
RESUMO

Capítulo 1

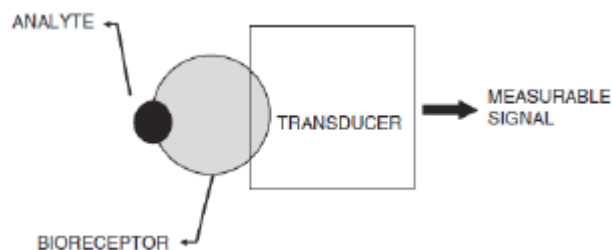
Biossensores

Os sensores podem ser divididos em:

- Sensor físico
 - Mede quantidades físicas
 - Ex: distância, massa, temperatura, pressão, eletricidade, ...
- Sensor químico
 - Dispositivos que respondem a uma ou várias substâncias específicas através de uma reação química
 - Determinação qualitativa e quantitativa dessa(s) substância(s)

Biossensor

- Subgrupo dos sensores químicos
- Converter processos bioquímicos em sinais mensuráveis
- Recetor é biológico ao contrário dos restantes sensores
- Dispositivo de análise/detecção que combina:
 - Componente biológico (biorrecetor)
 - Componente detetor físico/químico (transdutor)



- Analito – composto alvo; é detetado sem recurso a reagentes

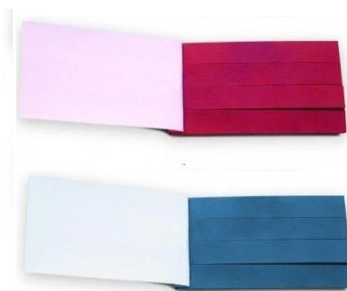
Mercado potencial

Campo	Aplicações
Clínico/Médico	Bancos de sangue, equipamentos médicos, <i>point-of-care</i>
Industrial	Fermentação, controlo de qualidade, deteção de contaminações
Agricultura/Veterinária	Diagnósticos de doenças em plantas/animais, deteção de químicos perigosos, testes à terra/água
Segurança/Defesa	Deteção/diagnóstico de agentes químicos/biológicos nocivos
Ambiente	Deteção de químicos tóxicos, deteção de contaminações
Robótica	Sensores para equipamento automático
Outros	Aplicações de pesquisa e investigação

1^{os} Biossensores

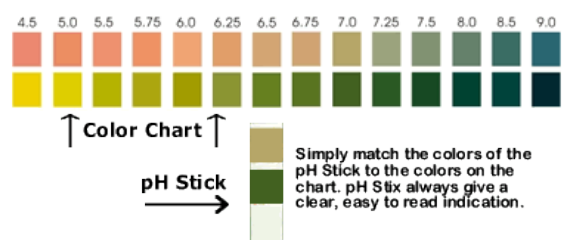
Tira teste de tornassol

- Indica qualitativamente, por intermédio de uma reação colorimétrica, a presença ou ausência de um ácido (azul \Rightarrow básico; vermelho \Rightarrow ácido)
- Sensor: tira azul/vermelha



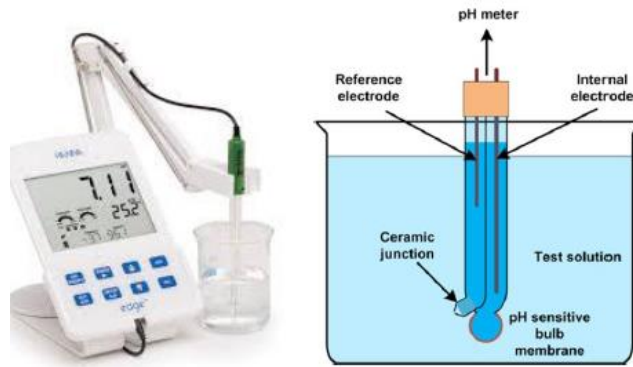
Medida de pH

- Método mais preciso
- Reações colorimétricas utilizando indicadores especiais ou através de tiras de pH
- Sensor: tira ou mistura mais complexa de um corante químico em soluções indicadoras de pH



Medidor de pH

- Melhor método
- Dispositivo eletroquímico que fornece uma resposta elétrica que pode ser lida digitalmente
- Sensor: membrana de vidro



Conversão da resposta química/elétrica

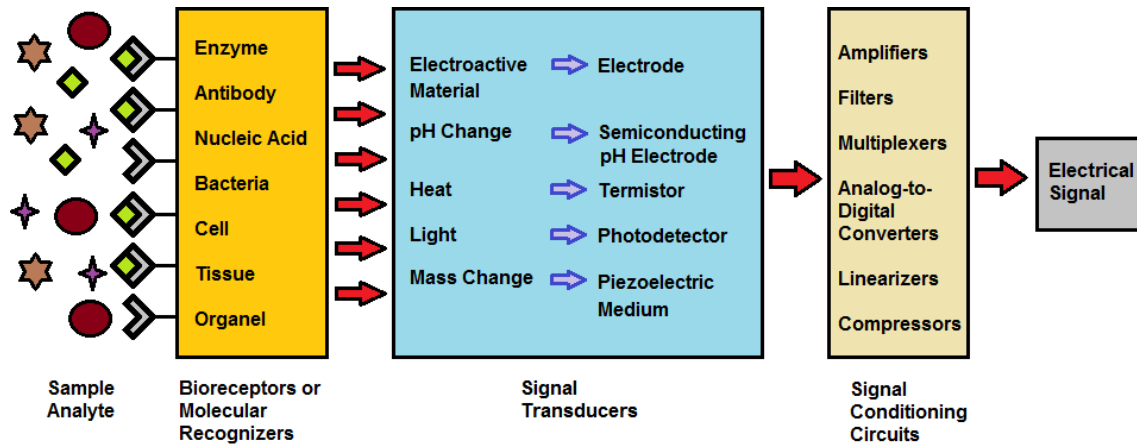
- Tiras reagente
 - Alteração da absorvência de luz visível pela substância \Rightarrow alteração da cor \Rightarrow deteção visual
- Medidor de pH
 - Resposta elétrica convertida no movimento da agulha

Glicose

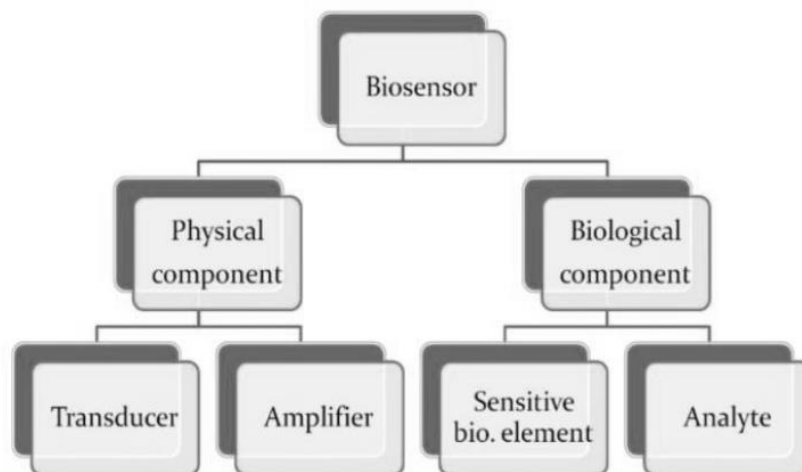
- Biossensor fabricado especificamente para a medição da glicose
- Imersão do sensor na amostra
- Enzima *glicose oxidase* quebra molécula de glicose (oxida a glicose e reduz FAD \Rightarrow FADH₂) e o FADH₂ é de seguida oxidado pelo eléctrodo
- Corrente resultante é uma medida da concentração de glicose
- A enzima é o componente biológico ativo e o eléctrodo é o transdutor.
- Medição caracterizada por:
 - Simplicidade
 - Rapidez
 - Não requer equipamento ou pessoal personalizado

Biossensores

Compostos por:



- Elemento sensível biológico (biorrecetor)
- Transdutor
- Eletrónica



Pode-se medir:

- Concentração de substratos
- Antígenos
- Hormonas
- Drogas
- Inibidores

- Ativadores de enzimas

Sentidos humanos

- Sensores: ouvidos, olhos e dedos
- Biossensores: nariz (cheiros – pequenas quantidades de químicos) e língua

Nariz

- Extremamente sensível e seletivo – difícil de reproduzir artificialmente
- Distingue qualitativamente e quantitativamente
- Químicos \Rightarrow membrana do olfato (detetor biológico) \Rightarrow bolbos olfativos \Rightarrow recetores biológicos \Rightarrow nervos olfativos (transdutor) \Rightarrow sinal elétrico \Rightarrow cérebro (microprocessador) \Rightarrow sensação (cheiro)

Língua

- Funciona de forma semelhante ao nariz

Importância dos Biossensores

- Conhecimento dos processos de transferência eletrónica em sistemas biológicos
- Aplicação dos diferentes biossensores em diagnóstico clínico

Elemento de Identificação dos Biossensores

Elemento de identificação/agentes biológicos/biorrecetores

- Permitem ao biossensor responder seletivamente a substâncias específicas

Podem ser:

- Enzimas
 - Substâncias orgânicas, geralmente de natureza proteica, com funções catalisadoras
 - Diminuição da energia de ativação \Rightarrow aumento da velocidade da reação química
 - *Urease*: $(NH_2)_2CO + H_2O \Rightarrow CO_2 + 2NH_3$; fácil medir a amónia
 - *Glicose oxidase*: oxida a $\beta - D$ – glicose e quebra-a nos seus metabolitos

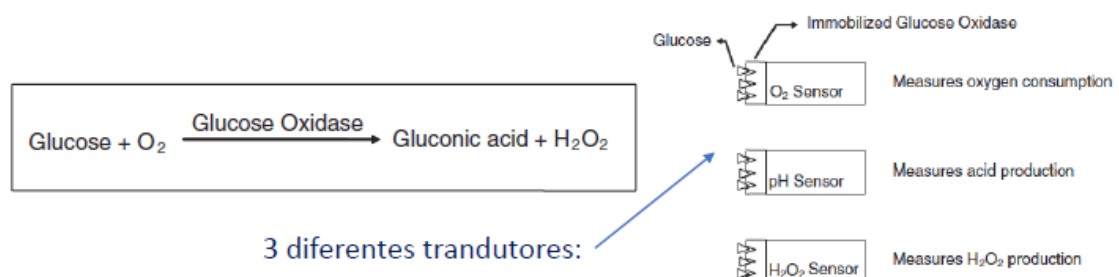
- **Ácido Nucleico**
 - Macromoléculas formadas por nucleotídeos
 - Responsáveis pelo armazenamento, transmissão e tradução da informação genética
 - DNA e RNA
- **Anticorpos, imunoglobulinas ou gamaglobulinas**
 - Glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas
 - Atacam proteínas estranhas ao corpo
- **Microrganismos ou micróbios**
 - Unicelulares ou acelulares (vírus)
 - Agentes patogénicos
- **Simbiose com outros organismos ou com o meio ambiente**
 - Conjunto de células especializadas (não obrigatoriamente iguais), separadas ou não por líquidos/substâncias intercelulares que realizam determinada função
- **Recetores**
 - Proteínas ou glicoproteínas que unem especificamente outras substâncias químicas (moléculas sinalizadoras – hormonas e neurotransmissores)
 - A união da molécula sinalizador com o seu recetor específico desencadeia reações no interior das células

Transdutores

Capacidade de converter um evento de biorreconhecimento num sinal mensurável

Oxidação da glicose

- Pode utilizar até 3 transdutores diferentes



Exemplos de transdutores:

- Térmicos – medidores de temperatura
- Mecânicos – transdutores de pressão, entre outros
- Óticos – densidade luminosa
- Químicos – concentração de gases/iões

Tipos de transdutores mais utilizados nos biossensores:

- Eletroquímico (elétrodos)
 - Medem potencial/corrente elétrica numa célula em função do potencial elétrico aplicado
- Piezoelétrico (microbalança)
- Ótico (fibra ótica)
 - Medição da variação espectralométrica

Desenvolvimento de novos transdutores termométricos com chips bioespecíficos em combinação com detetores de ressonância à superfície

Sistemas de Medição vs Sistemas de Controlo

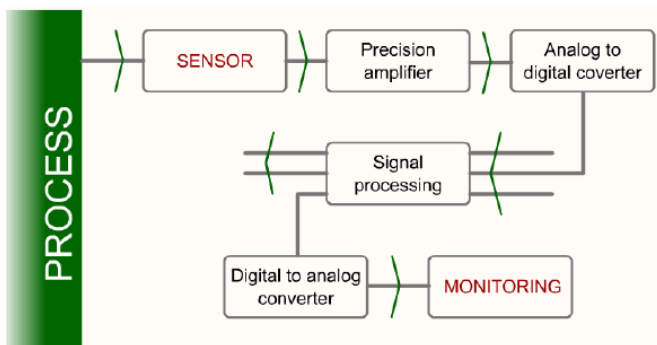


Figura 1 – Sistema de Medição

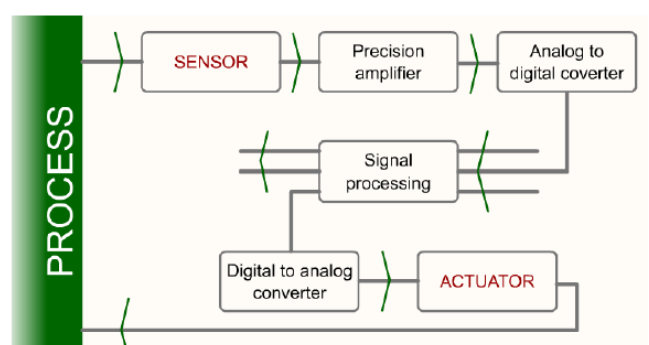


Figura 2 – Sistema de Controlo

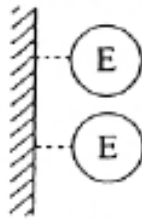
Métodos de Imobilização

Imobilização

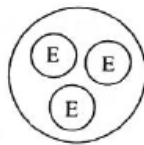
- Ligação e permanência do componente biológico na superfície do biossensor
- Permite o uso repetido da molécula biológica

Métodos de imobilização

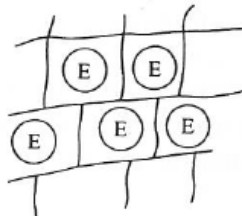
- Adsorção
 - Ligação do componente biológico a uma superfície



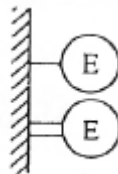
- Microencapsulação
 - Entrelaçamento de membranas (método mais fácil)



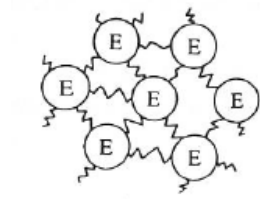
- Oclusão
 - Elemento seletivo é preso numa matriz de gel, pasta ou polímero (muito utilizado)



- Ligação covalente
 - Formam-se ligações covalentes entre o elemento seletivo e o transdutor

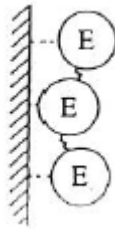


- Reticulação
 - Agente bifuncional liga quimicamente o transdutor ao elemento seletivo (método utilizado com outros, como a adsorção ou o microencapsulamento)



Pode haver combinação de mais de um método

- Adsorção-Reticulação



Fatores de Desempenho

O biossensor ideal pode ser definido com base em várias propriedades

- Seletividade
 - Minimizar interferências químicas
 - Biossensor deve ter elevada afinidade para um único analito
- Sensibilidade
 - Variação do sinal por unidade de concentração de composto
 - Razão dos sinais da amostra e ruído (limite de detecção do biossensor)
- Limite de detecção
 - Concentração mais baixa do analito para a qual existe uma resposta mensurável
- Gama dinâmica
 - Gama de concentrações na qual a sensibilidade do sensor é boa
 - O sinal deverá ser proporcional à quantidade da variação da propriedade físico-química (não deve ser afetado por histerese)
- Tempo de resposta
 - Tempo necessário para ter 95% da resposta
 - Um tempo de resposta lento pode limitar a monitorização/detecção de um composto em tempo real
- Reprodutibilidade

- Precisão com a qual a resposta do sensor pode ser obtida (na ordem dos $\pm 5\%$)
- Estabilidade
 - O biossensor deve ter elevada estabilidade, tanto de armazenagem como operacional
 - O tempo de vida corresponde ao período sem deterioração significativa
- Reutilização
 - Deve ser usado inúmeras vezes para minimizar os custos de fabrico
 - Utilização repetitiva assegura que amostras semelhantes dão respostas similares
- Fácil manuseamento
- Baixo custo

Etapas no Desenvolvimento de Biossensores

1. Seleção de um biorrecetor adequado
2. Seleção de um método de imobilização adequado
3. Seleção e desenho de um transdutor
4. Desenho do biossensor (considerando a gama de medição, linearidade, interferência e sensibilidade)
5. Acondicionamento do biossensor num dispositivo completo

Aplicações

A combinação dos conhecimentos de várias áreas (eletroquímica, bioquímica, física, eletrónica e mecânica) tornou possível o desenvolvimento de biossensores e microbiossensores extremamente específicos, sensíveis, seletivos, precisos e fiáveis

Existem várias substâncias (por vezes com concentrações muito pequenas – na ordem dos nanómetros) para as quais são necessárias análises frequentes e que beneficiaram do desenvolvimento dos biossensores – analitos

Substância (Analito)	Exemplos
Gases anestésicos	N_2O
Gases respiratórios	CO_2, O_2
Gases inflamáveis	CH_4

Gases tóxicos	CO , H_2S , Cl_2 , NH_3
Metabólicos	Glucose, ureia
Iões	H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}
Vapores orgânicos tóxicos	Benzina
Proteínas, ácidos nucleicos	Vários tipos
Microorganismos	Vírus, bactérias, parasitas

Aplicações nos Próximos Anos

Principal área

- Saúde – análises ao sangue e à urina
 - Análises implicam laboratórios de análises clínicas o que torna o processo moroso (não há um diagnóstico fidedigno na hora da consulta)
 - Laboratórios médicos especializados e portáteis (*lab-on-a-chip*) capazes de realizar várias análises
 - Biossensor para uma monitorização contínua do metabolismo – *point-of-care*
 - Biossensor + microeletrónica com sistema de comunicações sem fios
 - Diabetes: quando o nível de glicose atingisse um determinado valor libertar-se-ia automaticamente uma dose de insulina para o sangue do paciente

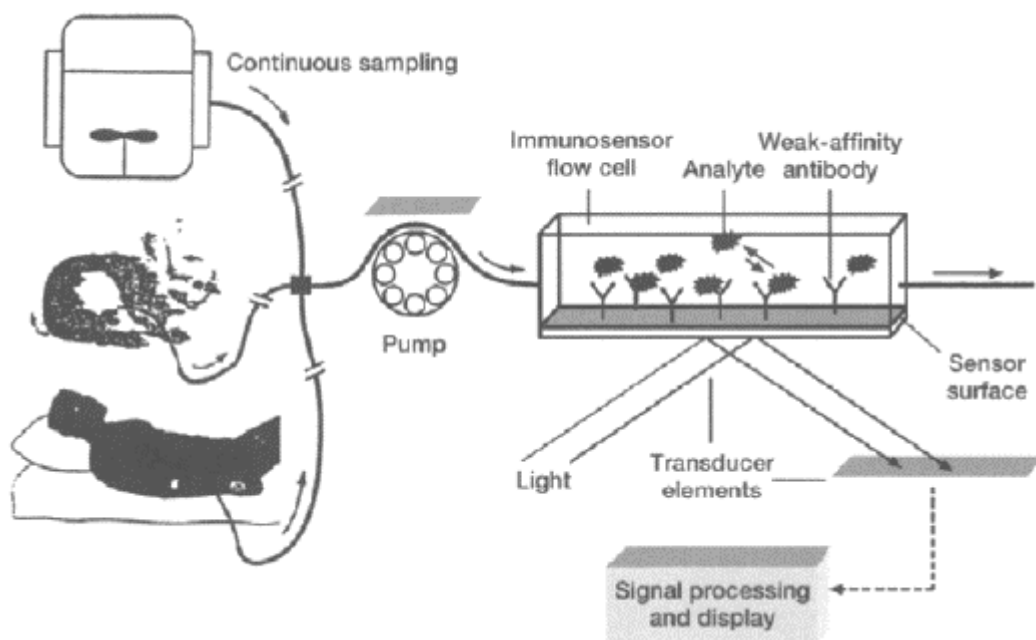


Figura 3 – Setup típico para um biossensor imunológico para monitorização contínua

Outras áreas

- Processo de fermentação
 - Offline num laboratório
 - Offline perto do local de trabalho
 - Online em tempo real (medições de temperatura, pH, CO₂ e oxigénio)
- Açúcar, álcool, levedura (aplicações industriais de comida e bebidas)
 - Aumento da qualidade do produto
 - Aumento da produção
 - Maior automatismo do processo
- Acidez, salinidade, nitratos, cálcio (ar, água, solo)
 - Podem necessitar de monitorização contínua ou aleatória
 - Além da poluição também se aplicam na agricultura, veterinária e exploração mineira

Aplicações mais estudadas

- Detecção individual de moléculas
- Biossensores na ordem dos nanómetros para detetar micróbios/vírus
- *Arrays* para multi-análises (utilização de novos polímeros)
- *Point-of-care* para monitorização de doenças (utilizando biossensores não evasivos)
- Interface entre o sistema nervoso e inteligência artificial – *in vivo neural probes* (biossensores implantáveis)
- Detecção/monitorização de microrganismos no mar

Dificuldades

- O biossensor deve ser parte integral do bioprocesso
- Os biossensores online são submetidos a condições muito rigorosas/severas
 - Os biossensores não podem ser esterilizados
 - Funcionam dentro de uma gama limitada de concentrações de analito
 - Se utilizada uma enzima no processo de deteção, o seu pH ideal pode ser diferente do pH ideal do processo

Questões Capítulo 1

Capítulo 2

Elementos de Identificação dos Biossensores

Enzimas

- Elementos biológicos mais utilizados
- Utilizadas na forma purificada ou presentes em microrganismos/tecidos
- Catalisadoras biológicas de reações específicas – podem ligar-se a um analito específico

Anticorpos

- Ligam-se especificamente ao antígeno correspondente
- Removem o antígeno do centro ativo, não catalisam nenhuma reação
- Biossensores extremamente sensíveis

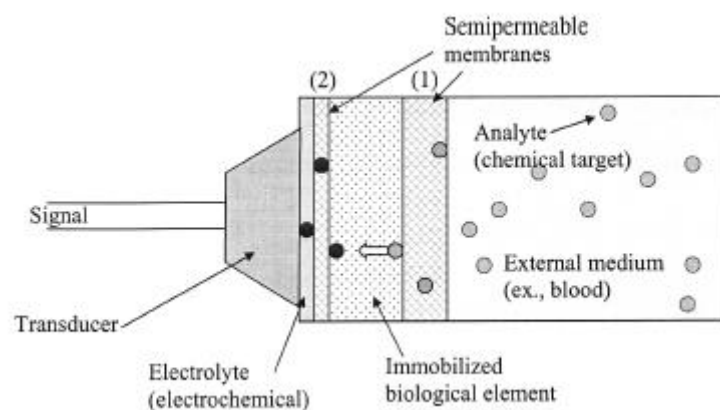
Ácidos nucleicos

- Funcionam seletivamente devido ao emparelhamento de bases complementares
- Elevado potencial na identificação de doenças genéticas

Recetores

- Proteínas que atravessam a membrana plasmática
- Têm propriedades de reconhecimento celular
- Difíceis de isolar, mas graus de especificidade semelhantes a anticorpos

Elementos Biológicos



- Por vezes são utilizadas membranas semipermeáveis para diminuir as espécies sem interesse que chegam ao biorrecetor

Classes de Biossensores

Biossensores catalisadores

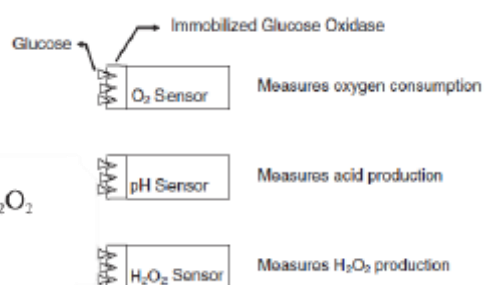
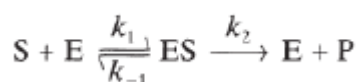
- Dispositivos que medem concentrações de uma espécie (em estado estacionário) devido a uma reação biocatalítica
 - Enzimas
 - Microrganismos
 - Tecidos
- Catálise – alteração da velocidade de uma reação química devido à adição de um catalisador

Biossensores de afinidade

- Dispositivos nos quais os analitos se ligam irreversivelmente a moléculas recetoras, provocando uma alteração físico-química que é detetada pelo transdutor
 - Anticorpos
 - Ácidos nucleicos

Enzimas

- Substâncias orgânicas, geralmente de natureza proteica, com atividade intra ou extracelular cujo objetivo é diminuir a energia de ativação da reação química
- Têm estruturas 3D complexas que se encaixam num analito em particular
- Transformam o substrato em produto, mas no fim da reação encontram-se inalteradas
- Tanto os reagentes consumidos como os produtos formados podem ser detetados através de diferentes transdutores\
- Oxidorredutases – classe especialmente fértil que catalisa reações com transferência de eletrões cuja atividade está dependente de uma coenzima ou cofator



- Oxidase – enzimas que transferem hidrogénio para o oxigénio

- Desidrogenases – enzimas que transferem hidrogénio para um recetor que não o oxigénio molecular (NAD⁺, substratos)
- Peroxidases – enzimas que transferem hidrogénio para peróxidos

Vantagens da Utilização de Enzimas em Biossensores

- Ligam-se a um substrato
- São extremamente seletivas
- Têm atividade catalítica, melhorando a sensibilidade
- Atuam razoavelmente rápido
- São os componentes biológicos mais utilizados

Uma enzima catalisa um só tipo de reação química, logo o tipo de enzimas encontradas numa célula determina o tipo de metabolismo que a célula efetua

Desvantagens Da Utilização De Enzima Em Biossensores

- São caras (extrair, isolar, purificar, fonte da enzima)
- Perda de atividade quando são imobilizadas num transdutor
- Perda de atividade (desativação) após um período relativamente pequeno

Aplicações de Enzimas em Biossensores

Diagnósticos clínicos *in vitro*

- Implicam elevado grau pureza – processos complexos e dispendiosos
- Controlo de glicose (diabetes)
 - Biossensor mais intensamente estudado e mais desenvolvido comercialmente
- Controlo de ureia – enzima urease

$$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{urease}} 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$$

 - Transdutor deteta amónia, dióxido de carbono ou elevação de pH
- Tiras de teste
 - Utilização muito simples (pelo próprio paciente) – qualitativamente
 - Evita ida ao hospital/centro de saúde
 - Outros ensaios podem ser quantitativos
 - Resultados com suficiente exatidão – deve ser projetado para o mínimo de resultados enganosos (positivos falsos e falsos negativos)

Tecidos

- Conjunto de células especializadas, iguais ou não, separadas ou não por substâncias intercelulares, que realizam determinada função num organismo multicelular
- Geralmente contêm uma multiplicidade de enzimas - não são tão seletivos
- Enzimas no seu ambiente natural - menos sujeitas a degradação (biossensores com tempo de vida maior), mas resposta pode ser mais lenta (mais componentes)

Vantagens de Utilização de Tecidos em Biossensores

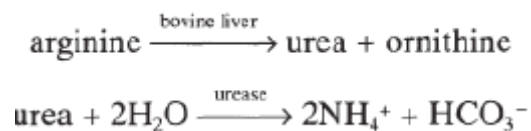
- Os tecidos são mantidos no seu ambiente natural
- A atividade dos tecidos é estável (a alterações de pH e de temperatura)
- Podem funcionar onde as enzimas purificadas falham
- São muito mais baratos que as enzimas purificadas
- Melhores tempo de vida nos biossensores

Desvantagens da Utilização de Tecidos em Biossensores

- Perda de seletividade (pode não ser uma desvantagem caso o objetivo seja estudar várias substâncias)

Aplicações de Tecidos em Biossensores

- Uso de fígado bovino



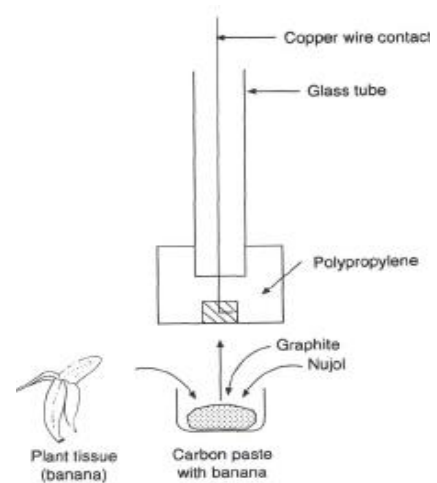
- Uso de fígado de porco



- Pela tabela abaixo percebemos:
 - As enzimas têm a menor sensibilidade (ao contrário das mitocôndrias)
 - As enzimas têm o maior limite de deteção (ao contrário dos tecidos)
 - As enzimas têm a menor gama dinâmica (ao contrário das bactérias)
 - As enzimas têm o tempo de resposta mais rápido (ao contrário das mitocôndrias)
 - As enzimas têm o menor tempo de vida (ao contrário dos tecidos)

Parameter	Enzyme	Mitochondria	Bacteria	Tissue
Slope/mV per decade	33-41	53	49	50
Detection limit/M	6.0×10^{-5}	2.2×10^{-5}	5.6×10^{-5}	2.0×10^{-5}
Linear range/mM	0.15-3.3	0.11-5.5	0.1-10	0.064-5.2
Response time/min	4-5	6-7	5	5-7
Lifetime/days	1	10	20	30

- Biossensor para determinação da dopamina
 - Utiliza o tecido da banana misturado com grafite em pó e parafina líquida e essa mistura é colocada num recipiente que contém um eletrodo, sendo assim formado o biossensor
 - Enzima polifenol (banana) + O_2 catalisa a oxidação da dopamina para quinona



Microorganismos

- Organismos unicelulares (ou acelulares – vírus)
- Grande parte são patogênicos, mas muitos são benéficos para outras espécies (simbiontes) ou para o meio ambiente
- Biossensores para monitorizar processos biotecnológicos industriais

Vantagens da Utilização de Microorganismos em Biossensores

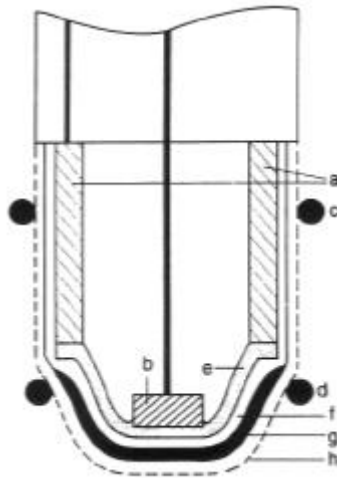
- Fonte barata em comparação com as enzimas isoladas
- Menos sensíveis a inibições de solutos e mais tolerantes a alterações de pH e temperatura
- Tempos de vida longos

Desvantagens da Utilização de Microorganismos em Biossensores

- Por vezes têm longos tempos de resposta
- Têm tempos de recuperação longos
- Menor seletividade (contêm muitas enzimas)

Aplicações dos Microrganismos em Biossensores

- Fermentação do melaço de cana – determinar os açúcares no caldo
- Biossensor de glucose



- (a) ânodo
- (b) cátodo de platina
- (c) e (d) anéis de borracha
- (e) gel eletrólito
- (f) membrana
- (g) micro-organismos retidos na rede de nylon
- (h) membrana de celofane

Anticorpo

- Glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas que atacam proteínas estranhas ao corpo – antígenos – realizando defesa do organismo
- Agentes biológicos mais versáteis
- Extremamente seletivo e muito usados em exames imunológicos

Anticorpos como Elementos Seletivos nos Biossensores

- Vantagens
 - São muito seletivos (podem mesmo ser seletivos entre diferentes estirpes do mesmo material)
 - São ultrasensíveis
 - Ligam-se intensamente
- Desvantagens
 - Não existe efeito catalítico

Ácidos Nucleicos (DNA e RNA)

- Composto químico, de elevada massa molecular, que contem ácido fosfórico, açúcares e bases (purínicas/pirimidínicas) – macromoléculas formadas por nucleótidos
- Funcionamento semelhante ao dos anticorpos – emparelhamento de bases específicas entre cadeias de ácido nucleico
- Probes de DNA podem ser utilizadas para detetar doenças genéticas, cancro, etc
- Envolve a adição de *labelled* DNA ao sistema (como com os anticorpos)
- A classificação pode ser radioativa, enzimática, etc. – larga gama de biossensores
- Outras utilizações
 - Melhoria da produção de enzimas - algumas estão presentes em quantidades muito pequenas, ou seja, difíceis de isolar (Ex: glucose dehidrogenase); solução: técnicas de clonagem – duplicam-se os genes, logo as enzimas
 - Melhoria das propriedades de enzimas: quantidade de enzimas; alterar a dependência de pH, alargar ou reduzir a especificidade ao substrato, ...
- Agentes biosseletivos – rápida expansão do conhecimento sobre os NA/avanços da tecnologia – aumento do nº de aplicações em biossensores

Recetores

- Proteínas ou glicoproteínas que se unem especificamente a moléculas sinalizadoras (hormonas/neurotransmissores)
- Quando ligado a determinado ligante, efetua uma resposta biológica, tais como:
 - Abertura do canal iónico
 - Sistemas de segundo mensageiro
 - Ativação de enzimas
- Tendência a ter afinidade para uma gama de compostos relacionados estruturalmente
- Usados como materiais *labelled*, originalmente com ligandos marcados radioactivamente e mais tarde com fluorescente ou enzimas

Questões Capítulo 2

Um anticorpo é quase sempre totalmente específico para um antígeno. Porque é que esta característica pode tornar-se uma desvantagem?

- Podem ser demasiado seletivos entre diferentes estirpes do mesmo material

Porque é que a resposta de uma enzima se torna não-linear para concentrações analíticas elevadas?

- As velocidades de reação dependem das condições em que as enzimas se encontram e da concentração de substrato. Condições de temperatura elevada, pH extremos ou elevadas concentrações salinas desestabilizam a estrutura da proteína, desnaturando-a. Por outro lado, em geral, um aumento na concentração de substrato tende a aumentar a atividade enzimática.
- A saturação acontece porque, à medida que é aumentada a concentração de substrato, aumenta também a quantidade de enzima presente sob a forma de complexo enzima-substrato (ES). À velocidade máxima, todos os centros ativos estão ocupados (saturados) com substrato, ou seja, não existe enzima livre para ligar mais substrato e a concentração de complexo ES é igual à concentração de enzima

Como é que os recetores diferem dos anticorpos no seu modo de ação?

- Um anticorpo liga-se rigorosamente com o seu antígeno complementar. De facto, um antígeno pode ser induzido a criar o anticorpo correspondente.
- Recetores são como mensageiros que transmitem sinais entre diferentes partes de um sistema biológico. Pode ser um sinal químico e neste caso o recetor pode responder a uma determinada substância química (ou um grupo de químicos).

Capítulo 3

Métodos de Imobilização Dos Elementos Biológicos

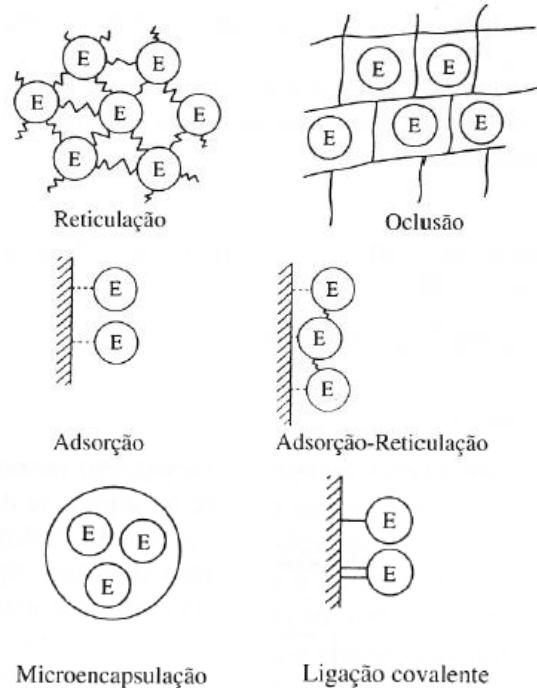
É necessário conhecerem-se:

- As interações físico-químicas envolvidas na ligação biorrecetor – moléculas biológicas
- A razão pela sua especificidade
- Como os controlar
- O melhor proveito a retirar

Imobilização Dos Elementos Biológicos

Para anexar o elemento sensorial ao transdutor são utilizados determinados métodos (isolados ou conjuntamente)

- Adsorção (método mais simples)
- Micro-encapsulamento (mais popular)
- Cilada ou oclusão (numa matriz polimérica)
- Ligação covalente (ligação direta ao transdutor)
- Ligação cruzada ou reticulação (entre moléculas individuais de um determinado material)



O tempo de vida do biossensor aumenta com uma adequada imobilização

Tempos de vida típicos:

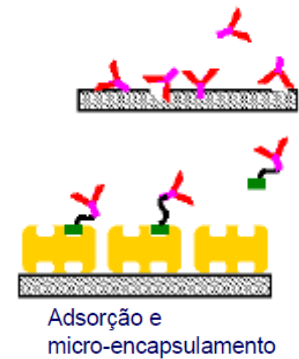
- Adsorção: 1 dia
- “Cilada” ou oclusão com membrana: 1 semana
- Microencapsulamento: 1-4 semanas
- Ligação cruzada: 3-4 semanas
- Ligação covalente: 4-14 meses

Adsorção

- Mais simples e envolve uma preparação mínima

- Ligação é fraca – adequado para trabalhos exploratórios num curto período
- Muitas substâncias adsorvem enzimas nas suas superfícies
- Não há uso de reagentes, não há etapa de limpeza e há menos interrupções nas enzimas

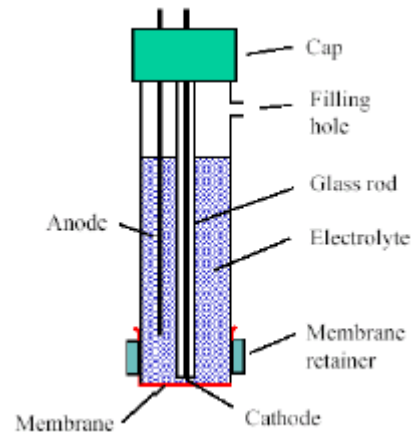
- Pode ser
 - Adsorção direta numa membrana ou transdutor
 - Adsorção em proteínas pré-adsorvidas (adsorção usada em conjunto com outro método) – p.e. Uma enzima é adsorvida na superfície de um eletrodo e depois aí imobilizada com uma membrana ou outra forma de encapsulamento



- Pode ser ainda
 - Física – fraca (formação de ligações *Van der Waals* – polarização elétrica induzida pela presença de outras partículas)
 - Química – mais forte e envolve a formação de ligações covalente
- Modelo de *Langmuir*: descreve a adsorção reversível – derivada de considerações cinéticas, relaciona a fração da superfície com adsorvente e vários parâmetros cinéticos
 - Concentração da superfície – θ em ng/cm² ou $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- O biomaterial adsorvente é muito suscetível a alterações de pH, temperatura, força iónica e ao substrato

Microencapsulamento

- O biomaterial liga-se ao transdutor através de uma membrana inerte
- Não interfere com a ação da enzima e limita a contaminação e biodegradação
- É estável em relação a mudanças de temperatura, pH, força iônica e composição química
- Pode ser permeável a alguns materiais
- Glucose oxidase
 - Existe uma membrana, permeável ao oxigénio e em contacto com um eléctrodo de platina (cathode)
 - A glucose oxidase é então colocada entre essa membrana e uma outra (membrane retainer) como se fosse uma sandwich. O conjunto é permeável tanto ao oxigénio como à glucose
 - Clark cell – 1º biossensor usou esta técnica



Vantagens

- Existe uma ligação forte entre o biomaterial e o transdutor
- É muito adaptável e também muito fiável
- A fiabilidade do biomaterial (enzima) é conseguida devido:
 - Elevado grau de especificidade
 - Existe boa estabilidade a alterações de temperatura, pH, forças iónicas, etc.
 - Limitar contaminações e biodegradações – evita infeções nos pacientes
- Existe sempre a opção de ligar o elemento biológico ao sensor através de moléculas que conduzem eletrões, tais como polypyrrole

Oclusão ou “Cilada”

- Biomaterial + solução de monómero polimerizados num gel, aprisionando o biomaterial (enzima liga-se à matriz)
- Polímero mais comum: *polyacrylamida* (polimerização por radiação UV na presença de vitamina B1); outros materiais – nylon, polímeros condutores, géis silásticos

- Problemas deste método:
 - São criadas grandes barreiras, inibindo assim a difusão no substrato, o que abrandando a reação e de igual modo o tempo de resposta do sensor.
 - Existe perda da atividade enzimática através dos poros no gel, contudo isto pode ser ultrapassado pela ligação cruzada

Ligação Cruzada

- Biomaterial é ligado quimicamente a suportes sólidos ou a outros materiais (gel)
- Usa reagentes bifuncionais – glutaraldeído.
- Desvantagens:
 - Limitação de difusão do substrato e eventuais danos ao biomaterial
 - Resistência mecânica fraca
- Vantagem:
 - Estabiliza biomateriais adsorvidos

Ligação Covalente

- Ligação covalente entre um grupo funcional do biomaterial (não essencial para a ação catalítica) e a matriz de suporte
- Utiliza grupos nucleofílicos para acoplamento – NH_2 , COOH , OH , etc
- Condições para bom funcionamento:
 - Baixa temperatura
 - Baixa força iónica
 - pH neutro
- Objetivo:
 - Ligação covalente → transferência direta e rápida de eletrões → biossensor com bom contacto elétrico (p.e. para elétrodos)

Elétrodos Modificados

Modificar a superfície do elétrodo

- Alterar a sua estrutura
- Cobrir a superfície com um novo material altamente seletivo

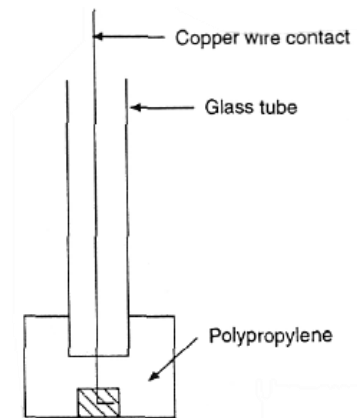
Se o novo material for biológico → biossensor

Modificar superfície antes de adicionar biomaterial → facilita imobilização do elemento biológico

Exemplo de Eléttrodo Modificado

Eléttrodos de pasta de carbono modificados

- Consiste numa mistura simples de grafite em pó com *Nujol* para formar uma pasta rígida
- Simples
- Componente biológico misturado com a pasta pode ser:
 - Eletroativo (p.e. ferroceno – biossensor glicose)
 - Agente complexo – pode extrair analito na superfície da pasta



Exemplos

Modificação da superfície dos elétródos com diferentes polímeros:

- Condutores
 - *Polyacetylene, polipyrrole, polyaniline, polithiophene*
 - Oxidação eletroquímica do substrato na superfície do eléttrodo
 - Solvente → afeta propriedades do polímero/seletividade do biossensor
- Com troca de iões
 - Eléttrodos modificados por filme de ionómero – polímero de cadeia linear ou ramificada contendo grupos ionizáveis ligados covalentemente
 - Invulgar seletividade de troca iónica com grandes catiões hidrofóbicos
 - Polímeros perfluotossulfonato
 - Determinação *in vivo* de substâncias neurotransmissoras - dopamina
- Redox
 - Usada 4-vinilpiridina para polimerizar a superfície – coordenar seletivamente com iões metálicos de transição
 - Iões de ruténio e ósmio – polímeros redox são catalisadores eficazes para outros analitos
 - Polipirrol, poli-N-metilenopirrol e politiofenos → quinonas covalentemente ligadas ao grupo redox

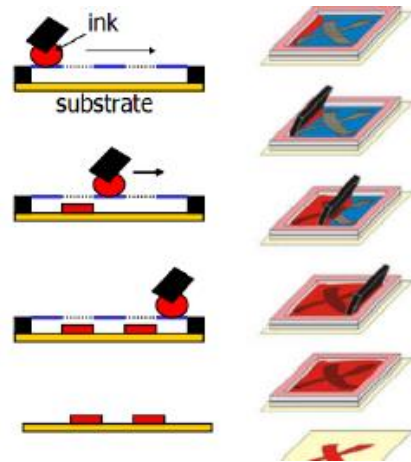
Grupos químicos ligados a estes revestimentos → introduz efeitos eletroquímicos

Screen Printing Electrodes

Processo miniaturizado, versátil, barato e bom para produção em massa → descartável

Screen printing

- Tecnologia baseada em empurrar tinta espessa em suspensão por um padrão num suporte sólido – substrato
- A tinta é baseada em metal/carbono; os substratos podem ser cerâmico ou poliméricos
- Tipicamente, o padrão é feito num único suporte, impossibilitando a produção de um elevado número de elétrodos de uma só vez



Questões Capítulo 3

Qual o melhor método de imobilização para ser utilizado num biossensor comercial?

- Uma estabilidade robusta é essencial para um biossensor comercial, combinada com a reprodutibilidade para servir o desempenho requerido pela aplicação. O custo é talvez o menos importante na imobilização de um componente biológico em comparação com outros aspetos tais como: o desempenho do transdutor e a leitura. A ligação covalente parece ser o mais robusto seguido pelo micro encapsulamento (dependendo do biomaterial utilizado). Contudo, se se pretende um sensor descartável o método de oclusão numa matriz polimérica talvez seja o mais adequado (adsorção!!!!).

Porque é que o método de imobilização por adsorção é um método comum mas com utilização limitada?

- Na adsorção as forças que ligam o adsorvente ao adsorvido são muito fracas, consistindo principalmente nas forças de *van der Waals* e também possivelmente algumas ligações de hidrogénio. Estas ligações não são muito estáveis ou permanentes, e assim os tempos de vida dos biossensores feitos deste modo serão limitados.

Qual dos métodos de imobilização estudados é o mais apropriado para a imobilização de anticorpos?

- Os anticorpos são frequentemente fortemente adsorvidos numa superfície, particularmente quando associados com o antígeno correspondente. A modificação da superfície pode melhorar a força desta ligação

E se for para bactérias?

- As bactérias são normalmente imobilizadas em membranas, utilizando a técnica de mico encapsulamento

Capítulo 4

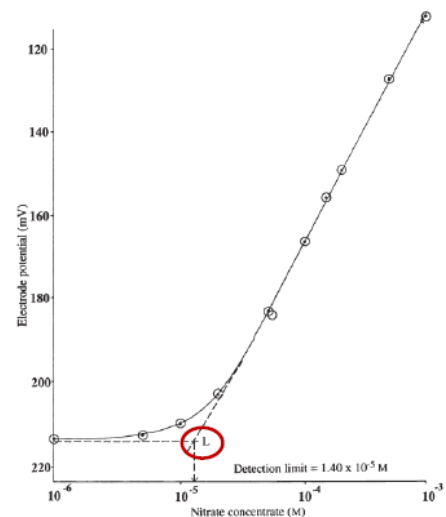
Fatores de Desempenho

Desenvolvimento de novas técnicas → estabelecer critérios de desempenho

Omissão de informação relevante/expressão diferente dos fatores de desempenho → patentes

Critérios para fixar o desempenho de um biossensor:

- Seletividade
 - Interferências químicas devem ser minimizadas
 - Elevada afinidade por um único analito → relacionar sinal com a concentração de composto a analisar com total confiança
- Sensibilidade
 - Variação do sinal por unidade de concentração de composto
 - Razão dos sinais da amostra e ruído – limite de detecção do biossensor (p.e. biossensor eletroquímico não mede concentrações baixas de hormonas)
- Limite de detecção
 - Concentração mais baixa do analito para a qual existe uma resposta mensurável
 - Ponto em que a linha de base cruza a porção linear extrapolada do gráfico
- Gama dinâmica
 - Gama de concentrações na qual a sensibilidade do sensor é boa
 - O sinal medido deverá ser proporcional à variação da propriedade físico-química resultante da reação enzimática e não deve ser afetado por histerese
 - Ponto de vista da calibração – intervalo de concentrações com resposta linear
- Tempo de resposta
 - Tempo necessário para termos 95% de resposta – sistema em equilíbrio
 - Tempo de resposta lento → afeta intervalo/gama de resposta → limita monitorização/detecção em tempo real; varia entre segundos a minutos



- Reprodutibilidade
 - Precisão com a qual a resposta do sensor pode ser obtida (na ordem dos $\pm 5\%$)
- Estabilidade
 - Os biossensores devem ter elevada estabilidade (operacional/armazenagem)
 - Tempo de vida – momento até haver deterioração significativa do desempenho
 - Estudar resposta a amostra padrão ao longo do tempo
 - Enzimas puras → menor estabilidade; preparações teciduais → ↑ tempo de vida
 - Três aspetos do tempo de vida do biossensor: vida útil em uso; vida útil em armazenamento; vida útil do material biológico armazenado separadamente
- Reutilização
 - A reutilização minimiza os custos de fabrico
 - Utilização do mesmo agente biológico → respostas semelhantes
- Fácil manuseamento
 - Permitir medições *in situ* e sem formação
- Custo
 - Custo por teste – torna um biossensor competitivo com as técnicas tradicionais
- Tempo de recuperação
 - Tempo necessário para que o biossensor esteja apto a ser utilizado noutra medição
 - Tempo de recuperação + tempo de resposta = nº amostras analisadas por hora

Fatores que afetam os fatores de desempenho dos biossensores

- Quantidade de enzima
 - A taxa de reação é diretamente proporcional à concentração de enzima (eq. De Michaelis-Menten); demasiadas enzimas para a quantidade de substrato → excesso pode afetar a taxa de transporte (difusão)
- Método de imobilização
 - Métodos químicos (covalentes) → tempos de vida + longos → podem limitar resposta
 - Métodos químicos (covalentes) → danificar enzima → diminuição da resposta
 - Método físico → fracamente ligado → perda mais rápida da enzima
- pH ou buffer
 - O pH ótimo depende do mediador de transferência de eletrões utilizado
 - Pode ser usado um buffer de fosfato a pH 7,4 (pH sangue – ótimo para enzimas)

Biossensores

Principais fatores a considerar quando se projeta um novo biossensor:

- Critérios especiais para a aplicação
- Tomar decisões sobre o elemento seletivo
- Selecionar o transdutor
- Decidir o método de imobilização
- Fatores de desempenho necessários
- Fabrico do dispositivo
- Operação do biossensor
- Testar o biossensor

Capítulo 5

Biossensores Eletroquímicos

Sensores mais relevantes comercialmente:

1. Tiras de teste
2. Detetores eletroquímicos

Vantagens:

- Elevada especificidade, sensibilidade e seletividade
- Tempo de resposta curto
- Preço acessível
- Instrumentação relativamente simples

Áreas:

- Análises clínicas
- Controlo de processos em tempo real (indústria e ambiente)
- Estudos *in vivo*

Biossensor eletroquímico

- Dispositivo integrado autónomo, capaz de fornecer informações analíticas quantitativas utilizando recetores bioquímicos em contato direto com o elemento de transdução eletroquímica

Eletroquímica

- Fenómenos químicos associados à separação de cargas
- Transferência de carga:
 - Homogeneamente em solução
 - Heterogeneamente na superfície do eletrodo
- O eletrodo pode atuar como um dador (para a redução) ou como um recetor (para a oxidação) de eletrões transferidos para ou de espécies em solução

Biossensores Eletroquímicos

- Medição da corrente associada aos eletrões envolvidos num processo de oxidação-redução

- O sinal elétrico é proporcional à concentração de analito; pode relacionar-se com a taxa de produção/consumo do substrato/produto e com o processo de reconhecimento

Existem 3 biossensores eletroquímicos muito utilizados:

- Potenciométricos
 - Medição do potencial da célula utilizando eletrodos não polarizados
- Amperométricos/voltamétricos
 - Medição da curva de corrente-tensão com eletrodos indicadores polarizados
- Condutimétricos
 - Medição da condutância entre 2 eletrodos inertes imersos na solução da amostra

Tipo de Medição	Transdutor	Analitos
1. Potenciométrica	Eletrodo ião-seletivo (ISE)	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻
	Eletrodo de vidro	H ⁺ , Na ⁺
	Eletrodo gasoso	CO ₂ , NH ₃
	Eletrodo metálico	Espécies redox
2. Amperométrica	Eletrodo metálico ou de carbono	O ₂ , açúcares, álcoois
	Eletrodos modificados quimicamente	Açúcares, álcoois, fenóis, oligonucleotídeos
3. Condutimétrica, impedimétrica	Eletrodos interdigitais, eletrodo metálico	Ureia, espécies carregadas, oligonucleotídeos
4. Carga iônica ou efeito do campo	<i>Ion-sensitive field effect transistor</i> (ISFET), FET enzima (ENFET)	K ⁺ , H ⁺

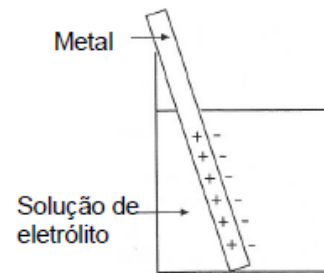
Outros: piezoelétrico (pressão de ondas acústicas); calorimétrico (termistor), ótico (fibra ótica)

Biossensores Potenciométricos

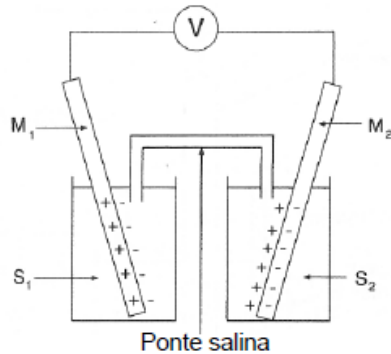
- Medidas com condições de equilíbrio → corrente nula → soma das correntes parciais anódica e catódica, devido as várias reações no eletrodo, nula

Células e Eléttodos

- Potencial
 - Separação de cargas ao longo da interface entre o metal (eléttodo) e a solução
 - Não pode ser medido diretamente → 2 *setups* formam a célula eletroquímica



- Célula Eletroquímica



- As duas metades devem estar ligadas internamente através de uma membrana eletricamente condutora
- Os 2 elétródos estão conectados externamente através de um aparelho que mede a diferença de potencial
- O voltímetro deve ter elevada impedância de entrada para minimizar o consumo de corrente

- O valor medido depende de vários fatores:
 - Natureza dos elétródos (M₁ e M₂)
 - Natureza e concentrações das soluções em cada metade da célula (S₁ e S₂)
 - Ponte salina (potencial de junção líquida através da membrana)

Potencial da célula eletroquímica

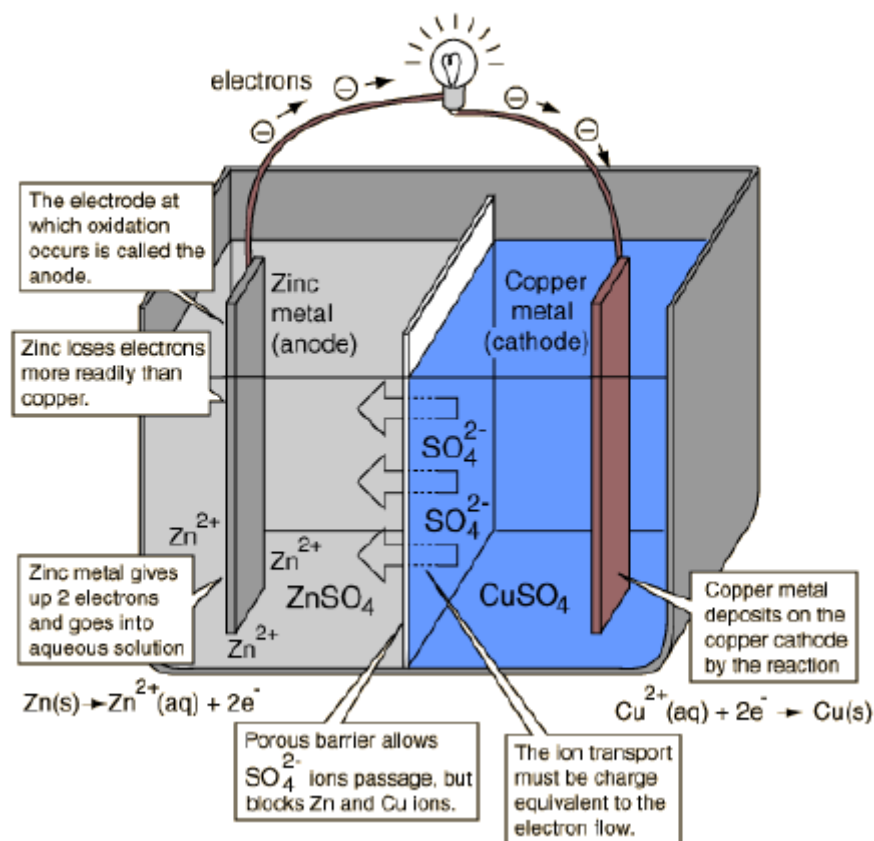
- Calculado a partir dos potenciais de elétródos das meias células

$$E_{\text{célula}} = E_{\text{direita}} - E_{\text{esquerda}}$$

Célula de Daniell – Exemplo Real

A reação pode ser realizada diretamente num tubo de teste, adicionando sulfato de cobre a bocados de zinco



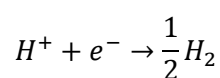


Potencial da Célula Eletroquímica

- Potencial da célula → trabalho máximo (energia máxima – energia livre de Gibbs) que a célula pode fornecer

$$\Delta G = -nFE \quad (\text{J mol}^{-1})$$

- n é o número de eletrões transferidos
 - F é a constante de Faraday (96487 C mol^{-1})
 - E é a força eletromotriz (f.e.m) da célula
- $\Delta G < 0$
 - E positivo e reação ocorre espontaneamente na direção assumida
- $\Delta G > 0$
 - E negativo e reação não ocorre espontaneamente na direção assumida
- Determinar E_{Cu} e E_{Zn} com recurso ao hidrogénio:



- $\Delta G = 0$ para estado *standard* ($[H^+] = 1 \text{ M}$; pressão = 1 atm; $T = 298 \text{ K}$)

$$E_{H^+/H_2} = 0$$

- Definindo uma meia célula com um eléctrodo de hidrogénio



- Então

$$E_{\text{célula}} = E_1 - E_{\text{H}} = +0.34 \text{ V} \quad \longrightarrow \quad E_{\text{Cu}} = +0.34 \text{ V}$$

- Definem-se assim 2 tipos de eléctrodos:
 - Eléctrodo de trabalho – seletivo a determinada molécula iónica
 - Eléctrodo de referência – imerso numa solução eletrolítica estável

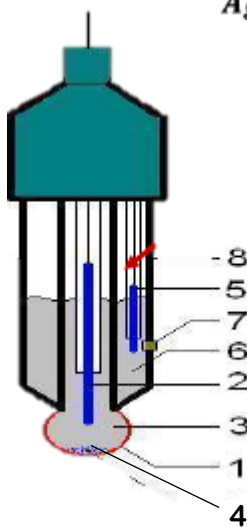
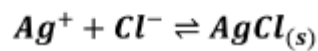
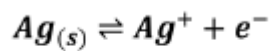
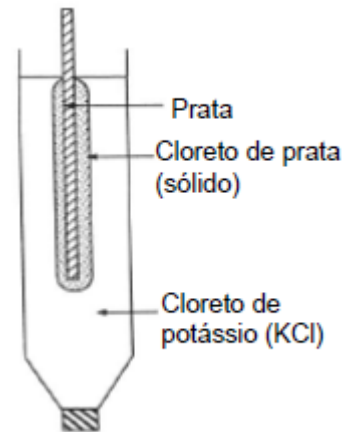
Eléctrodo de Referência

- Utilizados para medir o potencial de outros eléctrodos
- Um bom eléctrodo apresenta as seguintes características
 - Potencial estável com o tempo e temperatura
 - Não alterado por pequenas perturbações do sistema (p.e. passagem de pequena corrente)
- Eléctrodo de hidrogénio → muito reprodutível
- Folha de platina → catalisa a reação de oxidação do hidrogénio
- Deposição da platina → ácido cloroplatínico + acetato de chumbo (para prolongar vida do eléctrodo)
- O hidrogénio é imerso na solução de eletrólito que irá ser utilizada antes de ser introduzido dentro da célula
- Desvantagens do eléctrodo de hidrogénio
 - Gás de hidrogénio a fluir → potencialmente explosivo
- Solução
 - Eléctrodos de referência + facilmente instalados, não-polarizados, com resultados reprodutíveis e baixos coeficientes de variação com a temperatura
 - Eléctrodo prata-cloreto de prata e eléctrodo saturado de calomelano (SCE)

Eléctrodo de Referência – Ag/AgCl

- Fabrico

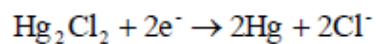
- Fio de prata (ânodo)
- Platina (cátodo)
- Cloreto de potássio (eletrólito)
- Eletrólise ≈ 30 minutos
- Aplicar potencial positivo de 0,5V à prata
- A superfície do metal prata é oxidada obtendo-se íons prata, o que atrai íons de cloreto e formam uma camada na superfície – cloreto de prata



1. Membrana sensível (vidro)
2. Eléttrodo de trabalho (Ag/AgCl)
3. Solução *buffer* (KCl)
4. Precipitado de AgCl
5. Eléttrodo de referência (igual ao eléctrodo de trabalho)
6. Solução *buffer* (KCl)
7. Junção/diagrama
8. Corpo estrutural (vidro não condutivo)

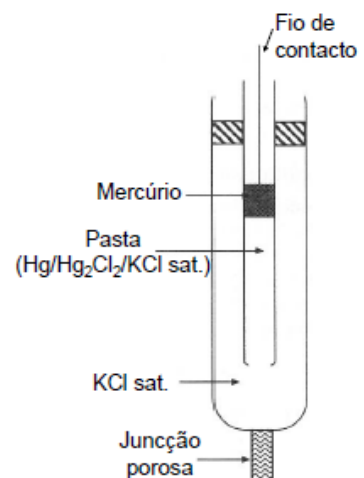
Eléttrodo de Referência – SCE

- Calomelo \rightarrow antigo nome de cloreto de mercúrio \rightarrow moderadamente solúvel em água
- Reação de meia célula



$$E = +0.24 V$$

- Solução saturada de cloreto de potássio \rightarrow dissolver cloreto de potássio em água até saturação \rightarrow concentração constante e reprodutível (sem necessidade de estar sempre a pesar/medir)



Elétrodo de Referência

- Desenvolvidos para soluções aquosas (podem ser utilizados em soluções não aquosas por pequenos períodos pois existe transporte iônico através da placa porosa)
- Têm pequeno orifício, coberto com minúscula placa porosa → liga o elétrodo à solução
- Elétrodos desenvolvidos para solventes não aquosos – $\text{Li}^+ \mid \text{Li}$

Equação de Nernst

- Para aplicações analíticas de potenciometria deve-se considerar o efeito de concentrações diferentes de 1M (ou saturação)
- Cálculo da diferença de potencial um determinado instante

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln Q$$

- R: constante dos gases ($R = 8,31451 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
- T: temperatura em kelvin ($25^\circ\text{C} = 298,2 \text{ K}$)
- Q: expressão da lei de ação de massas da reação
- Para uma reação redox

$$\Delta G = -nFE \quad \text{e} \quad \Delta G^0 = -nFE^0$$

$$-nFE = -nFE^0 + RT \ln Q \quad \rightarrow \quad E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q$$

- n: nº de eletrões transferidos ($n = 1, 2, \dots$)
- F: constante de Faraday (96487 C mol^{-1})
- Q: quociente termodinâmico da reação
- E^0 : potencial da célula em condições standard
- E: potencial da célula
- Substituindo R, T e F

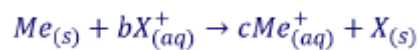
$$E = E^0 - \frac{0.0257}{n} \ln Q \quad \text{ou} \quad E = E^0 - \frac{0.0592}{n} \log Q$$

- Q: quociente das espécies ativas da reação redox



Exemplo

- Durante o funcionamento de uma pilha um metal sofre oxidação e um catião sofre redução



- Como os componentes sólidos não participam nos cálculos por não sofrerem alteração (consideração concentração de 1 M)

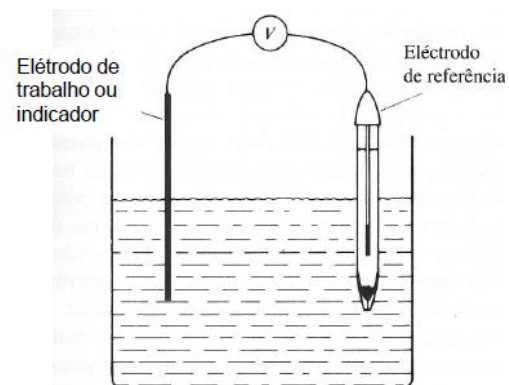
$$E = E^0 - \frac{0.059}{n} \log \frac{[Me^+]^c}{[X^+]^b}$$

Conclusões

- Quanto maior a razão de concentrações maior será a d.d.p. da célula (e vice-versa)
- Quando maior a temperatura maior será a d.d.p. da célula (e vice-versa)

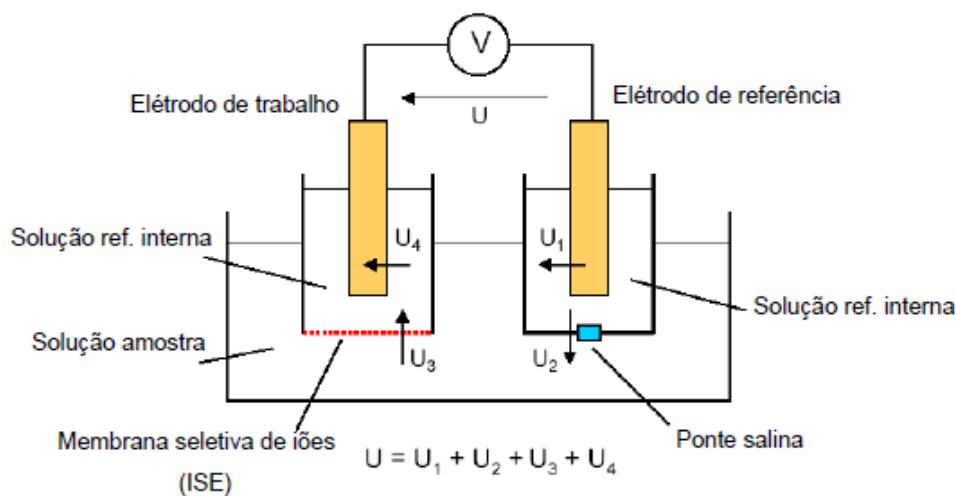
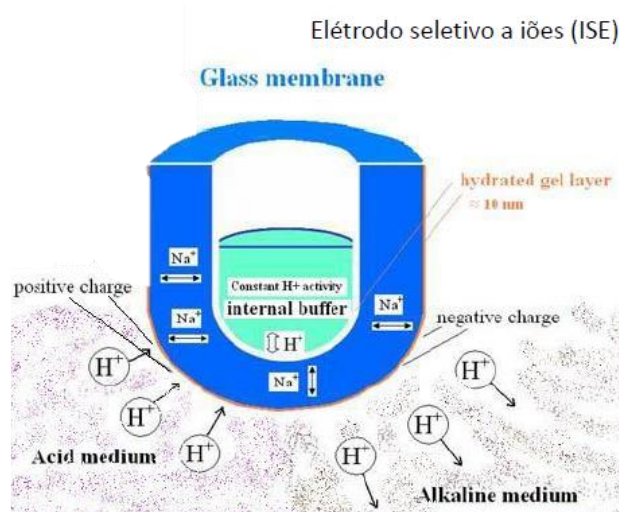
Célula: Medições Potenciométricas

- Para fazer medições potenciométricas (medições no eq.) é necessário
 - Um eléctrodo de trabalho
 - Um eléctrodo de referência
- d.d.p. medida sem polarizar a célula → corrente muito pequena → potencial do eléctrodo ref constante → variações de potencial têm origem no eléctrodo de trabalho que responde às espécies em solução à qual é sensível → é este que é monitorizado
- Ao criar condições para que as reacções secundárias possam ser desprezadas → permite interpretação quantitativa



Eléctrodo Potenciométrico

- Eléctrodo Ag/AgCl – membrana sensível
 - A acumulação de cargas na interface da membrana sensível causa uma transferência de potencial iónico ao longo da membrana



- No eq. não há passagem de corrente
- Quanto maior a distância entre os eléctrodos → maior ruído eléctrico (particularmente em sistemas de fluxo)

Aspectos práticos (ISE)

Precauções para obter resultados consistentes e reprodutíveis (com limite de deteção baixo)

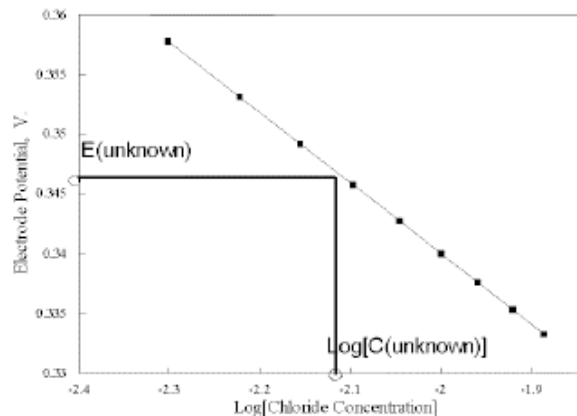
- A resistência iónica tem que ser mantida constante de uma amostra para a outra (adicionando a concentração constante um eletrólito que não interfira na reação)
- Controlo do pH e temperatura
- Adição de componentes que minimizem/eliminem iões que interfiram

Solução

- ISA/TISABS
 - Misturas apropriadas para fornecer as propriedades necessárias às amostras

Gráfico de Calibração: Leitura Direta

- Método mais simples
 - São preparadas uma série de soluções *standard* com *buffers* (ISA)
 - São medidos os potenciais das soluções
 - É feito um gráfico de calibração da tensão vs log(concentração)
- Devem ser realizados regularmente



Adição de Standard

- Depois de ser feito o gráfico de calibração da solução com concentração desconhecida
 - Adiciona-se um standard de elevada concentração (10x maior que os valores esperados) e lê-se as tensões
 - Os dados são ajustados a uma eq. que deve incluir a correção para a diluição do padrão adicionado

Exemplo

- Se C_u = concentração desconhecida em V_u cm³ de solução e C_s = concentração padrão adicionada em V_s cm³ de solução, então

$$E_1 = K + S \log C_u \quad \text{e} \quad E_2 = K + S \log (C_u V_u + C_s V_s) / (V_u + V_s)$$

- Subtraindo $E_2 - E_1$ temos:

$$E = S \log \left\{ C_u / [(C_u V_u + C_s V_s) / (V_u + V_s)] \right\}$$

$$C_u = \frac{C_s}{10^{E/S} [1 + (V_u / V_s)] - V_u / V_s}$$

- $S(\text{slope}) = 2,303RT/zF \rightarrow$ a constante 2,303 vem da passagem de ln para log
- $K = E^0$

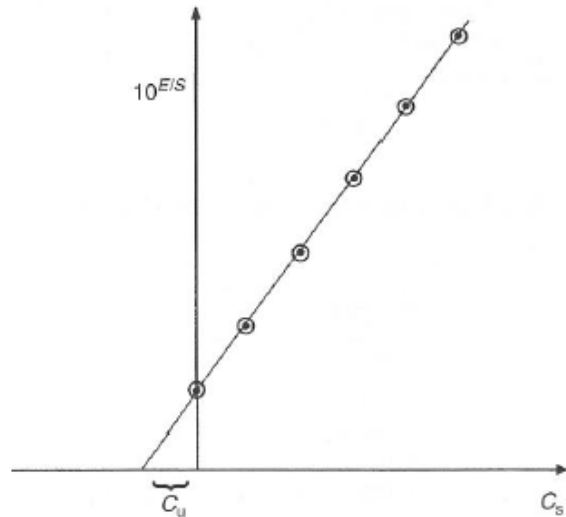
Adição Múltipla de Standards (Gran Plot)

- São feitas várias adições de standard (5 ou mais)

$$E = K + S \log(Cu + Cs)$$

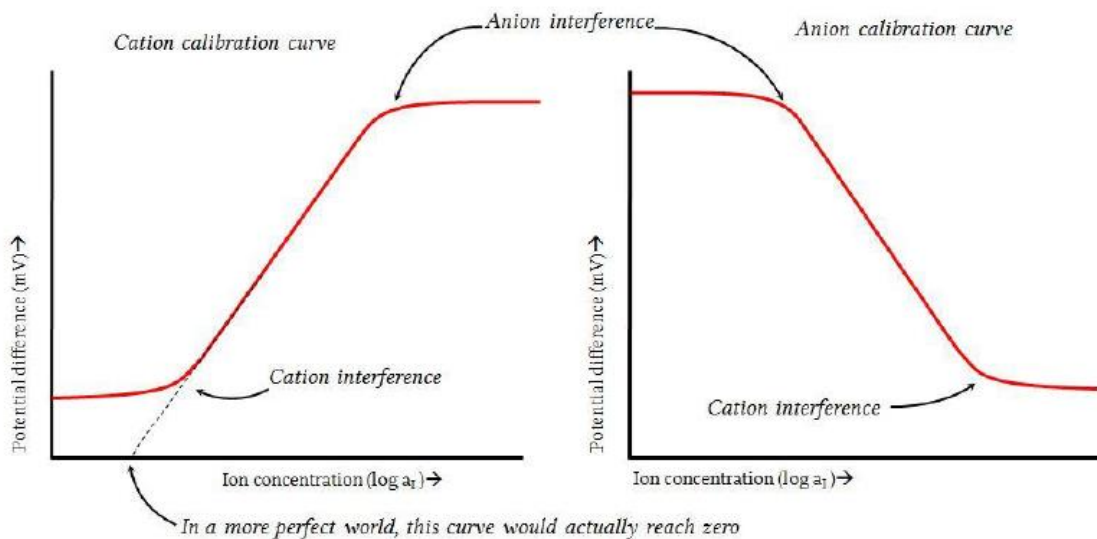
$$\frac{E}{S} = \frac{K}{S} + \log(Cu + Cs)$$

$$10^{E/S} = K'(Cu + Cs)$$



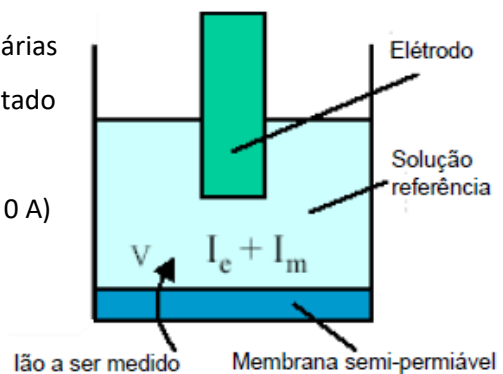
- C_s representa a concentração de standard em cada adição
- $K' = 10^{K/S}$
- Quando $10^{E/S} = 0 \rightarrow Cu = -Cs$

Curvas de Calibração



Eléttrodo Seletivo a Iões

- Eléttrodo seletivo a iões \rightarrow reações secundárias desprezadas $\rightarrow E_{eq}$ pode ser interpretado quantitativamente
- Geralmente são potenciométricos (corrente $\cong 0$ A)



- A solução referência contém 2 iões diferentes:
 - Ião ao qual o eléctrodo interno é reversível (I_e)
 - Ião medido (I_m)
- Seletividade na passagem de espécies da solução externa para a de ref → induz ddp → depende da razão das atividades dos → eq. Nernst
- A diferença de potencial (E) através da membrana para um ião, i, de carga z é

$$E = \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{a_2}{a_1}$$

- Se a atividade do analito é constante na fase 1, na fase 2

$$E = \text{constante} + \frac{RT}{z_2 F} \ln a_2$$

- O potencial da membrana é ditado pela atividade do ião alvo, mas também pela atividade de outros iões secundários (porque membrana não é totalmente seletiva)
- A influência da presença de espécies interferentes (eq. Nikolski-Eisenman)

$$E = \text{constante} + S \times \log(a_x) + \frac{z_x}{z_y} \times \log(k_{xy} a_y)$$

- a_y → atividade ião interferente
- z_y → carga ião interferente
- K_{xy} → coeficiente de seletividade (determinado empiricamente)

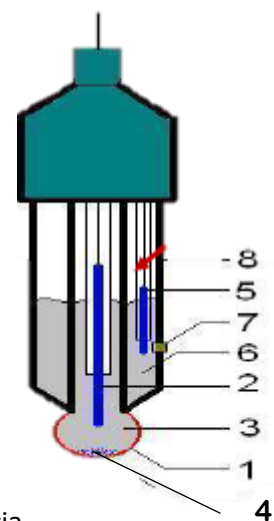
Eléttodos de Vidro

Vidro

- Sólido amorfo cuja presença/ausência de iões na constituição afeta propriedades físicas
- Permeável a H^+ (numa larga gama de concentrações), Na^+ e K^+
- Alterando composição do vidro → sensível ao pH, Na^+ ou K^+ (haverá sempre a interferência dos restantes)
- Mais conhecido → eléctrodo de pH

1. Membrana sensível (vidro)
2. Eléttrodo de trabalho (AgCl ou calomelo)
3. Solução *buffer* (pH=7)
4. Precipitado de AgCl

5. Eléttrodo de referência
6. Solução *buffer* (KCl)
7. Junção com a solução em estudo
8. Corpo estrutural (vidro não condutivo)

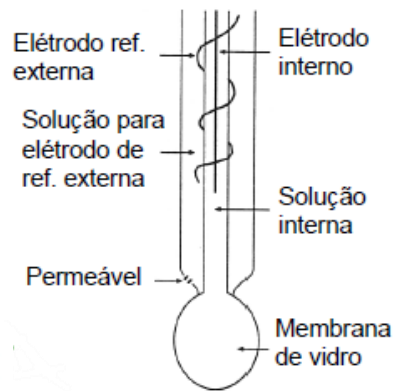


- Eléctrodo de referência num tubo concêntrico à volta do eléctrodo de trabalho
- Orifício permeável → interface eléctrodo de referência e amostra
- Calibrado em termos de pH (e não atividade iónico do H^+)

$$pH = -\log a_{H^+}$$

$$E = K + 0.059 \log a_{H^+} = K - 0.059 pH$$

$$pH = (K - E) / 0.059$$



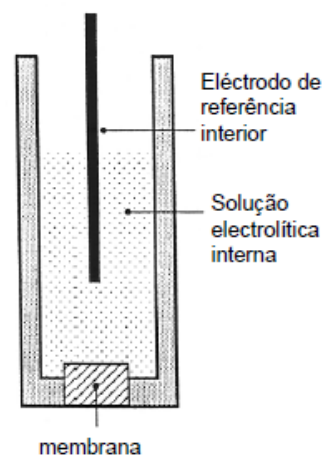
- Eléctrodo de referência exterior na mesma embalagem que eléctrodo de pH → eléctrodo combinado
 - Melhor para análise de rotina de amostras de pequeno volume

Eléctrodos com Membranas de Estado Sólido

- Membrana é um sólido iónico → deve ter um produto de baixa solubilidade → evita dissolução da membrana → assegura resposta estável ao longo do tempo
- Defeitos pontuais na rede cristalina da membrana → condução principalmente iónica
 - Defeitos naturais/intrínsecos → carga total do sólido permanece inalterada
 - Defeitos introduzidos externamente por dopagem/substituição de iões na rede por outros com carga != → aumenta condutividade; pode criar defeitos por radiação eletromagnética

Estrutura geral

- A membrana de estado sólido pode ser um cristal sólido (como LaF_3) no eléctrodo de fluor, p.e.
- Utilizado para medir níveis de fluor no tratamento de águas

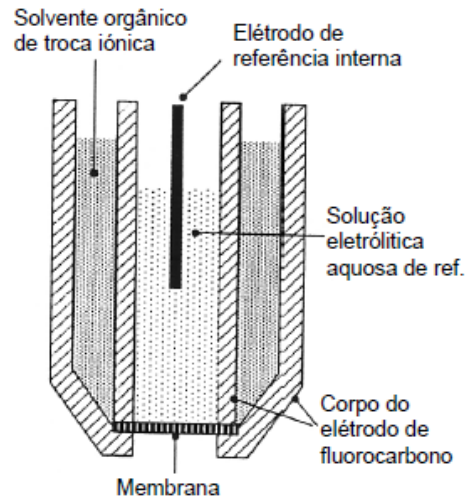


Outros eléctrodos

- Sais de prata + sulfuretos metálicos → melhora condutividade
- Prensagem dos sais num disco com uma *scaffold* (borracha, silicone, PVC, ...)
- Membranas de sais pouco solúveis → adsorção/desorção pode ser do catião ou do anião → eléctrodo sensível a ambas as espécies

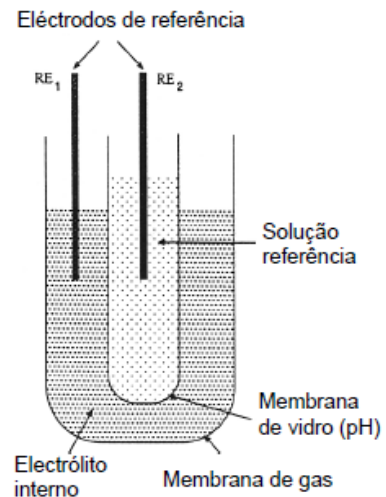
Eléttodos com Membranas de Troca Iônica

- Membranas hidrofóbicas porosas → espécies atravessam a membrana de um lado para o outro (não acontece nas membranas permeáveis a iões por adsorção)
- Exemplos deste tipo de eléctrodo
 - NO_3^- , Cu^{2+} , Cl^- , BF_4^- , ClO_4^- , K^+
- Solvente orgânico → hidrofóbico → manter nível de concentração na membrana/excluir iões de carga oposta/atuar na seletividade



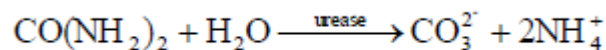
Eléttodos Seletivos a Gases Dissolvidos

- Medição do pH da solução de eletrólito entre a membrana e um eléctrodo de vidro
- Membranas: microporosas ou homogéneas
- Eléttrodo de Clark → sensor sensível ao O_2 → amperométrico
- Eletrólito interno → buffer com gás → condiciona o pH da solução
- Eléttodos típicos: SO_2 , NO_2 , H_2S
- Eléttodos mais comuns: H^+ , NH_4^+ , NH_3
- Outros: CO_2 , I^- , S_2^-



Eléttodos Seletivos com Enzimas

- Imobilização da enzima numa membrana → produtos de reação → detecção pelo eléctrodo
- Exemplo: eléctrodo seletivo de iões (a NH_4^+)

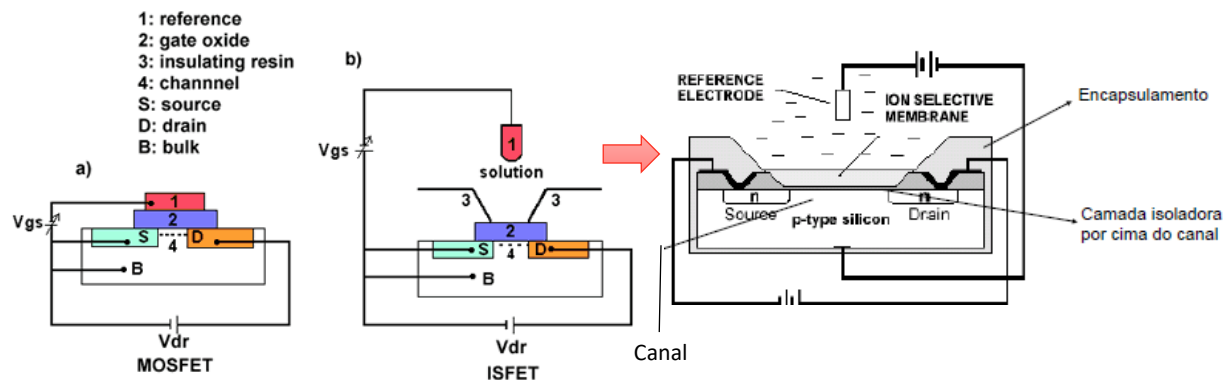


- Noutros casos a reação da enzima altera o pH (elemento sensorial → eléctrodo de vidro)

Transístor de Efeito de Campo Seletivo a Iões (ISFET)

- Medições *in vivo* → requerem eléctrodos pequenos → micropipetas/microagulhas
- Outras aplicações → boa reprodutibilidade a baixo custo
- Objetivo ISFET

- Conversão *in situ* da elevada impedância do elétrodo para uma baixa impedância → sinal de baixa impedância à saída do ISFET → reduz ruído (este afeta o limite de deteção e a sensibilidade)



	ISFET	MOSFET
Amplificação	Diretamente na membrana em contacto com a solução	Instrumento de medida (suscetível a campos elétricos/magnéticos locais)
Gate	Filme fino de material sensível a um ião (ISM – <i>Ion Selective Membrana</i>)	Gate metálica
Referência	Elétrodo de referência	Ground
Camada isoladora	Sensível ao pH	

- ddp entre ISM e solução (depende da atividade do ião) → altera a concentração de portadores no canal → altera características IV entre a *source* e o *drain*
- Corrente → sinal de baixa impedância → pode ser relacionado diretamente com atividade dos iões em solução
- A seletividade e a sensibilidade química do ISFET são totalmente controladas pelas propriedades da interface eletrólito/óxido
- Outros materiais inorgânicos (Al_2O_3 , Si_3N_4 e Ta_2O_5 – *sputtering*) → depositados por CVD sobre o SiO_2 → melhores propriedades que SiO_2 na resposta ao pH e na histerese

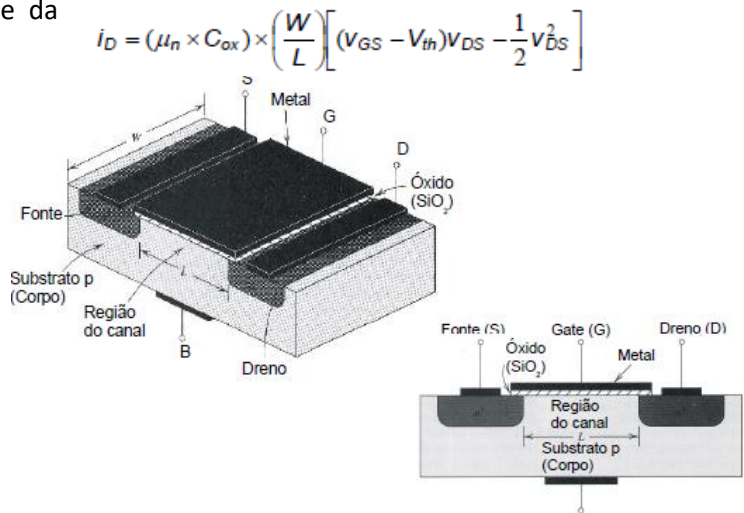
Porquê ISFET?

Eléctrodo de Vidro vs ISFET

- Eléctrodo de pH de vidro → impedância $\cong 100 \text{ M}\Omega$; amplificador de tensão → impedância de entrada $> 1 \text{ G}\Omega$
- ISFET → nível elevado de impedância limitado na gate da solução; impedância dreno-fonte $\cong 1 \text{ k}\Omega$

MOSFET

- A corrente do dreno depende da tensão de *threshold* - V_{th} , de C_{ox} (que depende da permitividade e da espessura da camada do SiO_2) e da mobilidade de e^- no canal
- V_{th} depende da concentração de dopantes do substrato tipo p, da permitividade do silício, da carga do e^- e de C_{ox}



Transístor de Efeito de Campo Seletivo a Iões (ISFET)

- De acordo com a eq. de Nernst

$$E = \phi_{sol-mem} = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln(a_i)$$

$n=z$

- Substituindo isto na equação da corrente do MOSFET

- Quando $V_D < V_{Dsat}$

$$I_D = \frac{\mu_n W C_{ox}}{L} \left[V_G - V_{th} - E_{ref} - E_0 + \frac{RT}{nF} \ln(a_i) - \frac{V_D}{2} \right]$$

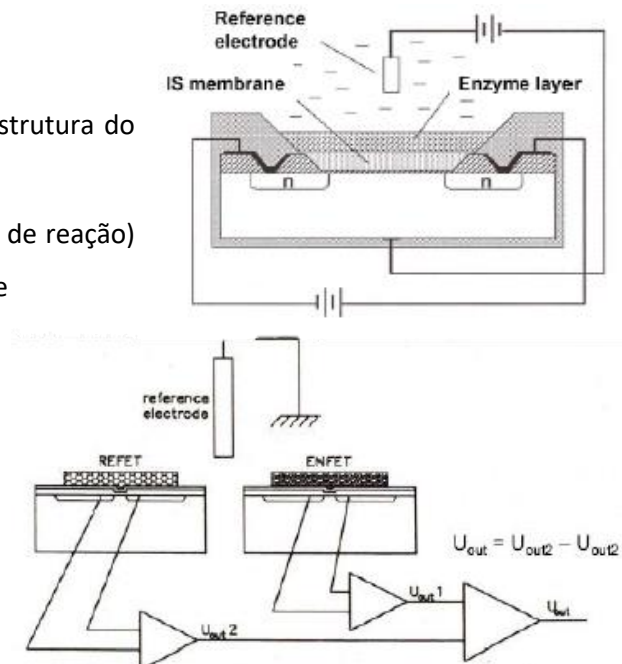
- Quando $V_D > V_{Dsat}$

$$I_D = \frac{\mu_n W C_{ox}}{L} \left[V_G - V_{th} - E_{ref} - E_0 + \frac{RT}{nF} \ln(a_i) \right]^2$$

	Constantes
	Variação c/ interesse

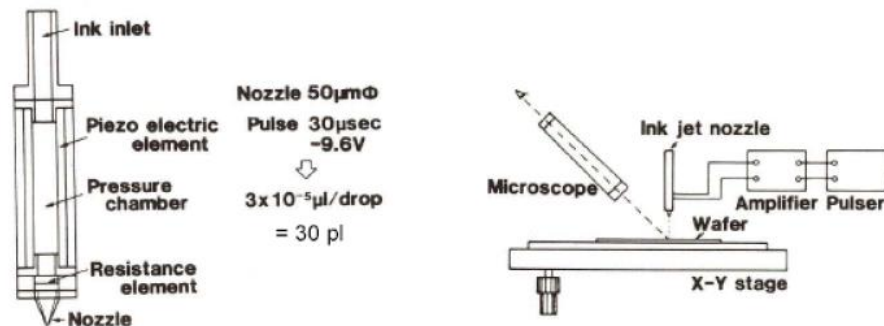
ISFET Enzimático

- Camada/gel enzimático sobre a estrutura do ISFET
- Mede alterações de pH (produtos de reação) – medições feitas diferencialmente
- Desvantagem: difícil modelizar matematicamente
- A camada da enzima é apenas ativa acima da área do ENFET
- A camada sobre o FET de referência (REFET) é fisicamente o mais próximo possível da camada da enzima (espessura, porosidade, propriedades de difusão)

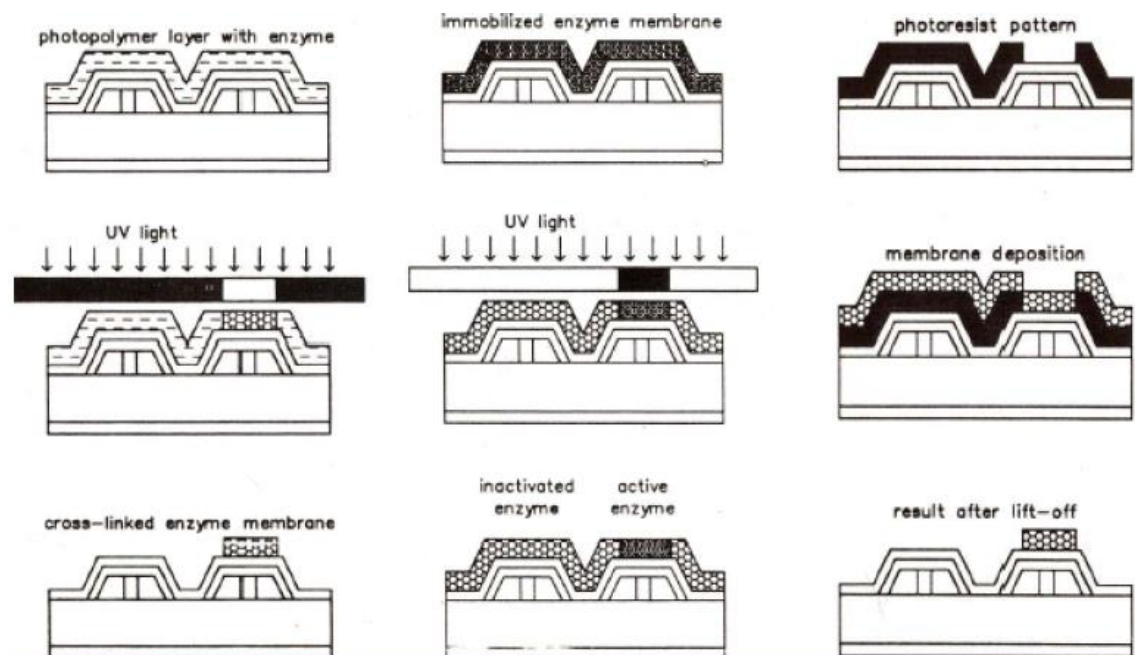


Transístor de Efeito de Campo Seletivo a Iões (ISFET)

- Para imobilizar a enzima em cima da área da gate do ISFET → impressão a jato de tinta

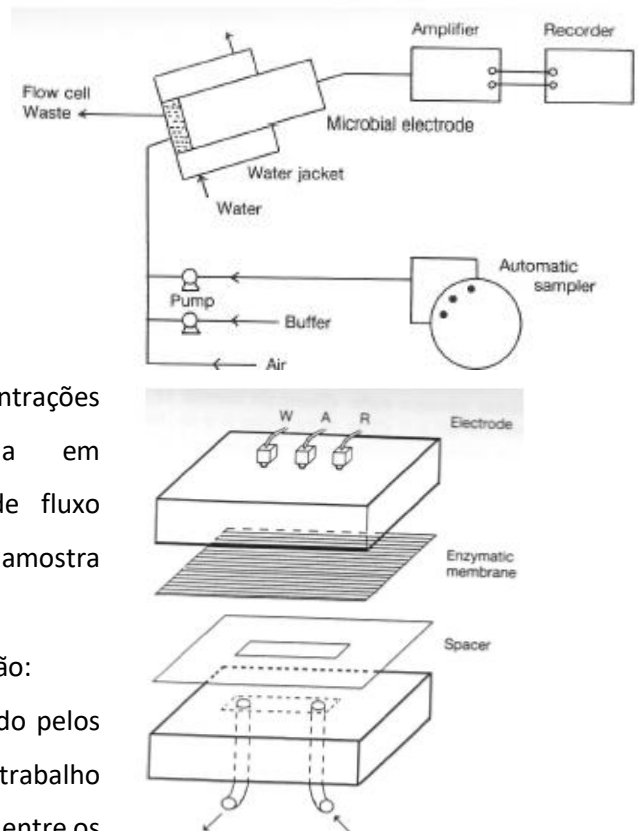


ISFET – Limitações de Fabrico



Biossensores Potenciométricos em Sistemas de Fluxo

- Métodos de fluxo → posicionamento de sensores em pontos de controlo essenciais
- Ramificação do fluxo principal → adição de reagentes depois da bifurcação/antes do sensor ‘
- Vantagem: permite resposta contínua para um controlo eficaz
- Biossensores potenciométricos baseados em seletividade iónica → especificidade, sensibilidade e gama de concentrações mensuráveis → aplicação alargada em determinações analíticas → sistemas de fluxo contínuo/sistemas de fluxo com injeção da amostra (FIA – *Flux Injection Analyses*)
- Precauções devido ao movimento da solução:
 - Aumento do caudal → sinal afetado pelos campos elétricos entre elétrodo de trabalho e de referência → reduzir distância entre os elétrodos
 - Tempo de resposta do elétrodo aumenta relativamente à solução estacionária



- Movimento da solução → deterioração da membrana + rápida que em solução estacionária → diminui tempo de vida do eletrodo → exige calibração periódica
- Frequentemente: filtrar resíduos sólidos e ajustar condições da solução – controlo do pH, força iónica e de interferências iónicas (otimizar resposta)

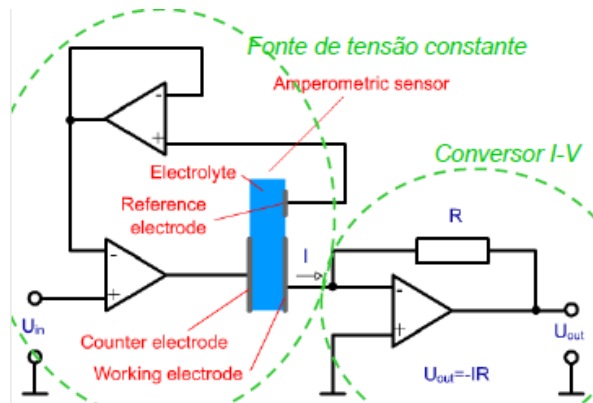
Célula: Medições Fora do Equilíbrio

Medições eletroquímicas para fins analíticos:

- Sensores potenciométricos
 - Condições de equilíbrio → corrente nula
- Sensores voltaméricos/amperométricos
 - Fora do equilíbrio → passagem de corrente

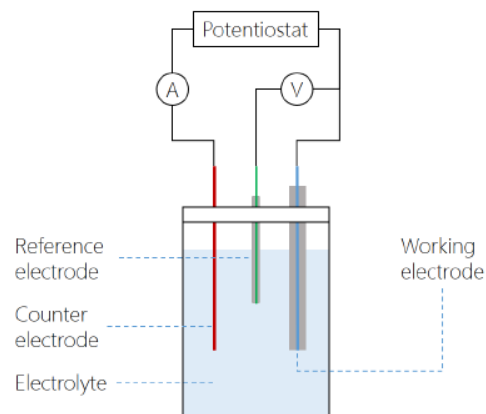
Voltametria

- Técnica eletroanalítica → mede comportamento IV na superfície do eletrodo
- Tensão no AE ajustada até ter a U_{IN} (tensão na ref) pretendida → elimina *ohmic drop*
- Potencial variado de forma sistemática → causa oxidação-redução das espécies → corrente proporcional à concentração das espécies eletroativas
- Corrente no eletrodo de referência → problemas de estabilidade do potencial → atividades das espécies na vizinhança do eletrodo alteradas → solução: adicionar 1 eletrodo auxiliar (de maior área que eletrodo de trabalho)

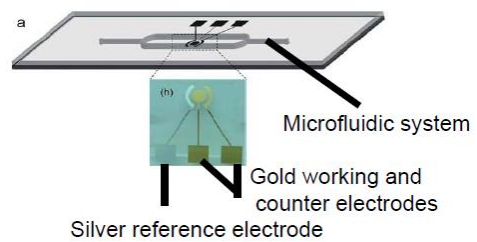


Voltametria

- Medição de corrente que circula pelo WE → quantidade de compostos eletroativos transportados por difusão e que reagem na superfície do eletrodo
- WE → superfície pequena → assumir com rapidez e precisão o potencial imposto
- O eletrodo pode ser sólido (Au, Pt, carbono vítreo) ou formado por uma gota de Hg
- Baseada nas leis de *Faraday* e *Fick*

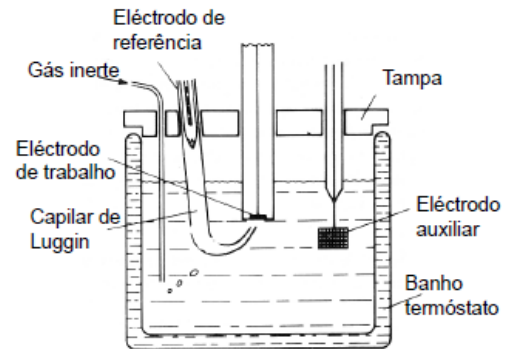


- *Ohmic drop* → queda de tensão insignificante
- Sistema de 3 elétrodos (Au – Ag – Au) microfabricado num chip sensível ao ião Hg
 - Vantagens: fácil de usar, baixo consumo de analito, tempo de resposta rápido e adequado para medições *in situ*



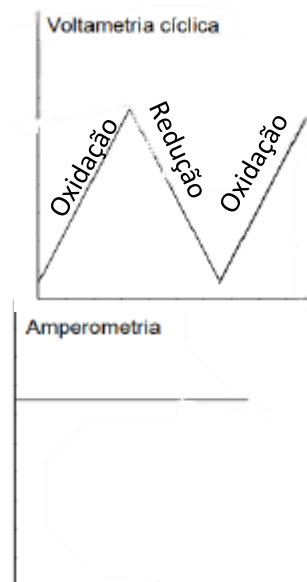
Célula: Medições Fora do Equilíbrio

- AE → folha de Pt → colocada num compartimento separado do resto da solução por uma placa porosa → evitar a contaminação (devido à reação que ocorre no AE)
- Exceções: microelétrodos (a corrente é muito baixa)
- Controlar potencial do elétrodo → baixa resistência entre WE e RE → posicionamento próximo → capilar de *Luggin*



Biossensores Voltamétricos vs Amperométricos

- Sensor Voltamétrico
 - Regista vários pontos no perfil (ou numa região escolhida) de corrente-potencial
- Sensor Amperométrico
 - Mede corrente a um potencial fixo → 1 ponto na curva corrente – potencial → sensor voltamétrico para potencial fixo



Melhora dos Biossensores

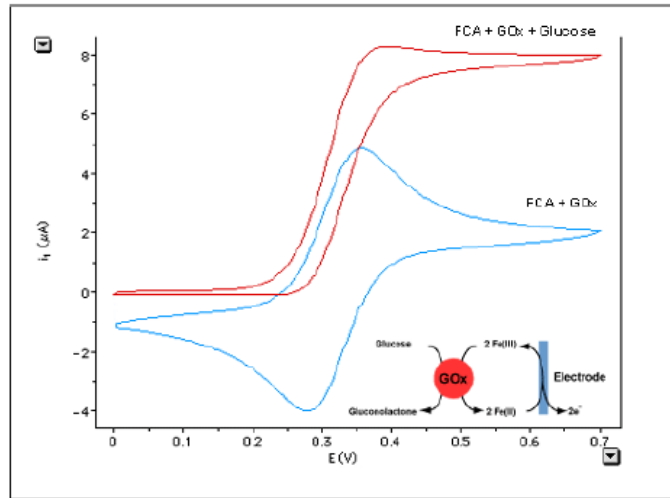
- É preciso:
 - Maior seletividade
 - Aumento da sensibilidade (V/mol)
 - Diminuição dos limites de deteção (mol/ml)
- Solução – escolher corretamente:
 - Material do WE
 - Modificação da superfície do elétrodo

- Aplicação de diferentes tipos de potencial (varrimento, ...)

Biossensores Voltamétricos -

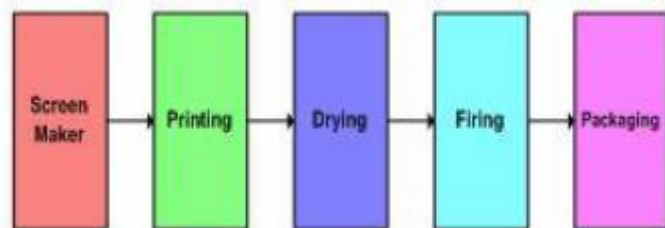
Exemplos

- Na presença de glucose → oxidação da glucose → maiores variações de corrente que na ausência de glucose



Biossensores Amperométricos - Exemplos

- Biossensor de colesterol com imobilização da colesterol oxidase com recurso à técnica *Screen-Printed*



- RE – Ag/AgCl; WE – carbono; AE – Ag

Biossensores Amperométricos: as 3 Gerações

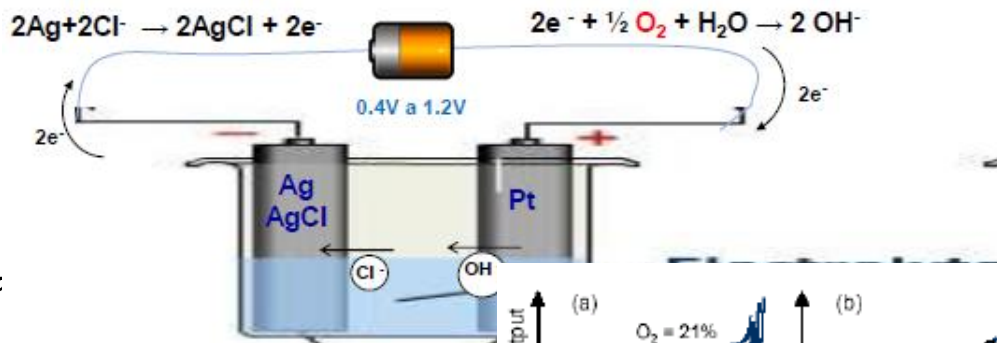
- 1ª Geração – Biossensores amperométricos de O_2
- 2ª Geração – Biossensores amperométricos com mediadores de e^-
- 3ª Geração – Biossensores amperométricos de transferência direta de e^-

Problemas

- A maior parte dos compostos biológicos relevantes (glucose, ureia, ...) não são eletroativos → combinação adequada de reações para produzir espécie eletroativa
- Seletividade a potencial constante → não é suficiente para distinguir as espécies

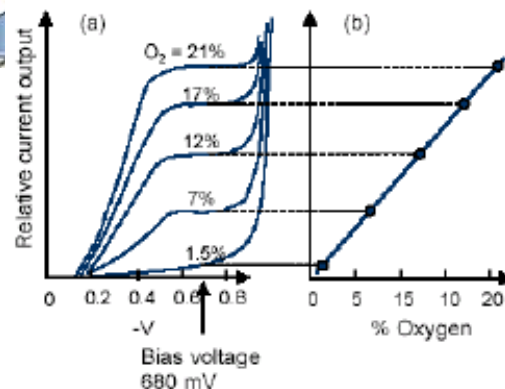
Biossensores Amperométricos de O_2

- Se apenas algumas espécies chegam à superfície → eletrodo + seletivo/reduz envenenamento → evita redução da resposta com o tempo (acontece principalmente em soluções com compostos orgânicos). Isto é conseguido por:
 - Modificação da superfície do eletrodo
 - Colocação de uma membrana porosa em contacto com o eletrodo ou separada dele por um filme fino de eletrólito
 - Usando uma membrana metalizada como eletrodo indicador
- Acetato de celulose → impede adsorção irreversível de proteínas
- Eletrodo de *Clark* → difusão de O₂ para o cátodo através da membrana → corrente de saída diretamente proporcional à concentração (pressão parcial) de O₂ na amostra (pois velocidade da reação depende da [O₂] e a corrente depende da velocidade da reação)



Resposta

- Se uma tensão fixa – tensão de polarização – no período de estabilidade da curva IV é aplicada ao cátodo, a corrente de saída do eletrodo pode ser calibrada em relação à concentração de oxigénio



Biossensor Amperométrico de Glucose: Exemplo

- Eletrodo enzimático → enzima próxima da superfície do eletrodo → catalisa uma reação com consumo de um reagente ativo (como o O₂)
- Primeiro eletrodo enzimático → gel de poliácridamida + glucose oxidase na superfície do eletrodo de Pt (eletrodo de *Clark*)
- Enzima consome glucose e O₂ → corrente elétrica reduzida à mesma taxa →
- Outros eletrodos enzimáticos → monitorização do consumo de O₂ ou produção de H₂O₂

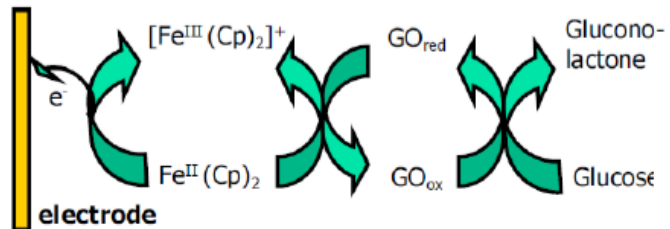
Biossensor Amperométrico com Mediadores de e⁻

- Problemas da 1ª Geração
 - Interferência de substâncias facilmente oxidadas (como ácido úrico)

- H_2O_2 pode ser consumido pelas impurezas → aumenta erro em amostras reais
- H_2O_2 , em elevadas concentrações, pode desativar rapidamente o biossensor
- Processo de transferência de e^- com O_2 é cineticamente lento e a velocidade do passo limitante é controlada pela difusão do O_2
- $[\text{O}_2]$ baixa – sangue → pode ser inferior à concentração do composto a analisar → limitação estequiométrica para as enzimas que reagem com o O_2
- Solução
 - Uso de mediadores artificiais de transferência de e^- , p.e. FADH_2
 - Mediador pode ser solúvel ou imobilizado na superfície do eletrodo
 - São geralmente compostos redox de baixo peso molecular → transportam e^- de um centro ativo para a superfície do eletrodo

Mediadores: Ferroceno

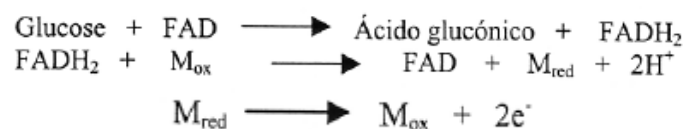
- É fácil de obter e é imune às mudanças de pH



Biossensores Amperométricos com

Mediadores de e^-

- Mediador (M_{ox}) + enzima reduzida → mediador reduzido (M_{red}) → difusão para superfície do eletrodo → retorna a M_{ox}



Biossensores Amperométricos com Mediadores de e^- : Exemplo de Biossensor de Glucose

- Eletrodo descartável – não há contaminações nem perda de atividade; *screen printed* em papel

Biossensores Amperométricos de Transferência Direta de e^-

- Depende da correta orientação da macromolécula
- Um dos 1^{os} biossensores desta geração → transporte de e^- entre o citocromo C e um eletrodo de Au na presença de 4,4-bipiridinilo

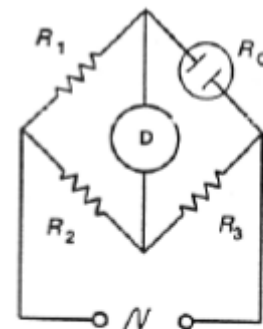
Condutividade

- É o inverso da resistência – medida da facilidade da passagem de I numa solução
- Condutância, G, com unidade de medida Siemens, S (Ω^{-1})

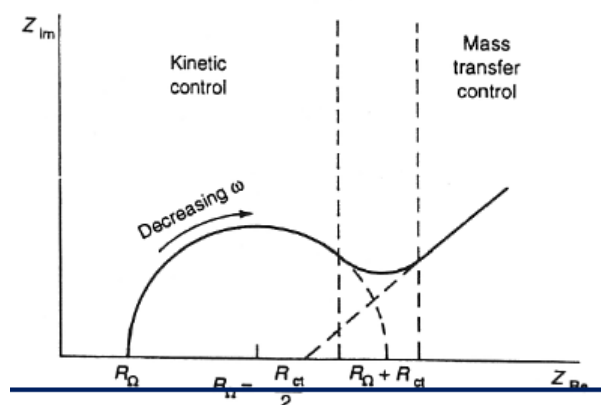
$$U = RI \quad E = RI \quad \longrightarrow \quad G = \frac{1}{R} \text{ (S)} \quad \longrightarrow \quad G = \frac{kA}{l}$$

$$U = \frac{I}{G}$$

- l – comprimento da célula
- A – área
- K – condutividade específica (S cm⁻¹)
- Fácil de ser medida e é diretamente proporcional à concentração de iões na solução
- Ponte de *Wheatstone* → resistência R₃ ajustado para balancear a ponte
- A condutividade varia com a carga, mobilidade e grau de dissociação do ião → complicações
- A técnica não tem seletividade
- Medida da condutância → corrente alternada → variando frequência obtém-se seletividade → em vez de condutância temos admitância (inverso da impedância)
- Espectro de admitância

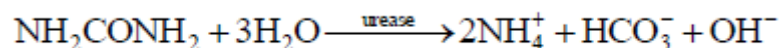


$$R_C = R_3 \times \frac{R_1}{R_2}$$



Biossensores Condutimétricos

- Reação biocatalisada → variação das concentrações de espécies iónicas → detetada pela variação da condutividade elétrica do meio reacional
- Sensor de ureia → utiliza urease imobilizada → diálise de pacientes renais



- Aplicação de um campo elétrico alternado → permite a medição de variação de condutividade no meio reacional/minimiza processos eletroquímicos indesejáveis
- Exemplos de enzimas: amidases, descarboxilases, esterases, nucleases

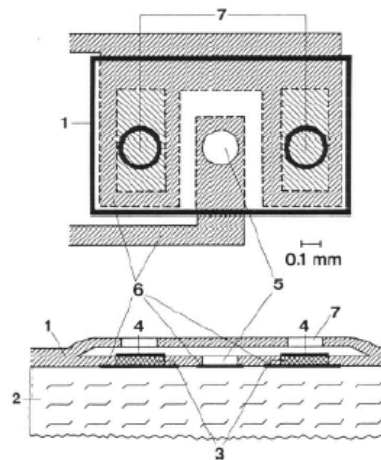
- Considerações:
 - Não há imobilização no RE
 - Campo elétrico afeta todas as espécies iônicas em solução
 - Condutividade intrínseca varia de amostra para amostra
 - A condutividade é afetada pela temperatura, força iônica e viscosidade

Microbiossensores Amperométrico Exemplos

- Sensor de glucose de filme fino baseado na detecção de H_2O_2
 - Ânodo largo – reação consome parte do material
- Probe tipo agulha com microbiossensor para cirurgia no cérebro

- Sensor de oxigénio tipo-câmara
 - Chamber-type oxygen sensor (top view and cross section):
 - 1) Si_3N_4 chamber ($130\ \mu m \times 80\ \mu m$, height $1.5\ \mu m$)
 - 2) substrate
 - 3) Ag electrode
 - 4) Ag/AgCl layer
 - 5) gold working electrode
 - 6) metallization
 - 7) holes ($20\ \mu m$) in the Si_3N_4 cover

Chamber is filled with electrolyte



Microelétrodos:

Aplicações

- Dificuldades aplicações *in vivo*
 - Biocompatibilidade dos materiais
 - Necessidade de condições estéreis na implementação dos elétrodos
 - Risco de reações de imunidade/tromboses
- Estragos nos tecidos devido à implementação dos elétrodos → rapidamente regenerados e cobertos por tecido conjuntivo/anticorpos → não são condutores → decréscimos na resposta do eletrodo implantado → desenvolvimento de biomateriais
- Eletrofisiologia → medições intra e extracelulares (elétrodos de Ag/AgCl) → estudo transporte de iões ao nível molecular → obtenção de medidas de corrente que atravessa 1 único canal iónico → EEG, EMG, ECG
- Opto-isoladores: sinais elétricos do corpo → sinais óticos → sinais elétricos – isolar o corpo do instrumento de processamento de sinal
- Microelétrodos implantáveis, ultrassons, sensor subcutâneo contínuo de glucose

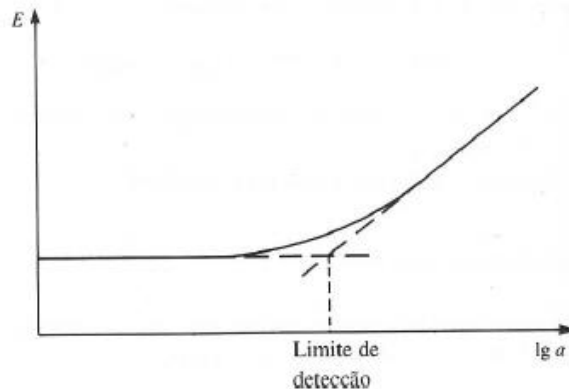
Biossensores Eletroquímicos: Eficiência

- Transporte forçado do analito para a superfície do eletrodo → aumenta a eficiência
 - Soluções reacionais agitadas ou eletrodos com movimento rotativo
 - Elevadas concentrações de analito
 - Uso de membrana hidrófilas pouco espessas
- A eficiência aumenta proporcionalmente com o gradiente de concentração de analito
- Constante de difusividade → associada à natureza/espessura da membrana de oclusão

Questões Capítulo 5

Qual é o limite de detecção dos biossensores potenciométricos?

- Dado que a variação de potencial com a atividade não é linear para uma atividade menor que um certo valor, tornando-se eventualmente constante, é importante definir parâmetros para determinar o limite. Outros critérios são baseados na precisão das leituras de tensão e da sua resolução para níveis de confiança especificados



Durante quanto tempo é que a resposta do eletrodo permanece Nernstiana?

- Frequentemente mesmo com um novo eletrodo a resposta é sub ou supra Nernstiana, i.e., os declives dos gráficos de tensão vs $\log(a)$ são menores ou maiores que $2,303RT/zF$

Durante quanto tempo é que o eletrodo fornece uma variação do potencial com atividade estável e reproduzível?

- Esta condição está relacionada com o tempo de vida do eletrodo e varia conforme o tipo de utilização (contacto com soluções e período de tempo deste) do eletrodo seletivo. No caso de eletrodos de membranas de estado sólido, o potencial e a sua reprodutibilidade dependem do pré-condicionamento do eletrodo (polimento)

Qual é o tempo de resposta do eletrodo, i.e., quanto tempo é necessário para atingir o equilíbrio depois de mergulhar o eletrodo na solução, ou depois de alterar a concentração da solução?

- Este tempo deveria ser o mais curto possível – tempos otimizados na ordem dos 30 s

Qual é a seletividade do eletrodo em relação a outras espécies em solução?

- O coeficiente de seletividade (k_{xy}) foi introduzido na eq. De Nikolski-Eisenman

O que pode evitar a calibração periódica?

- A calibração periódica minimiza os efeitos da variação do potencial com a temperatura e a alteração do declive do perfil de potencial vs atividade. O período depende do tipo de análise a ser efetuada, mas a calibração não pode ser dispensada

Qual o parâmetro principal de elétrodos de biossensores voltamétricos/amperométricos?

- Potencial aplicado. Idealmente os potenciais de eletrodo dos pares redução deveriam ser suficientemente afastados uns dos outros para não haver interferência de espécies diferentes

Porque não é possível a transferência direta (oxidação) para um eletrodo?

- O centro ativo das enzimas está revestido por uma camada de aminoácidos e outros compostos biológicos que dificultam a transferência direta de e^- para ou do eletrodo. Além disso, a distância entre o centro e o eletrodo é grande e a velocidade de transferência de e^- entre as moléculas e os elétrodos diminui exponencialmente com o aumento dessa distância

Qual é o fator limitativo dos biossensores amperométricos?

- Robustez e estabilidade das camadas biológicas de sensorização – técnicas de imobilização

Qual a vantagem dos ISFET?

- Potencial para produzirem um chip multisensor incorporado em matriz de dispositivos biologicamente sensíveis e completamente integrados com eletrónica de leitura

Quais os problemas dos ISFET?

- Fiabilidade – degradação do isolamento da gate resultante da hidrólise e possível contaminação da interface isoladora do eletrólito
- Limitação de operação – sensibilidade do material da gate à luz, reprodutibilidade e histerese, pobre seletividade
- Fabrico – encapsulamento das funções eletrónicas da região da gate e deposição da membrana de sensorização automaticamente
- Técnica de fabrico das membranas imobilizadas – a membrana deve ser depositada precisamente na região mais sensível do elemento eletrónico; a camada depositada não deve desprender-se quando está a ser utilizada; a enzima de cobertura deve ser compatível com o processo do circuito integrado
- Custo elevado em comparação com outros biossensores eletroquímicos