termine o movimento
 - (c) Verificação da não violação de limites
7. Após o último incremento, e aquisição do último ponto, é fechado o shutter.
8. É comunicado ao controlador a ordem de término de movimento do motor, de modo a parar o motor (comando 'L').
9. Por fim, é perguntada a nova posição do motor.

A sequência descrita apresenta-se na Tabela B.2.

Tabela B.2: Sequência de passos executados durante a realização de um varrimento. Os valores utilizados, para a posição e para o incremento de passos do motor, são referentes a um varrimento específico e são utilizados como exemplo.

Ordem	Comando Enviado	Resposta Recebida
1	X0\r	o
2	H0\r	o-7170400\r
3	K	o0\r
4	F0,-220280\r	o
5	E	oq até oz
6	K	o0\r
7	E	oz
8	E	oz
9	K	o0\r
10	H0\r	o-7390680\r
11	K	o0\r
12	F0,20000\r	o
13	E	oq até oz
14	K	o0\r
15	H0\r	o-7370680\r
16	K	o0\r
17	W0\r	o
18	K	o0\r
19	F0,2800\r	o
20	E	oq até oz
21	K	o0\r
22	X0\r	o
23	L	o
24	H0\r	o-7171880\r

Apêndice C

Desenhos dos Raios Geométricos

Os diagramas dos raios óticos ao longo da sua propagação são apresentados, de acordo com ótica geométrica e utilizando o programa de simulação OpticalRayTracer, na Figura C.1 e na Figura C.2.

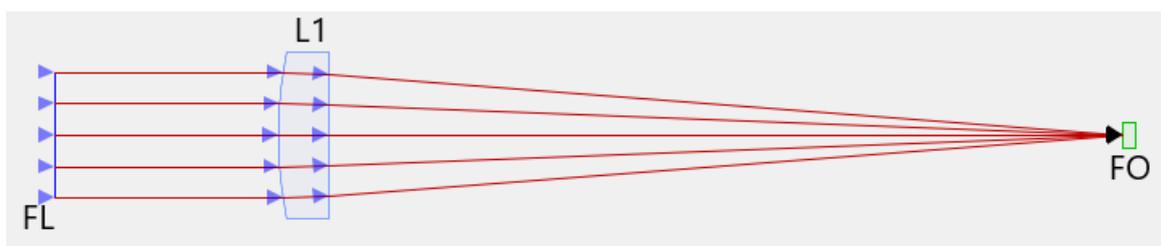


Figura C.1: Diagrama dos raios óticos no acoplamento do feixe laser à fibra ótica. A escala é de 4,33:1 mm. Legenda: FL - Feixe laser; L1 - Lente plano convexe de focagem na fibra; FO - Fibra ótica.

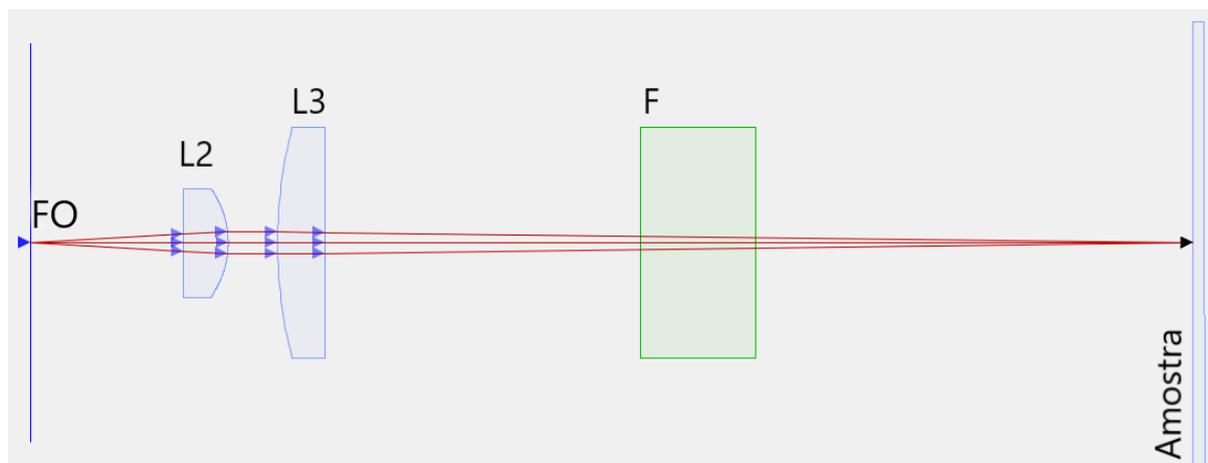


Figura C.2: Diagrama dos raios óticos na incidência do feixe laser da fibra ótica na amostra. A escala é de 4,17:1 mm. Legenda: L2 - Lente plano convexe de colimação; L3 - Lente plano convexe de focagem na amostra; F - Filtro passa-banda; FO - Fibra ótica.

O percurso dos raios óticos, no interior do monocromador, também é apresentado na Figura C.3, percurso inicial, e Figura C.4, o percurso com CCD.

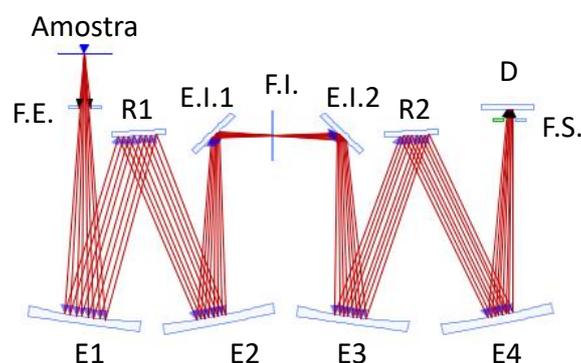


Figura C.3: Diagrama dos raios óticos no interior do duplo monocromador, com detecção monocanal. Desenho não feito à escala. Legenda: F.E. - Fenda de entrada; F.S. - Fenda de saída; E1 - Espelho de colimação do primeiro monocromador; E2 - Espelho de focagem do primeiro monocromador; E3 - Espelho de colimação do segundo monocromador; E4 - Espelho de focagem do segundo monocromador; E.I.1 - Espelho de desvio para a fenda intermédia; E.I.2 - Espelho de desvio da fenda intermédia para o segundo monocromador; F.I. - Fenda intermédia; R1 - Rede de difração do primeiro monocromador; R2 - Rede de difração do segundo monocromador; D - Detetor (PMT).

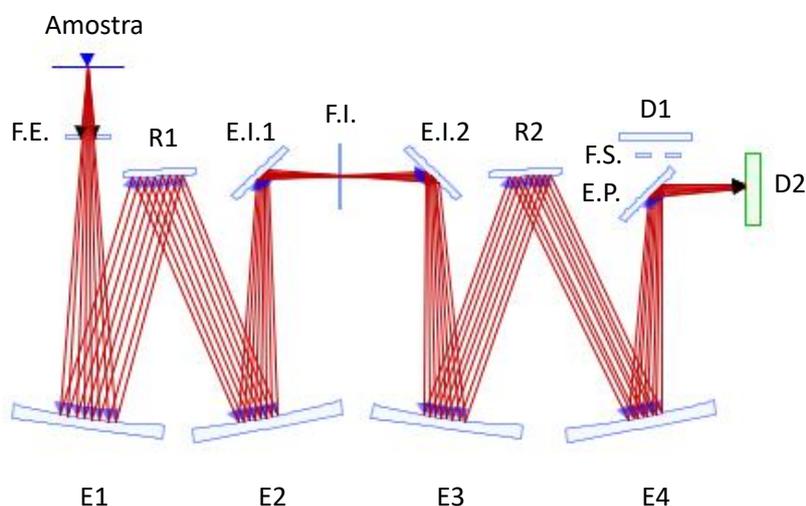


Figura C.4: Diagrama dos raios óticos no interior do duplo monocromador, com adição de detecção multicanal. Desenho não feito à escala. Legenda: F.E. - Fenda de entrada; F.S. - Fenda de saída; E1 - Espelho de colimação do primeiro monocromador; E2 - Espelho de focagem do primeiro monocromador; E3 - Espelho de colimação do segundo monocromador; E4 - Espelho de focagem do segundo monocromador; E.I.1 - Espelho de desvio para a fenda intermédia; E.I.2 - Espelho de desvio da fenda intermédia para o segundo monocromador; F.I. - Fenda intermédia; R1 - Rede de difração do primeiro monocromador; R2 - Rede de difração do segundo monocromador; E.P. - Espelho plano de desvio do feixe; D1 - Detetor (PMT); D2 - Detetor (CCD).

Apêndice D

Otimização da Resolução Espectral a Partir do Espectro de Raman de Ciclo-hexano

D.1 Otimização pela Banda a $801,3 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ do Ciclo-hexano

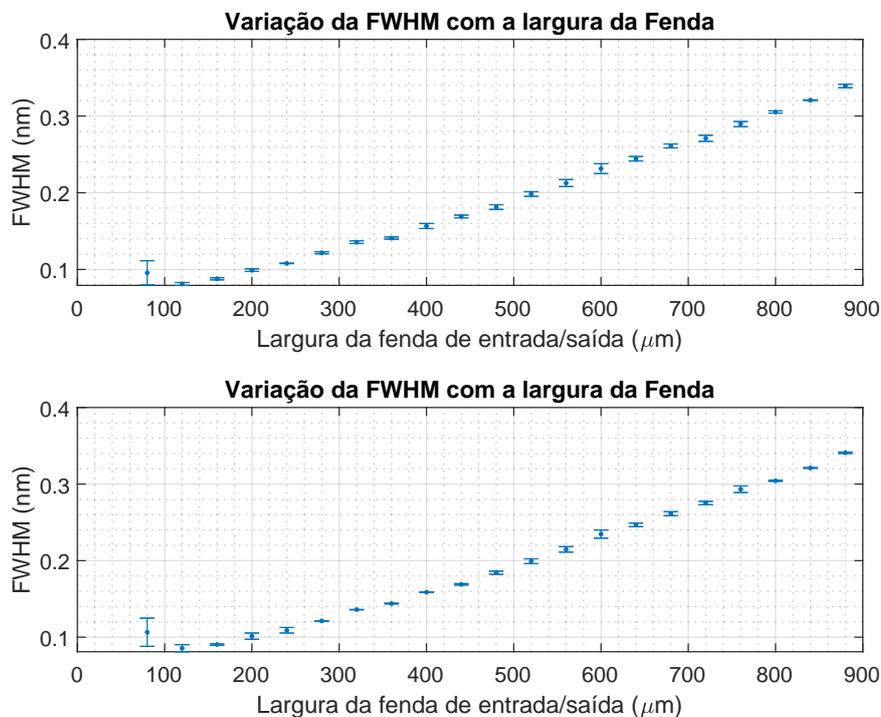


Figura D.1: Curva da variação da FWHM, em nm, com a abertura da fenda de entrada e da fenda de saída, para a banda de $801,3 \text{ } \Delta\text{cm}^{-1}$ do ciclo-hexano.

APÊNDICE D. OTIMIZAÇÃO DA RESOLUÇÃO ESPECTRAL A PARTIR DO
ESPECTRO DE RAMAN DE CICLO-HEXANO

Tabela D.1: Valores da FWHM da Banda de $801,3 \Delta \text{ cm}^{-1}$ do ciclo-hexano, antes e após a filtragem do sinal.

$FWHM_{Original}$ ($\Delta \text{ cm}^{-1}$)	$FWHM_{Filtrado}$ ($\Delta \text{ cm}^{-1}$)	$FWHM_{Original}$ (nm)	$FWHM_{Filtrado}$ (nm)
3,3190±0,5483	3,6970±0,6411	0,0956±0,0158	0,1064±0,0185
2,8167±0,0658	2,9720±0,1600	0,0811±0,0019	0,0856±0,0046
3,0487±0,0483	3,1397±0,0323	0,0878±0,0014	0,0904±0,0009
3,4383±0,0585	3,5190±0,1411	0,0990±0,0017	0,1013±0,0041
3,7457±0,0099	3,7870±0,1255	0,1078±0,0003	0,1090±0,0036
4,2260±0,0456	4,2110±0,0115	0,1217±0,0013	0,1212±0,0003
4,7067±0,0622	4,7227±0,0071	0,1355±0,0018	0,1360±0,0002
4,8933±0,0505	4,9977±0,0172	0,1409±0,0015	0,1439±0,0005
5,4380±0,1145	5,5133±0,0021	0,1566±0,0033	0,1587±0,0001
5,8717±0,0630	5,8703±0,0332	0,1690±0,0018	0,1690±0,0010
6,2977±0,1068	6,3970±0,0707	0,1813±0,0031	0,1842±0,0020
6,8897±0,1049	6,9203±0,1085	0,1984±0,0030	0,1992±0,0031
7,3857±0,1586	7,4577±0,125	0,2126±0,0046	0,2147±0,0036
8,0380±0,2232	8,1507±0,1852	0,2314±0,0064	0,2347±0,0053
8,4870±0,1014	8,5693±0,0810	0,2443±0,0029	0,2467±0,0023
9,0653±0,0901	9,0760±0,0910	0,2610±0,0026	0,2613±0,0026
9,4113±0,1370	9,5587±0,0749	0,2710±0,0039	0,2752±0,0022
10,0543±0,1168	10,1863±0,1500	0,2895±0,0034	0,2933±0,0043
10,6033±0,0499	10,5687±0,0265	0,3053±0,0014	0,3043±0,0008
11,1387±0,0129	11,1510±0,0166	0,3207±0,0004	0,3211±0,0005
11,7820±0,0789	11,8397±0,0327	0,3392±0,0023	0,3409±0,0009

D.2 Otimização pela Banda a $2852,9 \Delta cm^{-1}$ do Ciclo-hexano

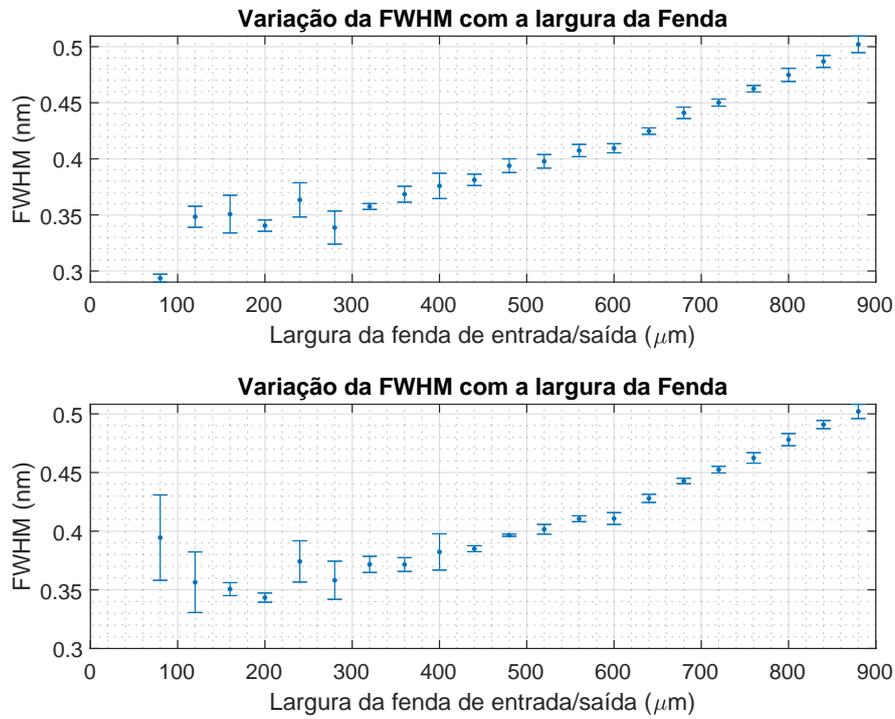


Figura D.2: Curva da variação da FWHM, em nm, com a abertura da fenda de entrada e da fenda de saída, para a banda de $2852,9 \Delta cm^{-1}$ do ciclo-hexano.

APÊNDICE D. OTIMIZAÇÃO DA RESOLUÇÃO ESPECTRAL A PARTIR DO
ESPECTRO DE RAMAN DE CICLO-HEXANO

Tabela D.2: Valores da FWHM da Banda de $2852,9 \Delta \text{ cm}^{-1}$ do ciclo-hexano, antes e após a filtragem do sinal.

$FWHM_{Original}$ ($\Delta \text{ cm}^{-1}$)	$FWHM_{Filtrado}$ ($\Delta \text{ cm}^{-1}$)	$FWHM_{Original}$ (nm)	$FWHM_{Filtrado}$ (nm)
8,0760±0,0970	10,8495±1,0005	0,2936±0,0035	0,3945±0,0364
9,5817±0,2578	9,8047±0,7104	0,3484±0,0094	0,3565±0,0258
9,6467±0,4628	9,6423±0,1521	0,3507±0,0168	0,3506±0,0055
9,3647±0,1381	9,4453±0,1076	0,3405±0,0050	0,3434±0,0039
9,9960±0,4193	10,2930±0,4832	0,3634±0,0153	0,3742±0,0176
9,3163±0,4060	9,8520±0,4475	0,3387±0,0148	0,3582±0,0163
9,8343±0,0712	10,2243±0,1896	0,3575±0,0026	0,3717±0,0069
10,1350±0,1949	10,2203±0,1620	0,3685±0,0071	0,3716±0,0059
10,3393±0,3103	10,5157±0,4253	0,3759±0,0113	0,3823±0,0155
10,4880±0,1394	10,5917±0,0698	0,3813±0,0051	0,3851±0,0025
10,8343±0,1678	10,9083±0,0264	0,3939±0,0061	0,3966±0,0010
10,9417±0,1665	11,0473±0,1140	0,3978±0,0061	0,4016±0,0041
11,2053±0,1509	11,2933±0,0686	0,4074±0,0055	0,4106±0,0025
11,2610±0,1114	11,2987±0,1387	0,4094±0,0041	0,4108±0,0050
11,6823±0,0782	11,7713±0,0956	0,4247±0,0028	0,4280±0,0035
12,1300±0,1408	12,1790±0,0632	0,4410±0,0051	0,4428±0,0023
12,3807±0,0866	12,4443±0,0782	0,4501±0,0031	0,4525±0,0028
12,7210±0,0802	12,7200±0,1230	0,4625±0,0029	0,4625±0,0045
13,0607±0,1617	13,1487±0,1428	0,4749±0,0059	0,4781±0,0052
13,3900±0,1464	13,5017±0,0958	0,4868±0,0053	0,4909±0,0035
13,8083±0,2033	13,8100±0,1679	0,502±0,0074	0,5021±0,0061

Apêndice E

Alinhamento do Laser

O laser Innova Coherent 90, aquando do início do projeto, apresentava uma potência ótica variável, entre os 50 mW e os 130 mW, após se executar o alinhamento descrito na secção E.1. Podendo este laser atingir um valor de 1 W de potência ótica, no seu funcionamento normal, verificou-se que existia um desalinhamento entre os espelhos, que se encontram nos extremos do tubo de onde é produzido o feixe laser. De modo a se conseguir atingir a potência máxima realizou-se uma limpeza das componentes óticas do laser. Tal procedimento originou a necessidade de realizar o procedimento de alinhamento dos espelhos descrito na secção E.2 para restabelecer a produção do feixe laser. Este alinhamento necessita que se afine a posição de ambos espelhos para se conseguir obter laser, no entanto, após seguir os passos indicados não se conseguiu restabelecer a produção do feixe laser.

E.1 Alinhamento da Direção do Feixe

O laser, de modo a incidir na amostra com a maior eficiência, necessitou de ser alinhado. O procedimento para o alinhamento do laser inclui a utilização de 4 guias que permitem colocar o feixe laser a incidir corretamente na amostra. O procedimento realizado para o seu alinhamento é descrito a seguir:

1. O início do alinhamento é efetuado com uma peça móvel, que deve ser deslocada ao longo do braço de entrada do feixe laser, que permite verificar a horizontalidade do feixe, como na Figura E.1A. O feixe deve ser manipulado de modo a que mantenha a mesma posição na peça móvel ao longo das diferentes posições da peça. Só após a verificação de horizontalidade do feixe é que se prossegue para a próxima guia.
2. Neste passo, coloca-se o medidor de potência (power-meter) no orifício de entrada do feixe e ajusta-se, através de um parafuso micrométrico, até otimizar a potência

do laser. Para tal verifica-se o valor medido no power-meter. A segunda guia é uma peça de plástico que apresenta um orifício, E.1B. Esta é colocada de modo a que esteja totalmente fixa e encostada na parede da caixa do braço de entrada do feixe. O feixe é deslocado de modo a que esteja centrado no orifício que a peça apresenta. A verificação é realizada observando, perpendicularmente, o feixe laser, utilizando óculos que apresentem uma densidade ótica que permitam a sua segura visualização. Estando o feixe centrado, segue-se para o passo seguinte.

3. Neste passo o laser é alinhado utilizando a terceira guia. A terceira guia consiste num indicador em cruz, que se encontra na estrutura de suporte, Figura E.1C. O alinhamento é realizado através de 3 parafusos micrométricos, que se encontram na base desta estrutura, e que permitem movimentar um espelho que desvia o feixe laser de modo a incidir na amostra. Após o feixe estar centrado com o indicador em 'x', dá-se continuidade ao alinhamento.
4. O alinhamento é terminado quando o feixe se encontra centrado no indicador, também ele com a forma de 'x', presente na guia colocada no local que servirá de colocação da amostra, Figura E.1D. Novamente, fazendo uso de parafusos micrométricos, centra-se o feixe laser no indicador da peça guia, que confirma que o laser está corretamente alinhado.

Após o alinhamento do laser ter sido realizado, pode-se fazer uso do laser de forma regular sem a necessidade de novo alinhamento.

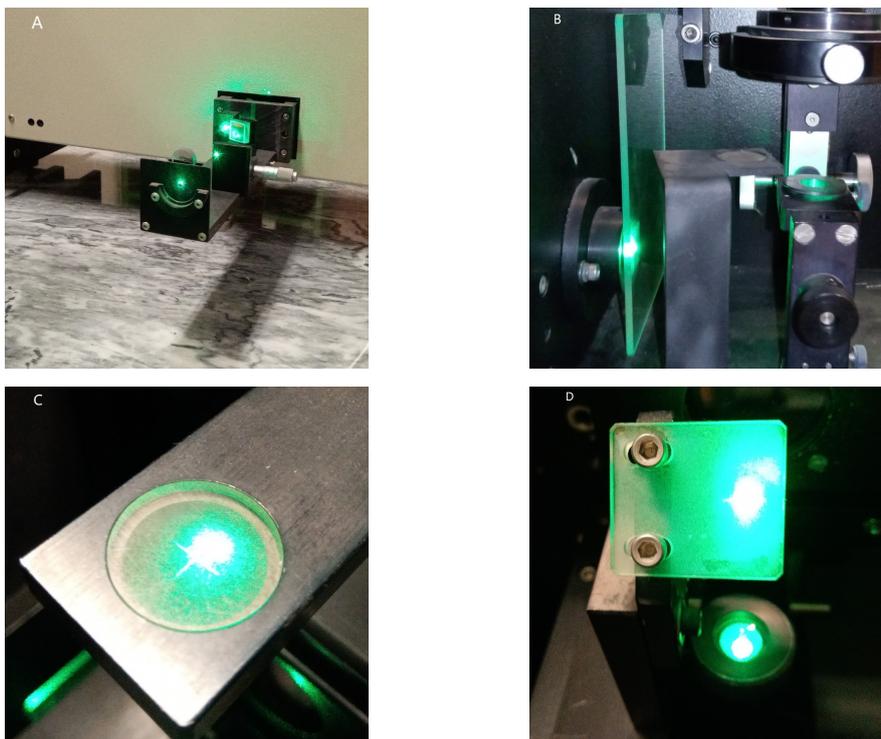


Figura E.1: Guias de alinhamento do feixe laser.

E.2 Alinhamento dos Espelhos

Este alinhamento necessita que se efetue um alinhamento do espelho frontal seguido do alinhamento do espelho da retaguarda. Os passos utilizados neste alinhamento foram os seguintes:

1. Retirar o espelho da retaguarda e remover a cobertura do laser, Figura E.3.
2. Após se iniciar o funcionamento do laser, de modo a se proceder com o alinhamento, aumenta-se a corrente do laser, no controlador, para o valor máximo. Coloca-se a abertura frontal na posição 0, que é a de maior abertura.
3. De seguida colocou-se uma folha de papel milimétrico, fixo na parede, atrás da abertura do espelho retirado.
4. Com duas chave Allen de 1/8" fez-se, lentamente, o ajuste da posição vertical e horizontal, simultaneamente. Ao longo deste alinhamento foi possível verificar uma zona circular, azul, rodeada de anéis, como na Figura E.2. Segundo o manual de utilizador, seria necessário verificar o movimento de luz ao longo do papel, que seria de cor semelhante à vista desde o início do procedimento, pelo que seria difícil de distinguir tal movimento. De seguida, alinham-se os parafusos que permitem o ajuste vertical e horizontal para o brilho máximo. Quando tal acontece, o espelho frontal encontra-se perpendicular ao tubo.
5. De seguida colocou-se, novamente, o espelho da retaguarda. Movimentou-se, através do selector de comprimento de onda, este espelho de modo a que ficasse com uma inclinação para a frente.
6. Para se alinhar este espelho com o tubo e se produzir laser, fez-se mover o espelho, na vertical, com a ajuda de um pin existente na estrutura. Simultaneamente fez-se um varrimento horizontal com o manípulo que controla o parafuso, relativo a este movimento, neste espelho.
7. Quando se verificasse a existência de um flash no tubo, mudando de cor violeta para verde, dever-se-ia terminar o varrimento horizontal e ajustar o manípulo do movimento vertical, existente no seletor de comprimento de onda, para a posição na qual se conseguisse manter a produção constante de feixe.

Após a realização deste alinhamento dos espelhos seria necessário aprimorar o alinhamento para se ter a potência ótica máxima. No entanto, o procedimento utilizado não produziu laser, tendo-se dificuldade em verificar o movimento necessário que confirmasse o alinhamento do espelho frontal. Deste modo não foi possível obter, novamente, o feixe laser.

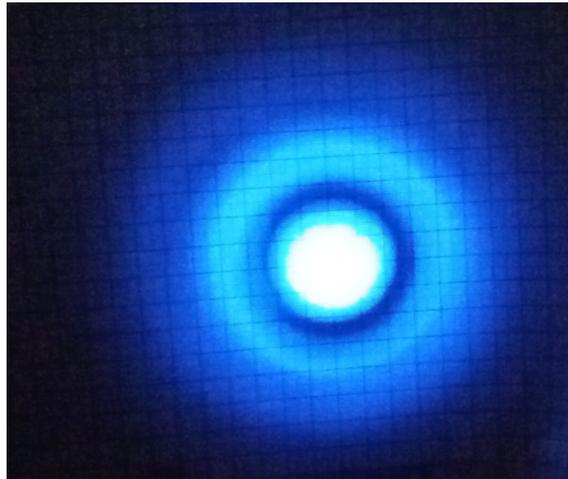


Figura E.2: Visualização da mancha vista no alinhamento do espelho frontal.



Figura E.3: Laser Innova Coherent 90 com a cobertura retirada para alinhamento.



Figura E.4: Visualização dos painéis dos manípulos de controlo da posição dos espelhos. Esquerda: Aberturas dos parafusos de controlo da posição do espelho frontal e saída do feixe laser, ao centro. Direita: Manípulos de controlo da posição do espelho da retaguarda. Legenda: A - Abertura de parafuso de controlo vertical do espelho frontal; B - Abertura para aceder ao parafuso de controlo da posição horizontal do espelho frontal; C - Manípulo de controlo da posição horizontal do espelho da retaguarda; D - Seletor de comprimento de onda/ Manípulo de controlo de posição vertical do espelho da retaguarda; E - Estrutura onde se encontra o espelho da retaguarda; F - Pin de movimento vertical;

Apêndice F

Descrição da Interface do Utilizador

F.1 Interface de Utilizador

O controlo do SPEX Ramalog 1403 é executado através do envio de comandos por uma interface, que funciona em DOS, para o controlador. Um dos objetivos estabelecidos foi o de produzir uma interface que reproduzisse o funcionamento da interface original, com um design mais recente e com a capacidade de funcionar em sistemas operativos atuais.

F.1.1 Descrição do Início da Janela da Interface

O funcionamento da interface inicia-se ainda antes da interface ser visível. Durante o processo de arranque da interface ocorre o *handshake* inicial, como descrito no Apêndice B.1, entre a interface do utilizador e o controlador. O *handshake* termina com um pedido, visível para o utilizador de acordo com a Figura F.1, da posição em que o monocromador se encontra, sendo esta tomada como referência para o início do funcionamento.

De seguida, é apresentada a interface, tendo visível o local onde será apresentado o espectro e três menus, na barra de menus, dos quais só um está ativo. A barra de menus é assim constituída pelos menus *Ficheiro*, *Aquisição*, *Espectro*.

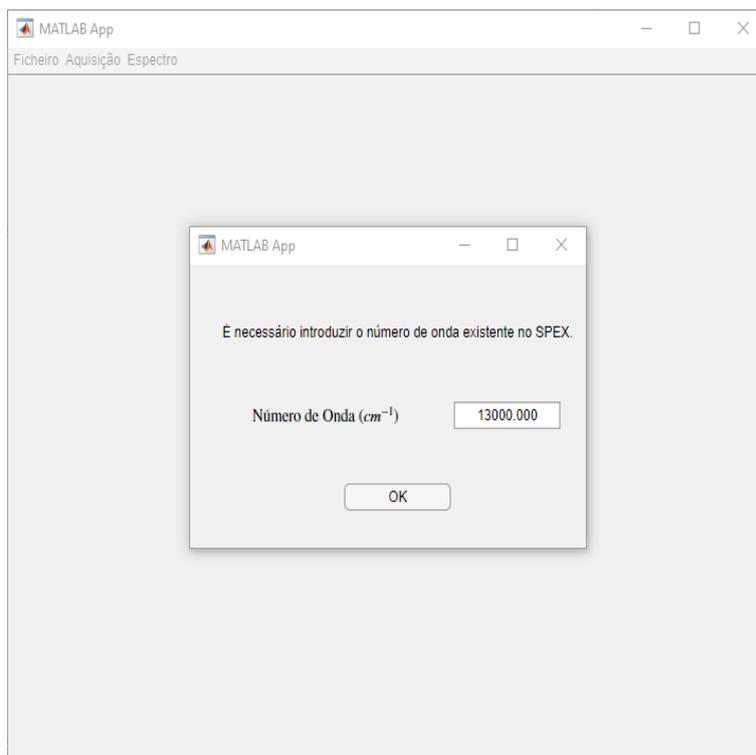


Figura F.1: Janela com pedido de introdução da posição, em número de onda, do monocromador indicada no SPEX.

F.1.2 Menus

F.1.2.1 Menu Ficheiro

É o único menu inicialmente ativo. É através deste menu que o utilizador consegue iniciar o processo de aquisição do espectro, bem como terminar a execução da interface.

Neste menu apresentam-se dois botões:

Guardar: Clicar neste botão abre uma janela que permite escolher o local onde serão guardados os ficheiros com a informação da aquisição, em formato '.txt', bem como atribuir o nome destes ficheiros. Ao indicar o nome e o local onde será armazenado o ficheiro com os dados referentes aos pontos adquiridos durante a aquisição, é criado, simultaneamente, um segundo ficheiro, na mesma localização e no mesmo formato, com os parâmetros de aquisição estabelecidos.

Após ser criado o ficheiro, todos os menus ficam ativos.

Sair: O clique neste botão permite terminar a aplicação, tal como ocorre se se clicar no 'X', existente na barra superior da aplicação. Ao clicar num destes botões, será apresentada uma janela, apresentada na Figura F.2, que permite ao utilizador certificar a ação tomada.

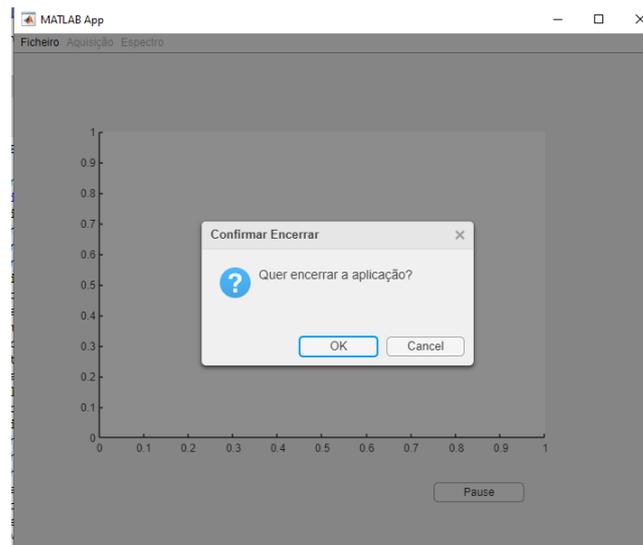


Figura F.2: Janela de confirmação de encerramento da aplicação.

F.1.2.2 Menu Aquisição

O menu de aquisição, está relacionado com o tipo de detetor utilizado para realizar a aquisição do espectro. Deste modo é constituído por dois sub-menus, que permitem escolher entre deteção monocanal e multicanal. Ao selecionar um dos menus tem-se outros sub-menus. No sub-menu Monocanal são apresentados as opções *Alta-Voltagem*, *Parâmetros de Aquisição* e *Iniciar Varrimento*. No sub-menu Multicanal são apresentados as opções *Parâmetros de Aquisição* e *Iniciar Aquisição*.

Os parâmetros de aquisição utilizando o *PMT* são escolhidos na janela apresentada na Figura F.3.

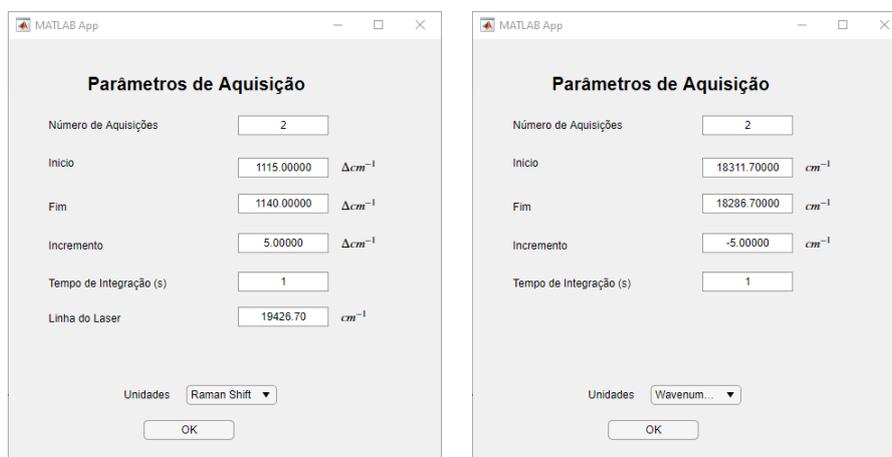


Figura F.3: Janela que permite a escolha dos parâmetros de aquisição, em unidades de *Desvio de Raman* (esquerda) e em unidades de *Número de Onda* (direita).

Nesta janela, tem-se os seguintes parâmetros:

1. **Número de varrimentos:** Permite introduzir o número de aquisições seguidas que se pretende adquirir. Tem-se um intervalo, com um mínimo de uma aquisição, até a um máximo de 99 aquisições.
2. **Início:** É onde se introduz a posição inicial da aquisição. O valor atribuído depende da escolha de unidades de aquisição. Deste modo, em unidades *Desvio de Raman*, não pode ser um valor superior ao do parâmetro seguinte, tendo que estar contido no intervalo de $-9573,3 \Delta cm^{-1}$ a $6426,7 \Delta cm^{-1}$. Em unidade de '*Número de Onda*', sendo que a aquisição é no sentido decrescente de números de onda, este valor tem que ser sempre superior ao do parâmetro seguinte, que é o limite mínimo do novo intervalo, cujo limite superior é de $29\ 000 \text{ cm}^{-1}$.
3. **Fim:** Parâmetro que indica a posição final, no espectro, da aquisição. Tal como o parâmetro anterior, apresenta um intervalo de valores possíveis dependente das unidades escolhidas. Neste, em unidades '*Desvio de Raman*', o intervalo é limitado, inferiormente, pela posição inicial e limitado superiormente pelo valor de $6426,7 \Delta cm^{-1}$. Relativamente a unidades de '*Número de Onda*', o intervalo de valores possíveis, apresenta um valor mínimo de $13\ 000 \text{ cm}^{-1}$ e um valor máximo de $29\ 000 \text{ cm}^{-1}$.
4. **Incremento:** Intervalo de incrementação, em '*Número de Onda*' ou '*Desvio de Raman*', entre cada ponto adquirido. Tem um valor mínimo de $0,0025 \text{ cm}^{-1}$ ou Δcm^{-1} e um máximo que é obtido pela diferença entre os extremos do intervalo constituído pelos valores dos parâmetros anteriores. Sendo a conversão, de '*Desvio de Raman*' para '*Número de Onda*', entre os valores dos extremos do intervalo dependente da linha do laser, o incremento, ao ser alterada a unidade de aquisição, é só o simétrico do valor na unidade anterior.
5. **Tempo de Integração:** Tempo necessário, em segundos, para se adquirir cada ponto. Varia entre os 0,001s e os 160s.
6. **Linha do Laser:** Parâmetro indicativo da linha do laser em número de onda absoluto. Este parâmetro permite converter os valores dos parâmetros anteriores, entre si. No entanto só está visível quando se escolhe, no parâmetro seguinte, a opção de unidades de '*Desvio de Raman*'.
7. **Unidade:** Permite escolher entre duas unidades, *Desvio de Raman* (números de onda relativos à linha do laser) e *Número de Onda* (números de onda absolutos). A escolha da opção permite à interface fazer a conversão entre os valores de cada parâmetro, bem como as respetivas unidades, de modo a que a interface indique a informação correta ao utilizador.

Tendo em conta o software original, a escolha dos parâmetros é ajustada de modo a se ter um número inteiro de pontos a adquirir, e um mínimo de 2 pontos adquiridos. Com efeito, os parâmetros escolhidos pelo utilizador podem, em determinadas situações, não corresponder aos parâmetros finais, para que se tenha um número inteiro de pontos de aquisição, sendo aproximados para o valor mais adequado como já era realizado pelo software original.

A escolha dos parâmetros de aquisição referentes à aquisição com detetor multicanal, são realizados numa janela semelhante apresentada na Figura F.4. Neste, a opção 'Número de Varrimentos' é substituída por 'Número de Aquisições', mantendo-se a funcionalidade. Desaparecem as opções 'Incremento' e 'Tempo de Integração', existindo agora a opção de 'Número de Frames'. Todas as opções que se mantém têm a descrição igual à anterior. A opção de 'Número de Frames' permite escolher o número de imagens que a câmara captura, sendo que se tem um intervalo possível de *frames* de 1 a 4000 *frames*.

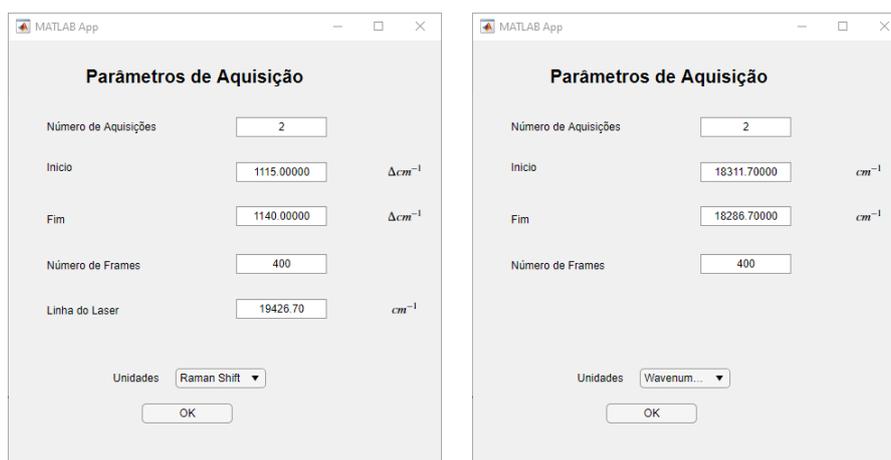


Figura F.4: Janela que permite a escolha dos parâmetros de aquisição, da deteção multicanal, em unidades de *Desvio de Raman* (esquerda) e em unidades de *Número de Onda* (direita).

F.1.2.3 Espectro

O menu indicado por 'Espectro' permite ao utilizador aceder a um conjunto de sub-menus cuja função é a de alterar o aspeto da figura de apresentação do espectro. Com este objetivo, tem-se os seguintes sub-menus:

Grelha: Ao clicar neste botão é possível ao utilizador ativar ou desativar a grelha na figura onde é apresentada o espectro.

Eixos: O clique neste botão abre uma janela que possibilita a introdução de título do gráfico, do eixo x e do eixo y.

Escala: Permite alternar a escala do eixo das ordenadas entre escala linear e escala logarítmica.

Apêndice G

Curvas de Transmissão dos Filtros

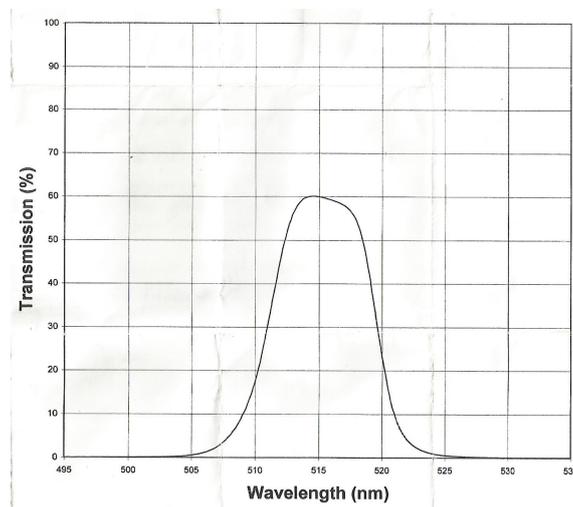


Figura G.1: Gráfico da curva de transmissão do filtro passa-banda.

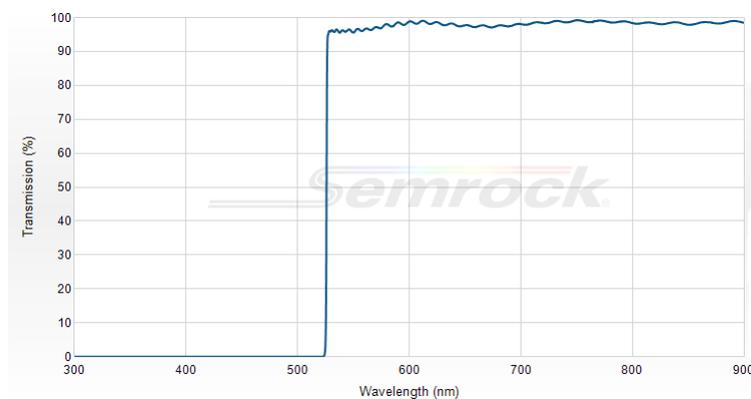


Figura G.2: Gráfico da curva de transmissão do filtro passa-alto.

Apêndice H

Desenhos das Peças CAD

No decorrer do projecto foram utilizadas diversas peças, desenhadas em CAD no Autodesk Inventor Professional 2021, da Autodesk, impressas na impressora Ultimaker 2⁺.

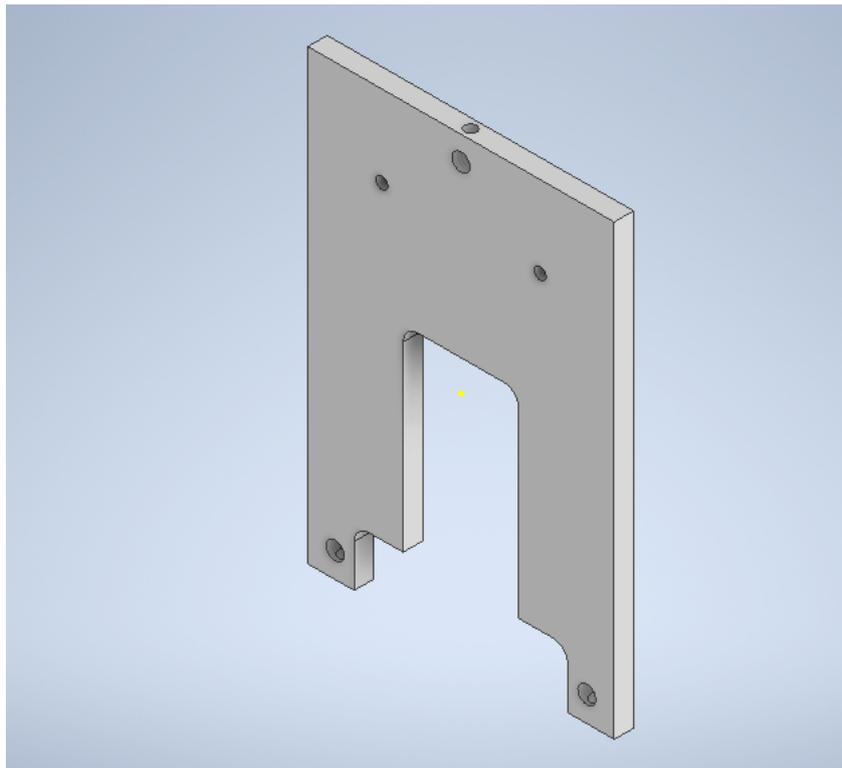


Figura H.1: Desenho em CAD da peça da estrutura inicial utilizada para realizar a geometria de transmissão.

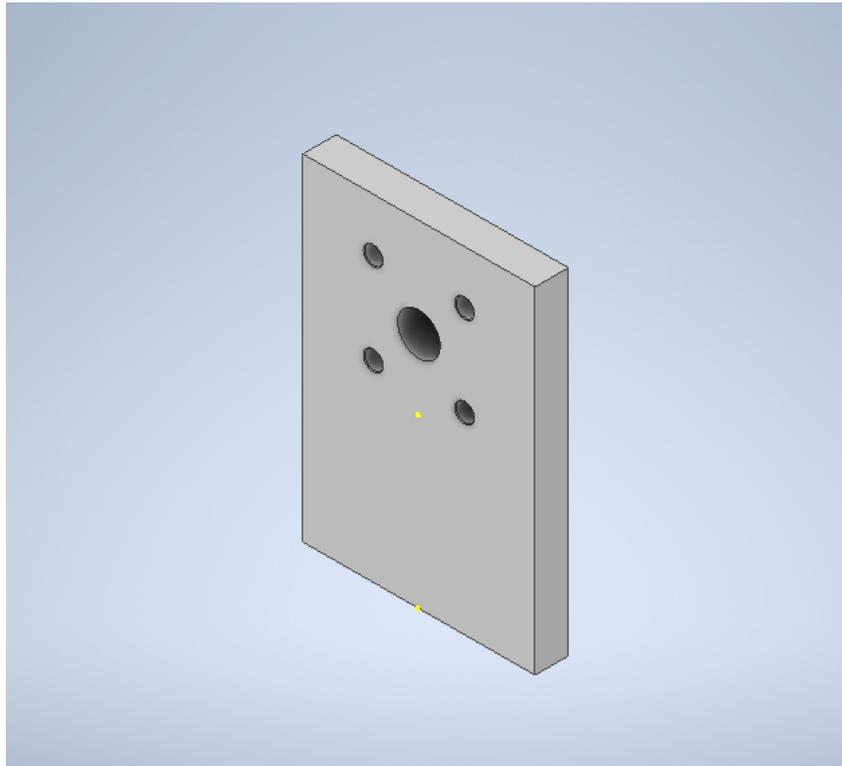


Figura H.2: Desenho em CAD da peça da estrutura inicial utilizada para realizar a geometria de transmissão.

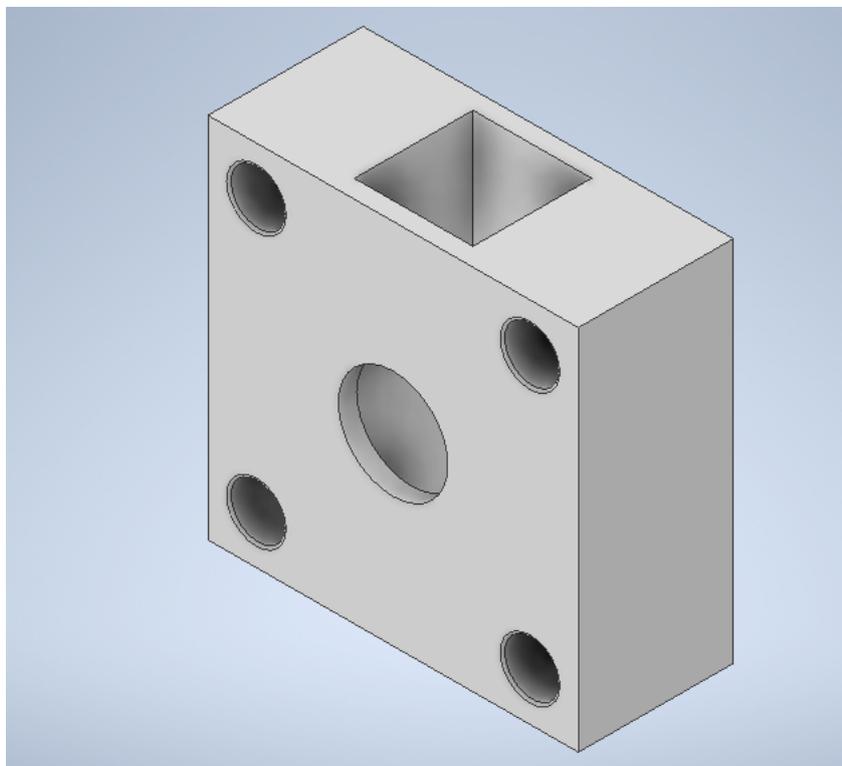


Figura H.3: Desenho em CAD da peça utilizada para colocar cuvettes com a amostra a analisar.

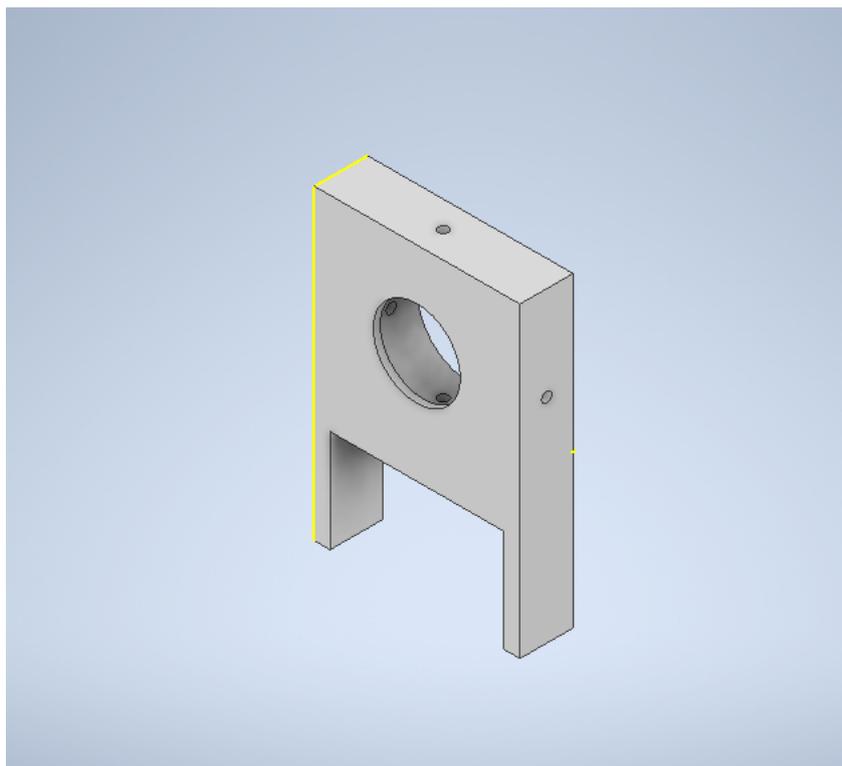


Figura H.4: Desenho em CAD da peça onde é colocado o filtro passa-alto, após a amostra.