

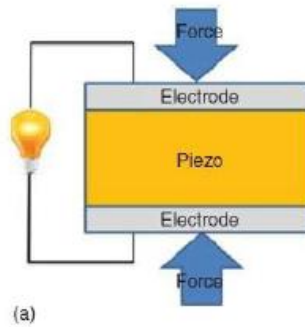
Capítulo 6

Biossensores Piezoelétricos

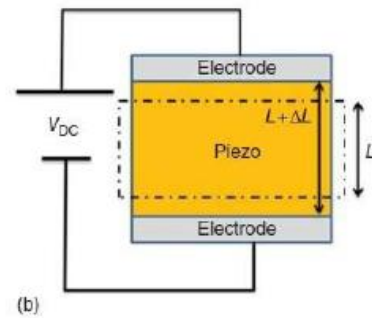
Transdução baseada na medição de pequenas alterações de massa → usa cristais piezoelétricos

Efeito Piezoelétrico

Cristais anisotrópicos → não têm eixo de simetria (quartzo/turmalina) → fornecem sinais elétricos quando sujeitos a pressão mecânica e vice-versa (quando é aplicada uma



Efeito piezoelétrico direto



Efeito piezoelétrico inverso

tensão a este tipo de cristais estes deformam-se mecanicamente → vibração)

Cristal → frequência natural de oscilação que depende de:

- Massa do cristal
- Material utilizado na cobertura do cristal
- Das propriedades elásticas da estrutura de ressonância

Biossensores de Massa

- Microbalança de cristal de quartzo (QCM)
- Ondas acústicas
 - Surface Acoustic Wave sensor (SAW)
 - Plate Acoustic Wave sensor (PAW)
 - Lamb Acoustic Wave sensor (LAW)
 - Thickness shear mode (líquidos)

Efeito Piezoelétrico

Um sensor coberto com uma membrana específica pode detetar alterações:

- Na massa
- Nas propriedades elásticas da cobertura

Estas alterações são provocadas por:

- Moléculas que se ligam à membrana
- Reações químicas na membrana (ou na sua superfície)

Sequência de acontecimentos:

1. Cristal vibra a frequência de ressonância paralela ao campo aplicado
2. Adsorção de analito à superfície
3. Aumento da massa
4. Diminui frequência de ressonância

Vantagem

- Elevada sensibilidade (na ordem das ng ou pg/cm^2)

Desvantagem

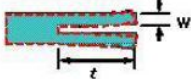
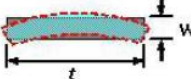
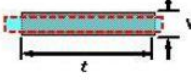
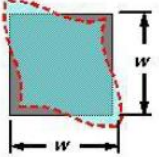

- Altamente sensível a adsorções não-específicas

Tipos de Cristais de Quartzo

Diferentes ângulos de corte de quartzo (ângulos de Euler) permitem variação nas propriedades:

- Elásticas
- Piezoelétricas
- Dielétricas

Modos de Vibração

Vibratoir Mode		Orientation Angle
Tuning Fork		$+ 2^\circ X$
Flexure		XY NT
Extension		$+ 5^\circ X$ $- 18.5^\circ X$
Face Shear		DT CT SL
Thickness Shear		AT Fundamental AT 3 rd Overtone AT 5 th Overtone BT Fundamental

Vibrações Fundamentais Harmônicas

Vibração *thickness shear* → elétrodos com polaridade → número de vibrações harmônicas ímpar

Efeito Piezoelétrico

Frequência de ressonância (Hz):

$$f = n \frac{v_b}{2d}$$

- v_b – deformação da velocidade da onda (m/s)
- d – espessura do cristal (m)
- n – frequência da fundamental e harmônicos (1, 2, 3, ...)

Equação de *Sauerbrey*:

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} = -\frac{f_0}{m} = k_l \frac{f_0^2}{A}$$

- Δf – alteração da frequência de ressonância (Hz)
- Δm – alteração da massa da superfície do cristal (g)
- k_l – coeficiente específico para o modo acústico ($-2,3 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}$)
- A – área efetiva da região de sensorização do cristal
- f_0 – frequência de ressonância inicial

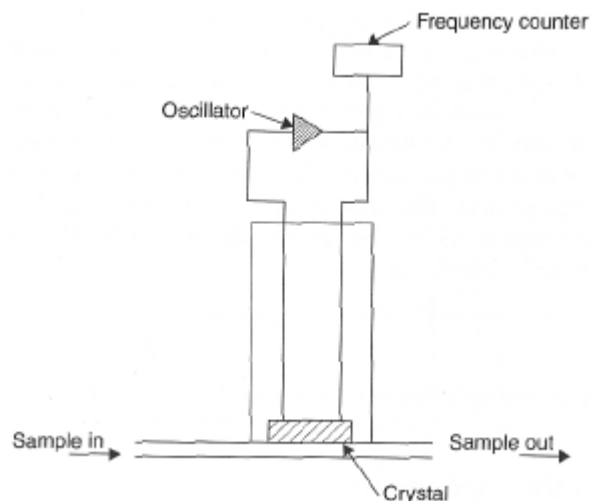
Outros materiais:

- Bário
- Titanato/zirconato de chumbo
- PVDF – polímero orgânico

Aplicações em Biossensores

Algumas aplicações são:

- Aldeído fórmico (FDH)
- Pesticidas
- Ensaios imunológicos
- Coberturas sensíveis (com *polypyrrole* p.e.)

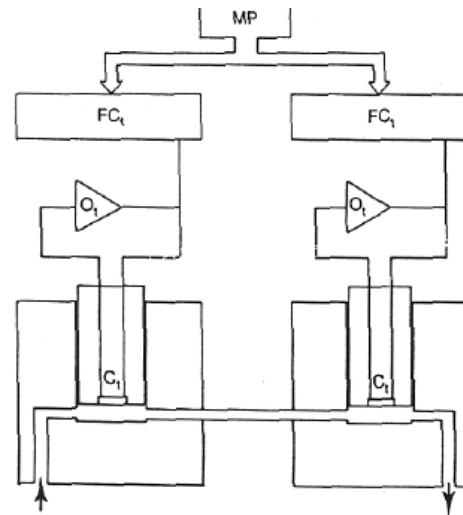


Sistema modo diferencial → 2 cristais balanceados

- Cristal sem anticorpo → referência (controla interferências/oscilações de temperatura)

Legenda:

- C – cristal
- O – circuito de oscilação
- FC – contador de frequência



Mass Sensitive Biosensor

Desvantagens dos biossensores piezoelétricos (QCM):

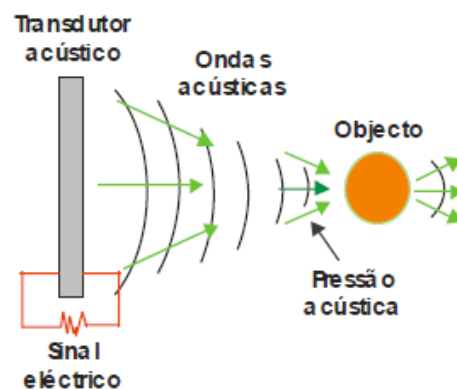
- Tempo de incubação da bactéria relativamente longo
- Inúmeros passos de lavagem e secagem
- Problema da regeneração da superfície do cristal (não relevante se forem fabricados pequenos cristais a baixo custo → dispositivo descartável economicamente viável)
- Falta de especificidade, sensibilidade e interferências do meio líquido

Fenómeno (Ondas Acústicas)

O decaimento exponencial da intensidade do som no fluido (devido à absorção dos feixes acústicos) gera uma força F no fluido no interior do reservatório ou canal (no ar este fenómeno denomina-se *quartz wind*)

$$F = \frac{I}{cl_{\mu}} e^{-x/l_{\mu}}$$

- I – intensidade acústica
- c – velocidade do som no fluido
- x – distância da fonte acústica
- l_{μ} – comprimento de absorção



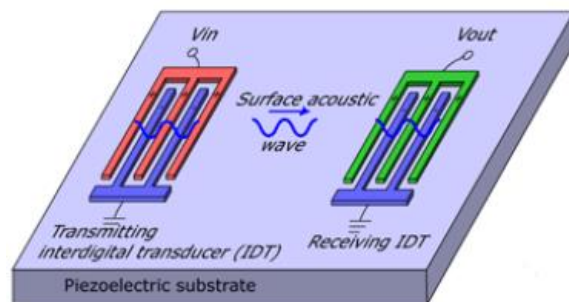
SAW

Surface acoustic waves devices

- Propagação de ondas acústico-elétricas
- Ao longo da superfície ou através de uma combinação desta com a espessura do cristal
- 2 elétrodos de metal interdigitados simetricamente (ouro/titânio) evaporados para a superfície de um cristal de substrato fino e planar (quarto/óxido de zinco em silício)

Sequência

1. Sinal elétrico AC aplicado num dos elétrodos
2. Onda acústica (tipo Raleigh) é gerada
3. Onda recebida pelo elétrodo do lado oposto
4. Conversão num sinal elétrico



A onda penetra o cristal com uma profundidade λ que varia com a espécie imobilizada. É detetada uma variação de frequência que é traduzida num sinal elétrico

O sinal elétrico pode ser adaptado para determinadas aplicações modificando:

- A frequência
- O atraso na propagação
- A forma da onda acústicas

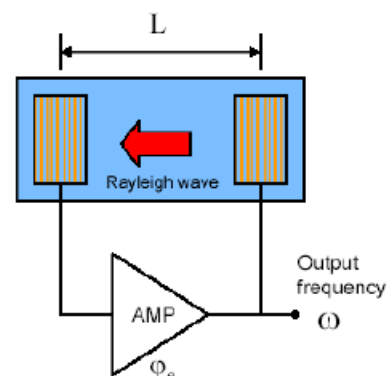
Isto pode ser conseguido variando:

- O espaço entre as linhas dos transdutores interdigitados
- O espaço entre os transdutores
- O corte do cristal
- A espessura do substrato

A oscilação estável ocorre quando:

$$\omega = \frac{(2n\pi - \varphi_e)v_R}{L}$$

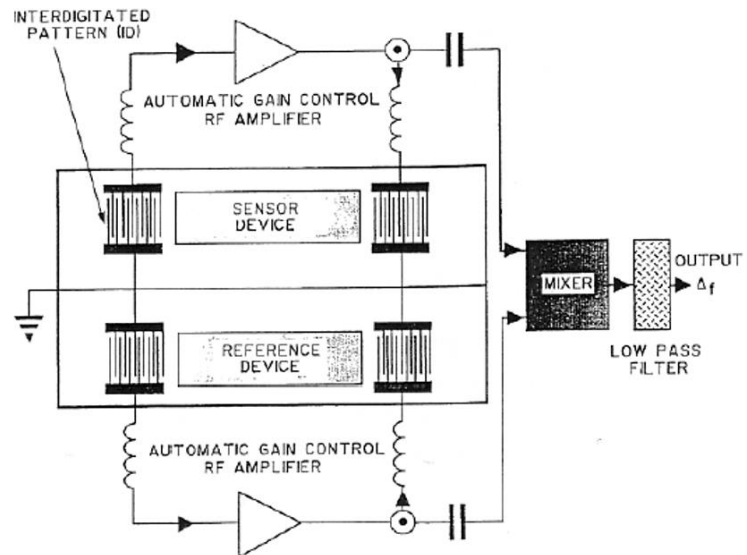
- φ_e – atraso elétrico no amplificador
- v_R – velocidade da onda Rayleigh
- L – comprimento da linha de atraso acústico



- $n = 1, 2, 3, \dots$

Os elétrodos funcionam como filtros → faz com que hajam poucos valores de ω

Oscilador utilizado nos biossensores



Sensibilidade

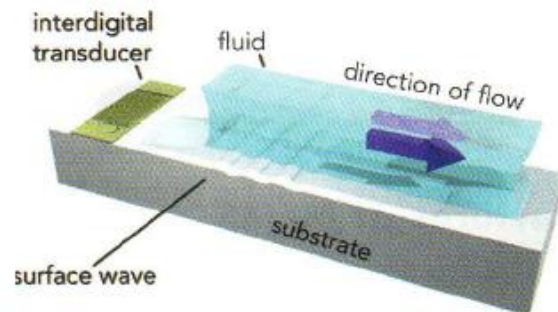
A sensibilidade de um sensor SAW é:

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} = (k_1 + k_2) \frac{f_0^2}{A}$$

- $k_1 + k_2 = -1,349 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}$
- f_0 – frequência ressonante (Hz)
- A – área efetiva do sensor (m^2)

SAW para Mover Fluidos

Sinal AC com determinada frequência aplicado ao elétrodo interdigitado → onda acústica excitada → fluxo do líquido



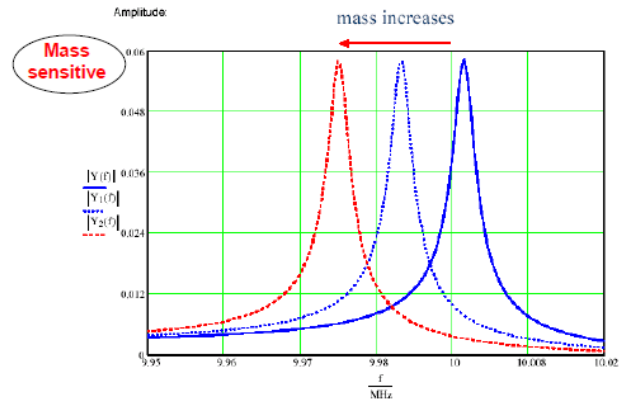
Thickness Shear Mode

Aplica-se aos líquidos e envolve variáveis como:

- A viscosidade
- A densidade
- A condutividade do líquido

Efeito do Peso da Massa

- Quanto menor a massa menor a frequência necessária para atingir a mesma amplitude

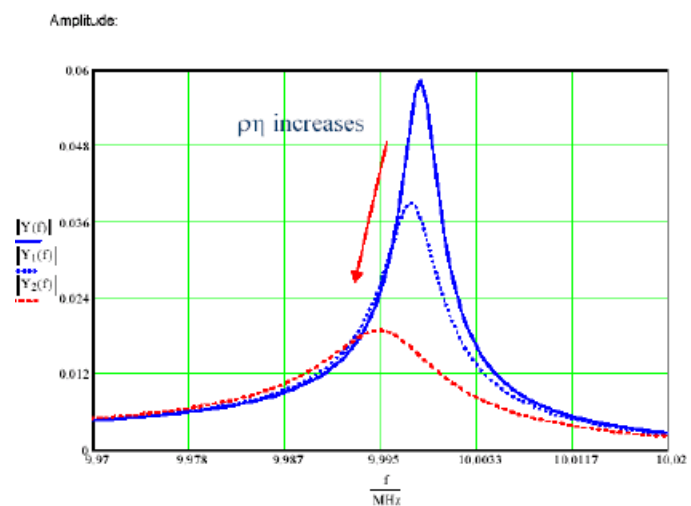


Microagitação Acústica

- Faz com que dois fluídos se misturem muito mais depressa
- É silencioso, não vibra e não há risco de contaminação entre as câmaras

Efeito da Densidade vs Viscosidade

- Quanto menor a densidade/viscosidade menor a amplitude para a mesma frequência



Questões Capítulo 6

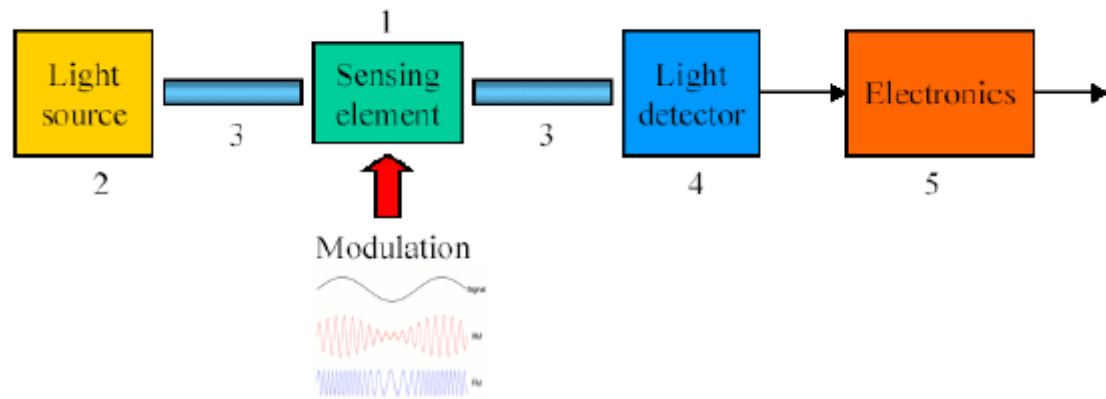
Como é obtida a seletividade nos sensores piezoelétricos sensíveis à massa?

- Através de um material seletivo, o qual interage seletivamente com o analito, i.e., anticorpos ou antígenos necessitam de ser adsorvidos na superfície do cristal

Capítulo 7 I

Biossensores Ótico

Componentes básicos de um biossensor ótico



Espetro Eletromagnético

As moléculas interagem com diferentes partes deste espectro

- Cristalografia de raios X: localização precisa de átomos dentro de uma estrutura
- IR: identificar estruturas orgânicas a partir das suas características de vibração e rotação molecular
- Micro-ondas é usada em técnicas que investigam o movimento nuclear e eletrônico (ex: ressonância magnética).

Variáveis:

- Comprimento de onda (λ) da luz (medida em metros): distância entre dois picos adjacentes da onda.
- Frequência de uma onda eletromagnética (f) é o número de oscilações que ocorrem num segundo (medida em Hz).
- O comprimento de onda e a frequência estão reciprocamente relacionados:

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

- c é a velocidade da luz

- A energia de um fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda da luz

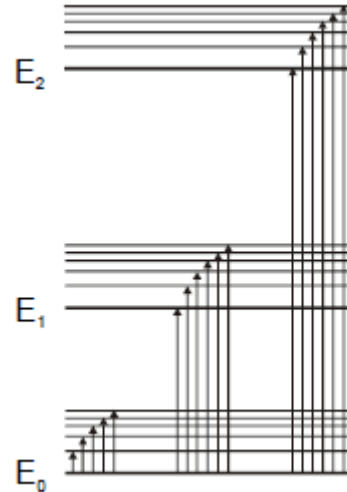
$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

- E – energia do fóton (J)
- h - constante de *Planck* ($6,626 \times 10^{-34} J s$)

Absorção na Gama da Luz Visível

Absorção:

- Atenuação do sinal ótico devido à interação com os átomos e moléculas da amostra, para certas frequências. Na região visível, a absorção da luz ocorre quando os fótons absorvidos vão de um estado de energia para um estado de energia superior – excitação.
- A diferença de energia entre os níveis de energia de uma determinada molécula é dependente da sua estrutura, pelo que a absorção da luz por uma molécula será função tanto da sua estrutura como do comprimento de onda da luz.
- Alterações químicas que alterem a estrutura de uma molécula alterarão o seu espectro de absorção.



Biossensores óticos

Vantagens:

- Não necessitam de um sinal de referência
- Não existe interferência elétrica
- Não existe contacto com o elemento biológico que está imobilizado
- São extremamente estáveis
- Podem responder simultaneamente a + que uma substância (utilizando reagentes imobilizadores com respostas em diferentes comprimentos de onda)
- Potencial para armazenar mais informação que sensores elétricos

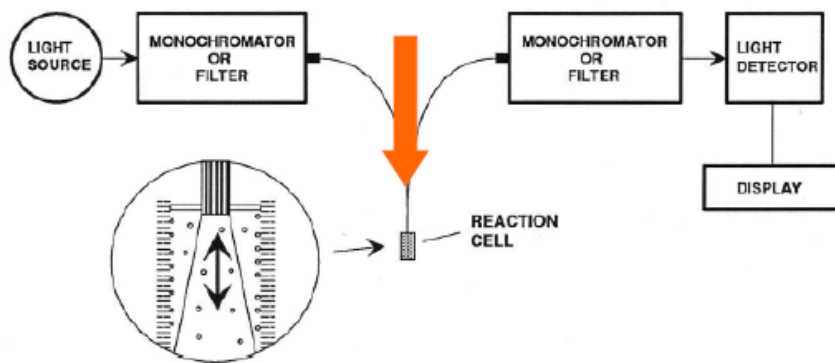
Desvantagens:

- Apenas funcionam se existirem reagentes apropriados
- Ruído devido à luz ambiente

- Gama dinâmica limitada
- Difíceis de miniaturizar
- Reação com tempo limitado
- Tempo de resposta pode ser lento (devido ao t necessário para reação se concretizar)

Instrumentação

Fibra ótica

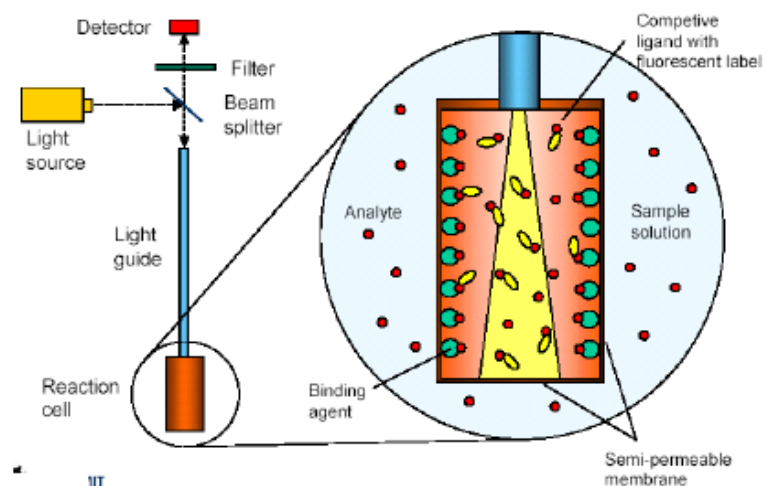


Biossensores de Fibra Ótica

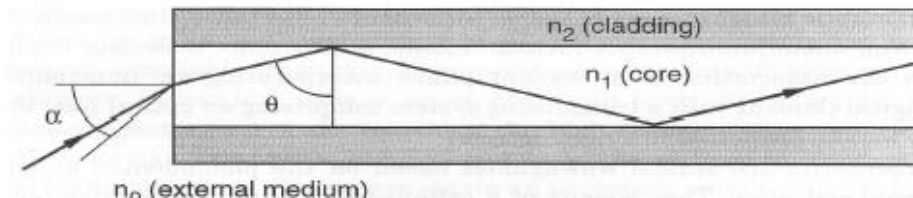
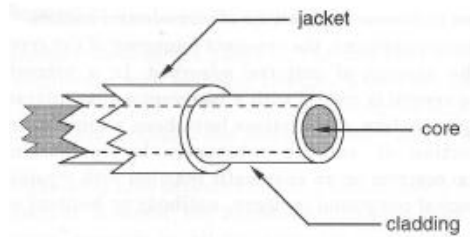
- Baseados nas técnicas óticas de medição de absorvância/refletância, fluorescência, bio/quimiluminescência
- Medem características da luz
 - Na frente da ponta da fibra – *probes*
 - Quantificam quantidade de analito através de uma alteração nas propriedades óticas de um indicador imobilizado na *probe* – *optodes*

Fibra Ótica

- Região visível – vidro e materiais poliméricos; mais baratos
- Região UV – fibras de quartzo

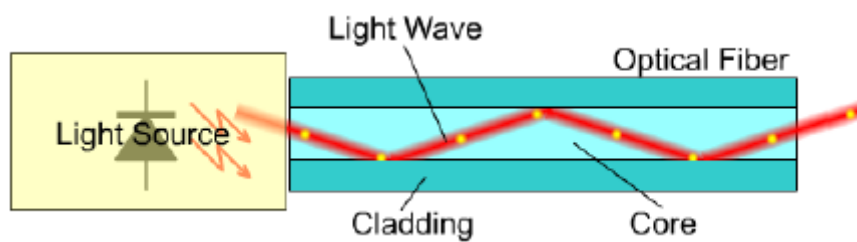


- As fibras óticas transmitem luz baseados no fenómeno de reflexão interna total (TIR)
- São normalmente revestidas por um *jacket* cuja função é somente de proteção (não tem efeito na propagação da luz)



Biossensores de Fibra Ótica

- Estes biossensores tiram partido da capacidade das fibras óticas de guiarem ondas de luz e baseiam-se nas técnicas óticas de medição

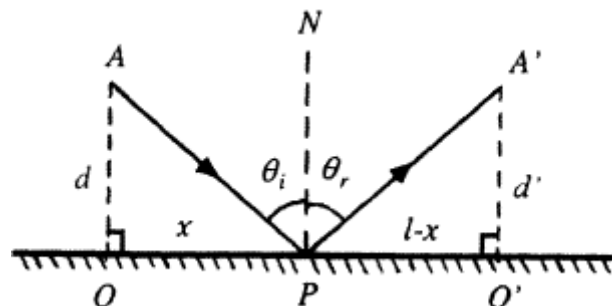


Reflexão num Espelho Plano

Primeira lei da reflexão

$$\sin \theta_i = \sin \theta_r$$

- θ_i – ângulo de incidência
- θ_r – ângulo de reflexão
- Ambos os ângulos são relativos à normal



Segunda lei da reflexão

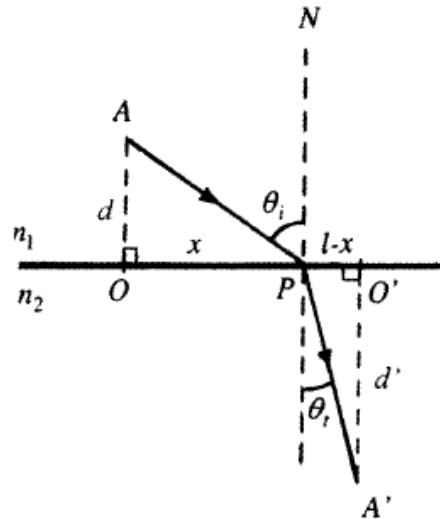
- O raio incidente, o raio refletivo e a normal ao espelho situam-se no mesmo plano – plano de incidência

Refração

Lei de Snell para refração

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r$$

- n – índice de refração num meio é dado pela razão entre as velocidades da luz no vácuo e no respectivo meio



Reflexão Interna Total (TIR)

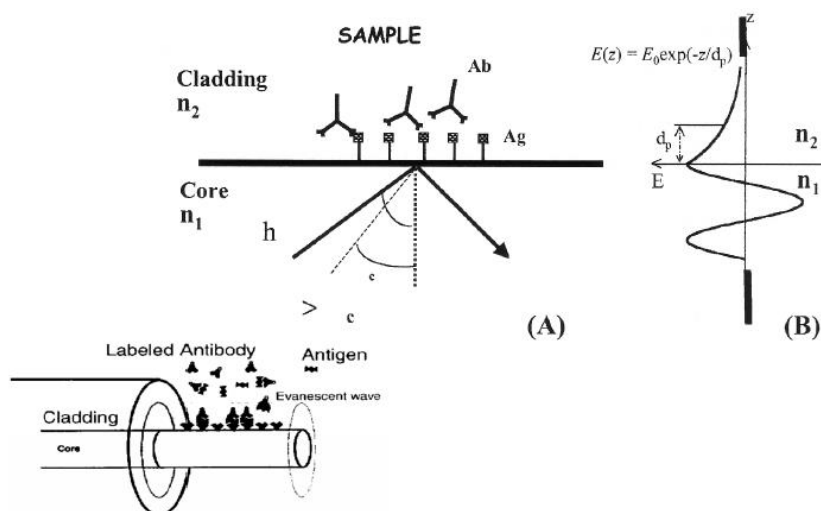
- Se $n_1 > n_2$, ocorre TIR caso o ângulo de incidência (θ) seja maior que o ângulo crítico (θ_c), isto é, não há refração
- Se ângulo de incidência $\leq \alpha$ (ângulo de aceitação) \rightarrow luz entra na fibra

$$\sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1}$$

$$n_0 \sin \alpha = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$$

- n_0 – índice de refração no meio externo
- α – ângulo de aceitação
- Parte da luz é absorvida pela bainha \rightarrow gera-se onda eletromagnética – onda evanescente \rightarrow intensidade decai exponencialmente com a distância

$$d_{\text{penetração}} = \sqrt{k_2^2 \left(\frac{n_1^2}{n_2^2} \cos^2 \theta_1 - 1 \right)}$$



Onda Evanescente

$$d_p = \frac{\frac{\lambda}{n_1}}{2\pi \left[\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}}$$

Interferometria de Mach-Zehnder

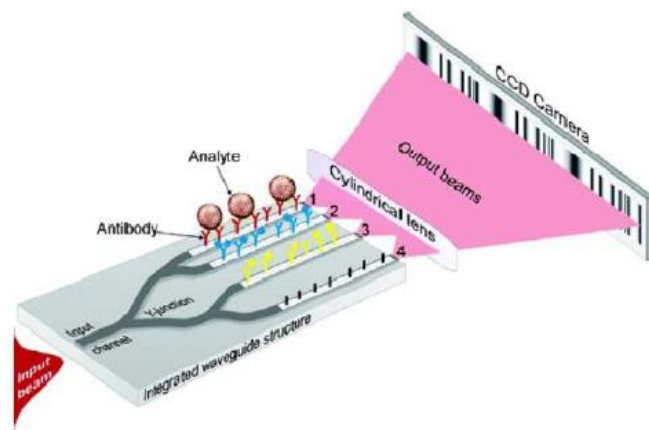
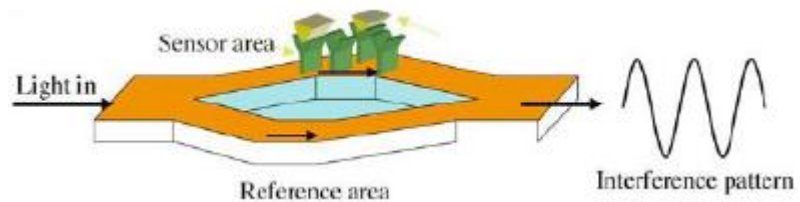
- Alteração do índice de refração

Vantagens

- Técnica com muito boa sensibilidade

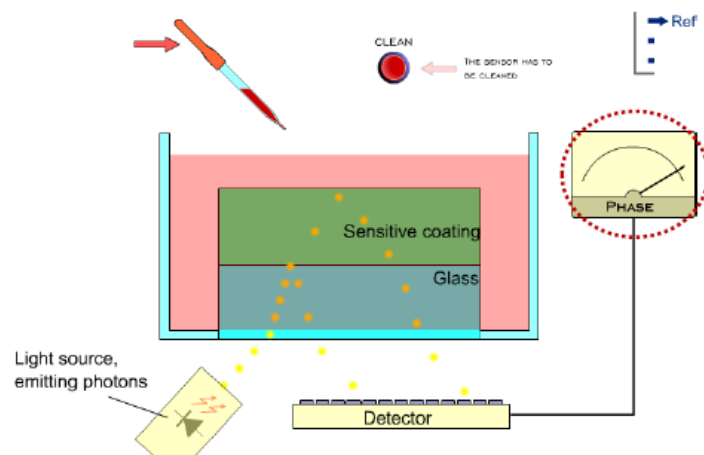
Desvantagens/dificuldades

- Dificuldade de multiplexagem
- Comprimento necessário para produzir um suficiente desvio de fase anda na ordem do cm; utilizando guias de onda de nanolinhas reduz-se para o mm



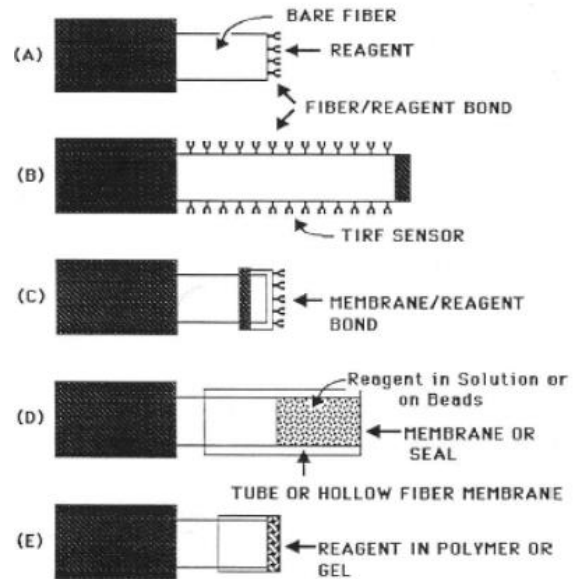
Interferometria de Reflexão

- Diferença geométrica nos caminhos percorridos pela luz



Imobilização do Elemento Biológico à Fibra

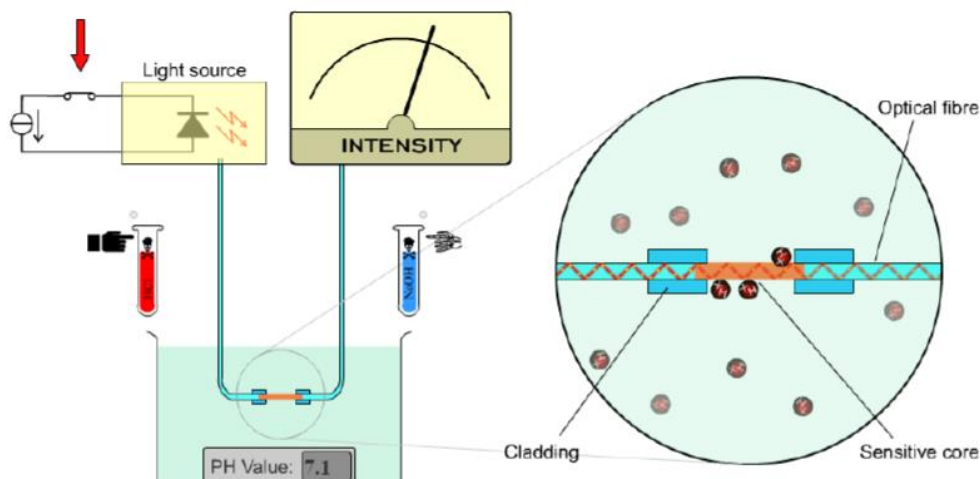
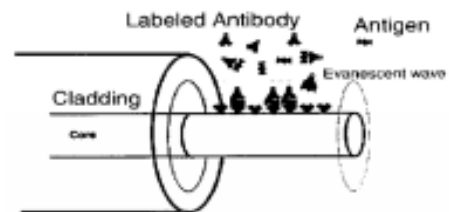
- A. Pequena área de imobilização (apenas no *core*)
- B. Área de interação mais larga, *probing* evanescente
- C. Imobilização numa membrana separada
- D. Quarto de reação + membrana semipermeável



Biossensores de Fibra Ótica

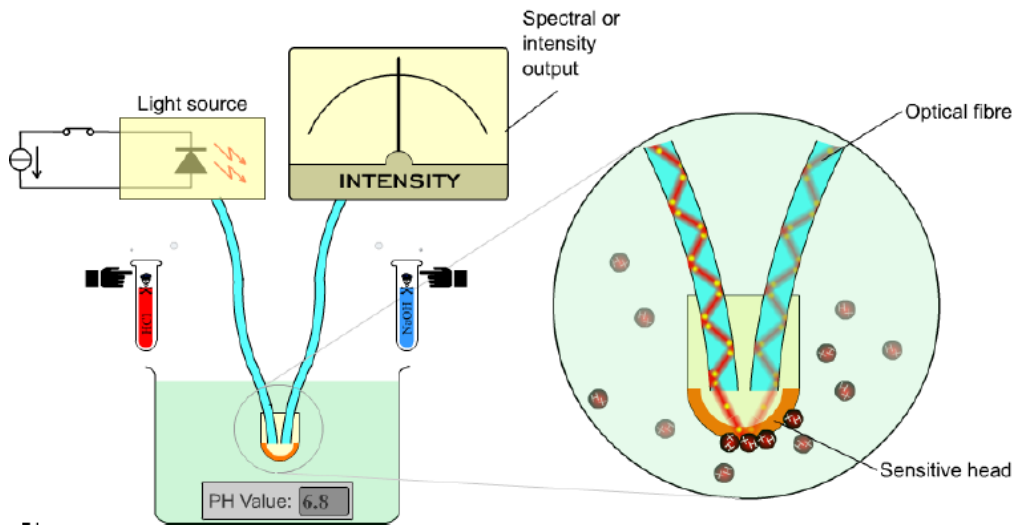
Os biossensores óticos baseados na utilização de fibras óticas podem ser classificados em:

- Intrínsecos
 - Quando a interação com o analito ocorre dentro de um elemento da fibra ótica (está envolvido uma alteração nas características da fibra ótica)
 - Ex: a bainha normal da fibra pode ser removida e substituída por uma fina camada de reagente



- Extrínsecos
 - Fibra ótica é utilizada para acoplar luz (a fibra serve apenas para conduzir a luz do analito para o detetor e da fonte de luz para o analito)

- Esta região é externa à fibra mas por ser adequadamente ligada a esta



Configuração dos Biossensores de Fibra Ótica

A configuração dos biossensores depende:

- Da característica intrínseca ou extrínseca da fibra ótica
- Do modo como a imobilização é realizada
- Da necessidade (ou não) de fonte de luz

Geralmente prefere-se a utilização de várias fibras óticas pois pode ser transportada + luz

Biossensores Extrínsecos

Podem ser:

- Biossensores enzimáticos
- Biossensores de afinidade
- Biossensores baseados em bio ou quimioluminescência

Biossensores de Fibra Ótica Enzimáticos

Está envolvida uma reação enzimática

Os produtos/substratos podem ser detetados:

- Diretamente, se tem propriedades óticas (fluorescência ou absorvência)
- Indiretamente, ligando-se a um químico (forma um complexo com propriedades óticas)

As enzimas são os principais compostos biológicos utilizados na fibra ótica pelo(a):

- O elevado número de reações que catalisam
 - A possibilidade de detectar uma larga gama de analitos
- Os diferentes métodos de detecção que podem ser utilizados

Vantagens

- Não consumidas na reação → podem determinar um composto continuamente
- Extremamente seletivas e sensíveis quando comparadas com reações químicas
- Atuam razoavelmente rápido (comparando com outros recetores biológicos)

A estabilidade da enzima determina o tempo de vida do biossensor

Biossensores de Fibra Ótica de Afinidade

Está envolvida interação antígeno anticorpo

Fator chave no projeto de biossensores imunológicos:

- Anticorpos ligam-se especificamente ao analito de interesse

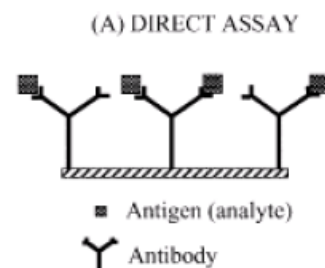
Seletividade

- É uma propriedade específica do anticorpo
- Quanto maior a afinidade do anticorpo ao analito, melhor a sensibilidade

Biossensores Imunológicos de Fibra Ótica

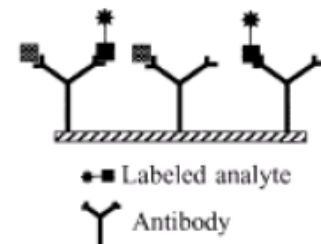
A análise pode ser:

- Direta
 - Antígeno (composto fluorescente natural) é introduzido em excesso onde o anticorpo se encontra imobilizado e a interação é detetada
 - Sinal medido diretamente proporcional à quantidade do antígeno presente



- Competitiva
 - Competição entre analito derivativo, tanto *labeled* como imobilizado, e o analito na amostra, para um número limitado de ligações
 - A quantidade de analito *labeled* e ligado está relacionada com a quantidade de antígeno presente na amostra

(B) COMPETITIVE ASSAY



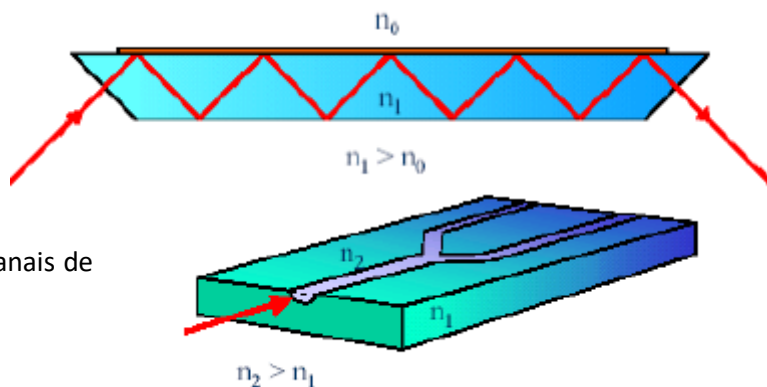
Biossensores de Fibra Ótica Bio/Químio Luminescentes

A enzima que catalisa a reação de emissão de luz é imobilizada na ponta da fibra ótica

O analito alvo é um dos substratos envolvidos no processo de emissão de luz

Em Micro: Guia de Onda

- Guia de luz com ff
– espectroscopia
- Ótica integrada – canais de luz



Onda Evanescente

- Para aumentar a sensibilidade → múltiplas reflexões

$$N = \left(\frac{l}{T} \right) \cot \theta$$

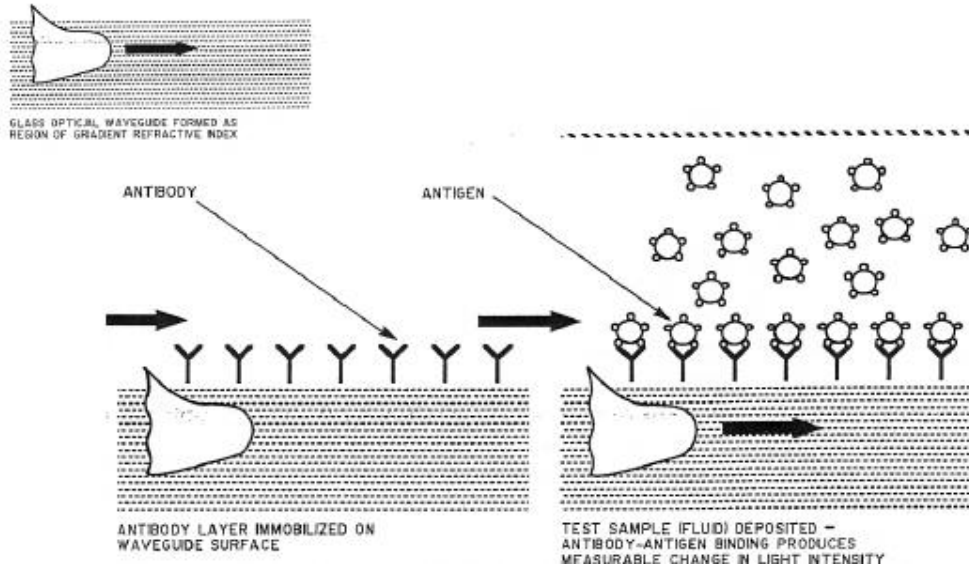
- N – número de reflexões
- l – comprimento
- T – espessura
- θ – ângulo de incidência
- Sendo R a refletividade e α o coeficiente de absorção

$$R = 1 - \alpha d_e$$

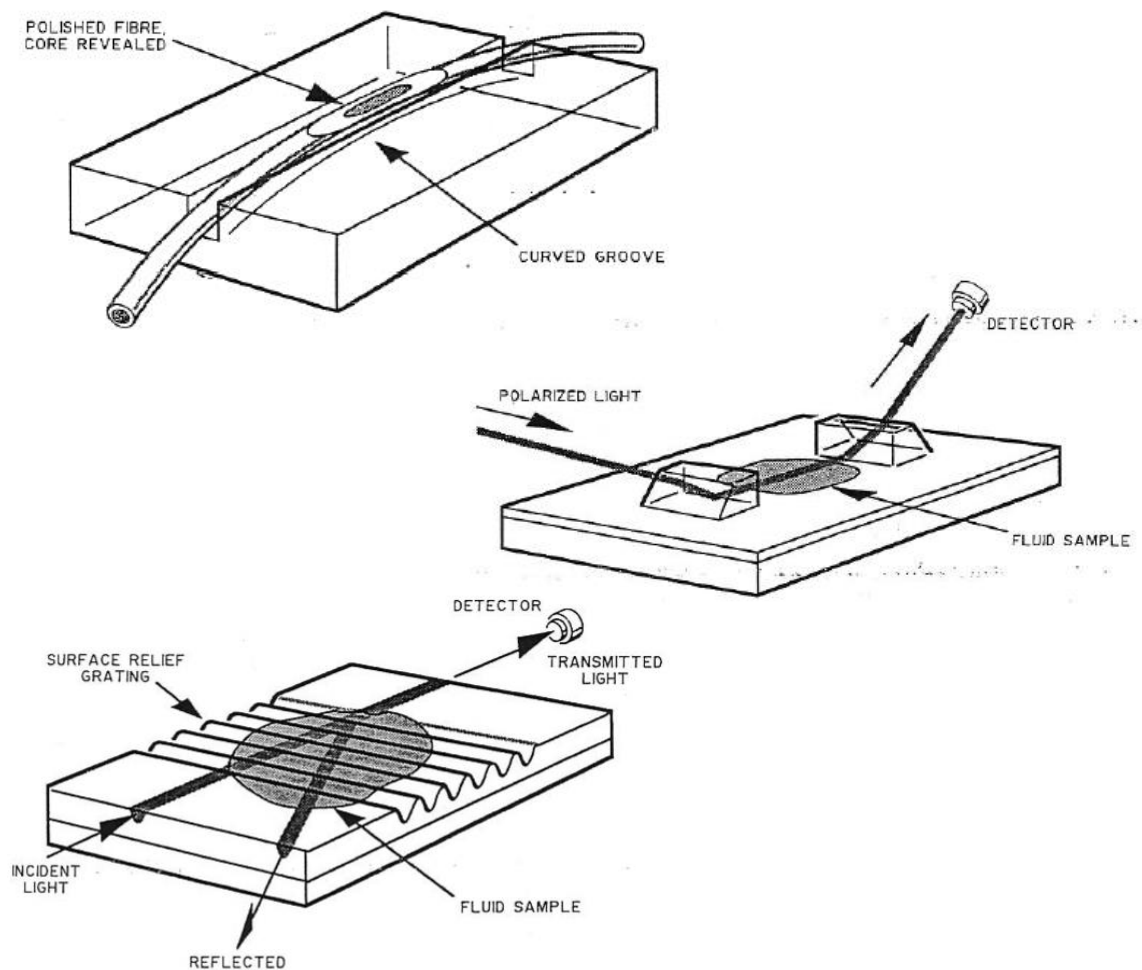
- Para N reflexões

$$R^N = 1 - N\alpha d_e$$

Deteção do Campo num Guia de Ondas



Deteção do Campo num Guia de Onda da Reação Imunológica



Algumas Aplicações de Microbiossensores de Fibra Ótica

- Detecção da superfície

Vantagens Biossensores de Fibra Ótica

- Variedade de métodos óticos para as análises
- Fibras podem ser utilizadas para transmitir luz a longas distâncias
- Biorrecetor não necessita de estar em contato direto com a fibra
- Ajuste apropriado dos índices de refração dos guias de onda e do meio possibilita desempenho de espectroscopia de superfície
- Fibras com capacidade de multiplexagem (podem ser analisados vários analitos simultaneamente numa só fibra)
- Imunes às interferências elétricas/magnéticas (não precisam de eléctrodo de referência)
- Podem ser facilmente miniaturizados a baixo custo
- Um guia de luz pode transportar mais informação que um fio eléctrico
- Fibras têm menos dependência à temperatura que eléctrodos

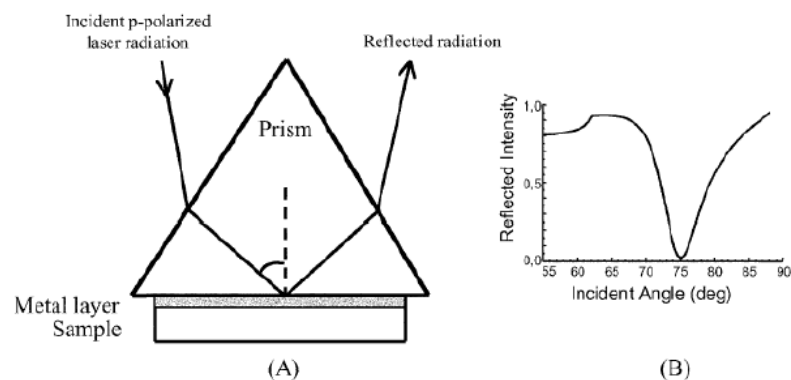
Desvantagens Biossensores de Fibra Ótica

- Interferência da luz ambiente
- Sinal de background (absorvência, fluorescência, etc.)
- Tempos de resposta longos
- Limite da disponibilidade de acessórios óticos otimizados

Técnicas Óticas

- Espectrofotometria por absorção ótica na gama UV e visível
 - Biorrecetor imobilizado perto da fibra ótica/diretamente na sua superfície
 - Lei de *Lambert-Beer*
 - Concentração das espécies a analisar
- Fluorescência
 - Absorvem radiação em certos λ e emitem radiações noutras λ
 - Compostos artificiais e classificados

- Biossensores extrínsecos fluorescentes (setup similar ao de absorvência)
- Biossensores intrínsecos (ligação/libertação de cromóforo que pode ser excitado por onda evanescente)
- A propriedade analítica que determina a concentração de analito pode ser: intensidade, tempo de decaimento, polarização ou fase da radiação)
- Quimioluminescência/Bioluminescência
 - Analito induz emissão de luz/interação com biorrecetor sem necessidade de fonte de luz
- *Surface Plasmon Resonance (SPR)*
 - Fenómeno ótico provocado por oscilações na densidade de carga na interface de dois meios com constantes dielétricas de sinal oposto

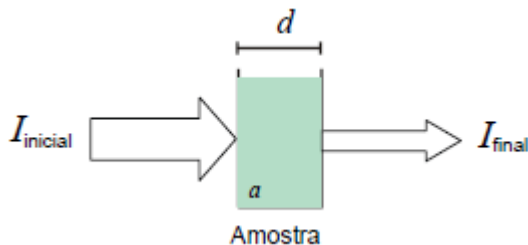


Absorção na Gama da Luz Visível

- Transmissão

$$T = \frac{I_{final}}{I_{inicial}}$$

- I_{final} e $I_{inicial}$ são as intensidades de luz inicial e final, respetivamente



$$I_{final} = I_{inicial}e^{-ad}$$

$$\Leftrightarrow \ln(T) = -ad$$

$$\Leftrightarrow a = -\ln(T) \times d$$

- d – comprimento percorrido pela luz na amostra

- Lei de Lamber-Beer

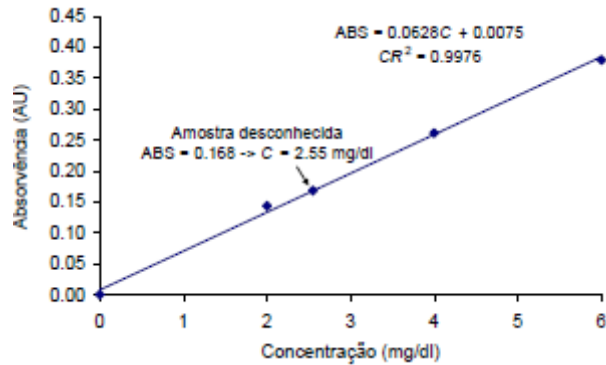
$$A = adC$$

- A – absorvência do parâmetro ótico (medida com espectrofotómetro)

- C – concentração molar (moles/l)
- α – coeficiente de absorção molar num determinado λ (l/(mol m))

Cálculo da Concentração

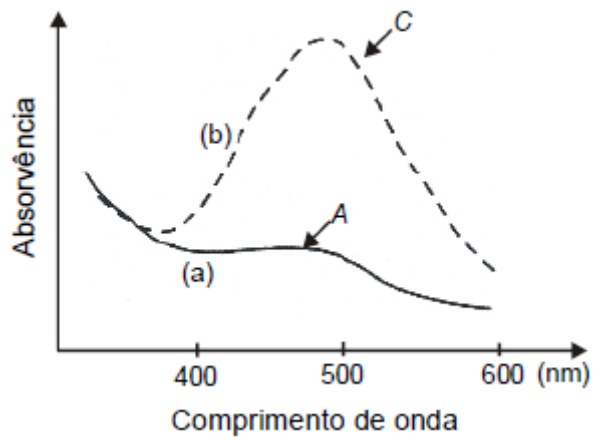
- Constrói-se um gráfico com pelo menos 2 amostras de concentração e absorvência conhecida
- Com o declive da reta (αd) e a absorvência da amostra desconhecida retira-se a concentração



Espetrofotometria na Gama Visível

Reações colorimétricas devem ser:

- Específicas
- Rápidas
- Reprodutíveis
- Valor de absorvência estável

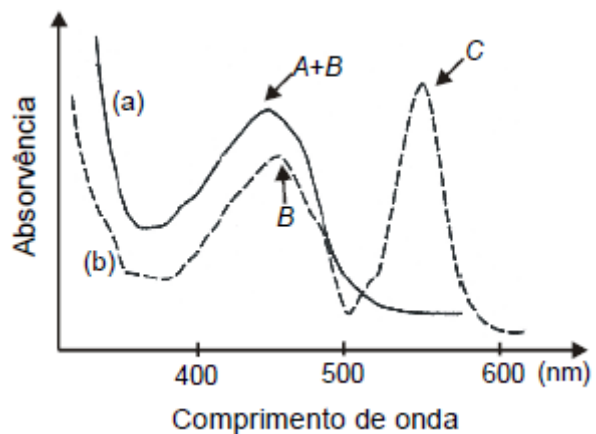


Alteração no espectro de absorção:

- (a) espectro da biomolécula a quantificar
- (b) espectro da mistura da biomolécula A com cromóforo (quantificado por colorimetria)

Alteração no espectro de absorção:

- (a) espectro da biomolécula a quantificar;
- (b) alteração do espectro para desviar o máximo da absorvência da biomolécula A para C.

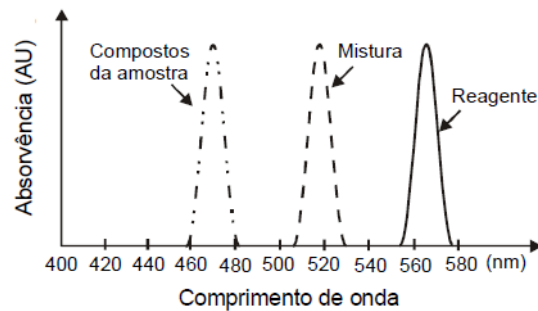


Espetrofotometria por Absorção Ótica na Gama Visível

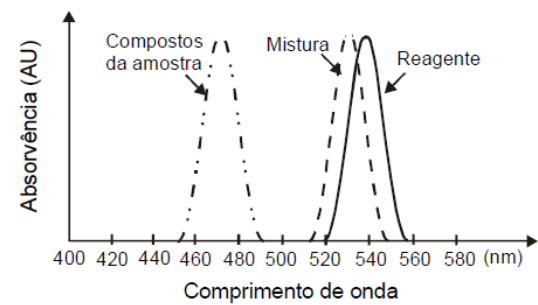
Requisitos para correta leitura de absorvência:

- A concentração da biomolécula na mistura deve ser diretamente proporcional à concentração de biomolécula na mostra
- A leitura de absorvência deve ser feita só após a reação estar completa
- Selecionar o tempo necessário para medição implica conhecer a estabilidade da mistura
- Adequada razão entre a concentração do reagente e a concentração da amostra
- Selecionar o λ necessário para medição

- Se não há sobreposição entre os espectros das absorvências da mistura, reagente e amostra: máximo valor do espectro da absorvência da mistura



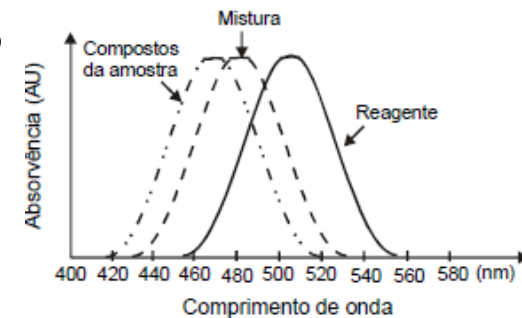
- Se o espectro da mistura tem sobreposição com o espectro do reagente:



$$ABS_{molécula} = ABS_{lida} - ABS_{reagente}$$

- Se todos os espectros (amostra, reagente e mistura) estão sobrepostos

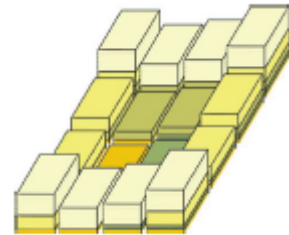
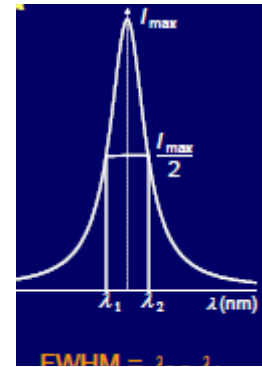
$$ABS_{molécula} = ABS_{lida} - ABS_{reagente} - ABS_{compostos}$$



Aplicações da Detecção por Absorção Ótica

- Medida do pH (*methyl red*)
- Módulo de diálise (a membrana é suportada na ranhura entre dois blocos de teflon)
- Medida de amoníaco (*oxazine perchlorate dye*)

- Detecção de proteínas – detecção colorimétrica
- Tiras teste – método colorimétrico
- Absorção ótica – MicroLab (filtro de *Fabry-Perot*)
 - Escolha dos materiais multicamada: elevada transmissão e elevada seletividade (baixa FWHM) → filmes dielétricos → SiO_2 (índice de refração baixo) e TiO_2 (índice de refração elevado)
 - Requisitos: 16 filtros e sequência de fabrico; menor número possível de camadas; menor número possível de deposições; menor número possível de máscaras
 - 4 máscaras, tendo a segunda o dobro da espessura e o dobro do tempo de deposição da primeira (e assim sucessivamente)
- Dispositivo microfluídico para análise de cortisol na saliva
 - *Cushing's syndrome*; stress; *Addison's syndrome*
 - Método com fácil acesso e não invasivo
 - *PDMS microfluidic die* e *optical detection and readout die*
 - Ensaio competitivo



Questões Capítulo 7 I

Uma cuvete de 1 cm contém uma mistura que absorve a 470 nm e que tem uma absorvidade molar de $10^3 \text{ L}/(\text{mol m})$. Foi feita a linha de referência com o branco ($ABS = 0 \text{ uni. arb}$). A absorvência da mistura foi de $ABS = 0,85 \text{ uni. arb}$.

Qual a concentração da substância em análise?

-

Capítulo 7 II

Fluorescência Molecular

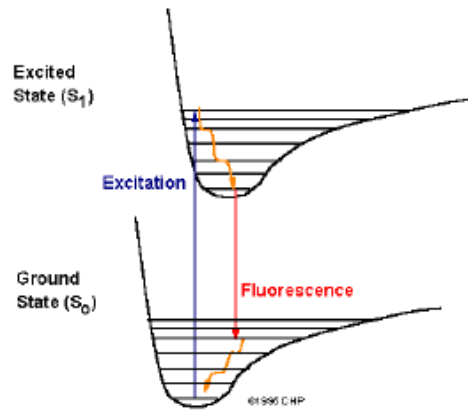
- Emissão ótica das moléculas que foram excitadas para níveis de energia mais elevados através da absorção da radiação eletromagnética

$$S_0 \rightarrow S_1 + hc$$

- h - constante de Planck
 - c - frequência de luz fluorescente
- Quanto maior a eficiência quântica, φ , maior o potencial da molécula para fluorescer

$$\varphi = \frac{r_f}{r_f + r_{nf}}$$

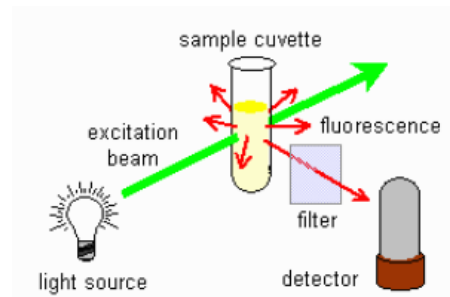
- Com $0 < \varphi < 1$



Fluorescência

$$F = I_0 \times \varphi \times (1 - 10^{-\alpha Cd})$$

- I_0 - intensidade da fonte de excitação
- F - intensidade de luz emitida
- α - coeficiente de absorção molecular
- C - concentração na mistura
- d - caminho ótico



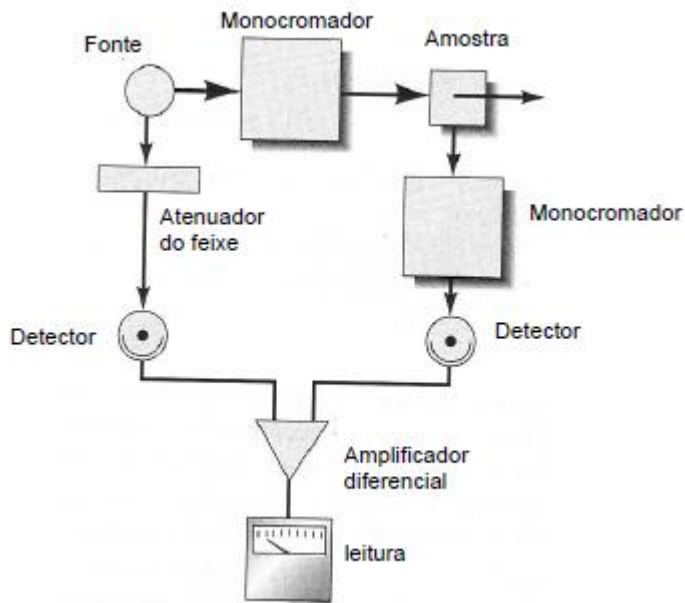
$$F = I_0 \times \varphi \times \left[2.3\alpha Cd - \frac{(-2.3\alpha Cd)^2}{2!} - \frac{(-2.3\alpha Cd)^3}{3!} - \dots \right]$$

- Fazendo $\alpha Cd = A < 0.05$ (A é a absorvência)

$$F = I_0 \times \varphi \times 2.3\alpha Cd$$

$$F = k \times C$$

Fluorímetro de 2 Feixes



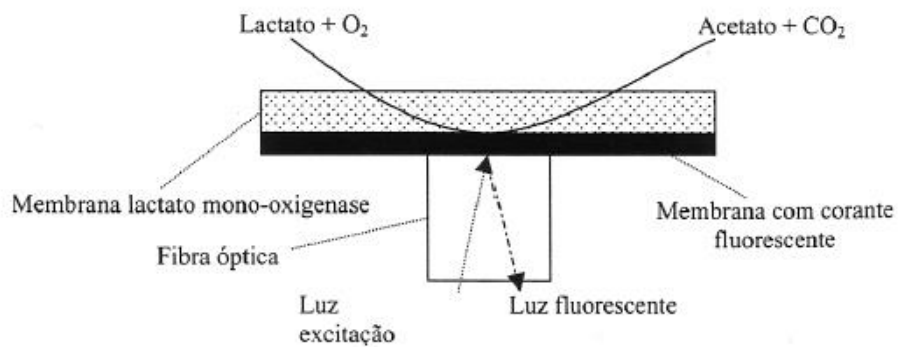
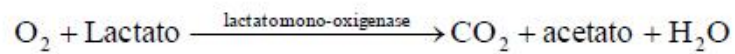
Aplicações da Detecção por Fluorescência

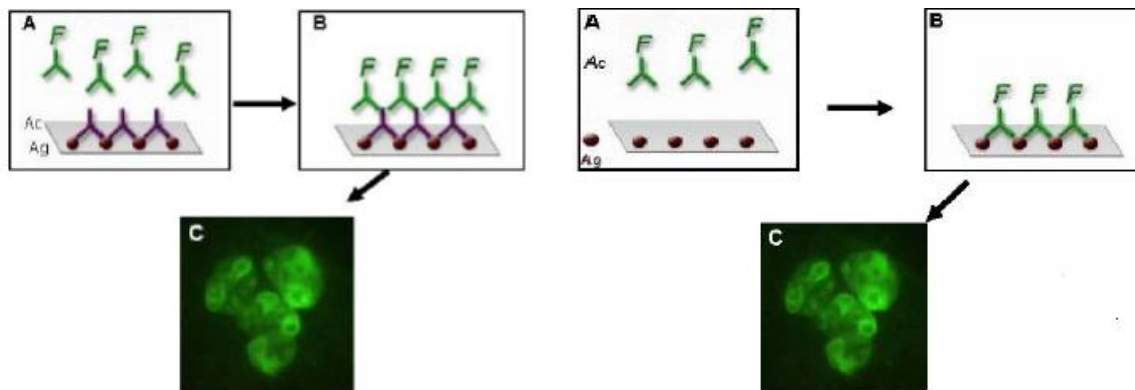
Produção de fermento de padeiro

- Determinação de pH

Deteção de lactato

- Mede a variação da concentração de oxigénio molecular





Teste de Imunofluorescência Indireta

Teste de Imunofluorescência Direta

BioChips

- Pequenos retângulos recobertos de vidro/silicone, que servem como plataforma para fixação de DNA

Análise de Proteínas

- A amostra move-se através dos microcanais
- A amostra é injetada no canal de separação
- As proteínas são separadas de acordo com o seu tamanho
- As proteínas são detetadas por fluorescência

Análise de Células

- Buffer e as células são colocadas nos reservatórios
- É aplicado vácuo no reservatório 'V'. O líquido e as células são movidos por pressão.
- As células são atraídas hidrodinamicamente para uma parte do canal através do buffer
- As células passam o detetor separadamente onde são analisadas por fluorescência

Quimioluminescência

- Estado de ativação → energia de uma reação química
- Emissão de luz visível
- Compostos mais conhecidos: luminol, siloxene, lucigen, lopine
- Oxidação dessas substâncias: luminol (label)

Aplicações da Detecção por Quimioluminescência

Ensaio imunológico

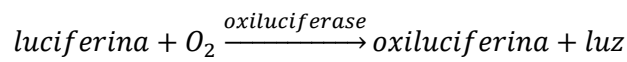
- Anticorpo – label fluorescente
- Antígeno – label quimioluminescente

Biossensor de fibra ótica para H_2O_2

- Peroxidase imobilizado gel *polyacrylamida*; luminol no fim da fibra
- Não existe fonte de luz externa
- Determinar glucose (sensor deteta reação catalisada pela glucose-oxidase)

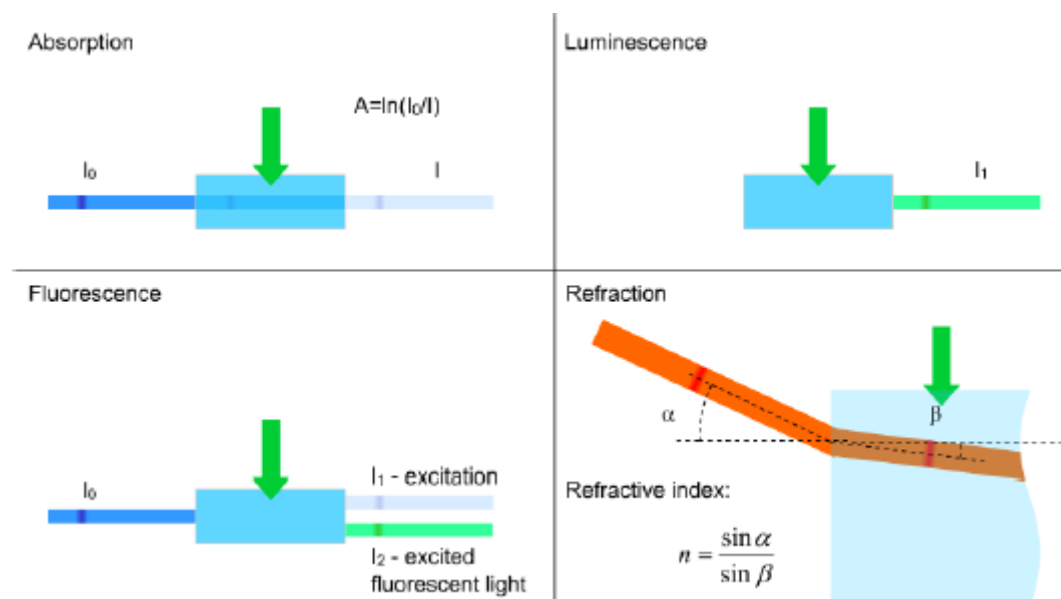
Bioluminescência

- Fornece métodos analíticos importantes
- Energia de uma reação bioquímica libertada na forma de fotões de luz → proteínas luciferinas → passa de um estado de excitação para um estado menos excitado

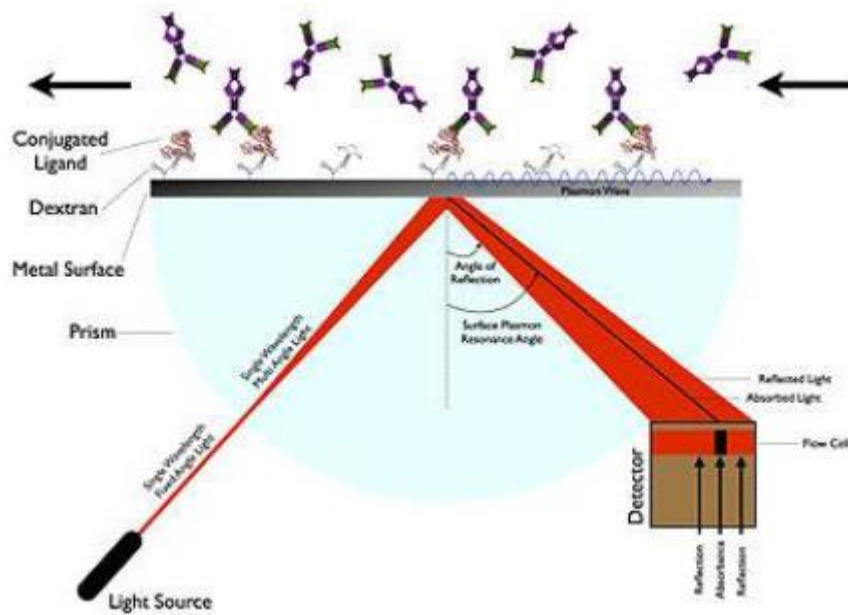


- Bacteriológica ou produzida pelo próprio animal de forma extra ou intracelular num tecido chamado lanterna quando inala oxigénio

Técnicas Óticas



SPR – Princípios Básicos: Reflexão Interna Total



SPR – Princípios básicos: Plasmon

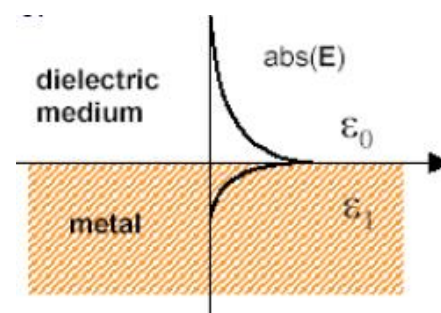
- Quase partícula resultante da quantificação das oscilações de plasma; híbrido entre um plasma de um elétron e um fóton
- Ocorre ressonância se os momentos das 2 partículas forem iguais (Eq. de Maxwell)
- Quando os fótons incidem com um determinado ângulo característico um metal, os fótons sofrem uma hibridização com os elétrons do metal, dando origem a um *plasmon*.

SPR – Princípios básicos: Plasmon de Superfície

- Onda eletromagnética de superfície que se propaga paralelamente à interface metal/dielétrico
- Para que este fenômeno ocorra é necessário
 - Ângulo incidente ser correto
 - Constantes dielétricas dos dois meios da interface sejam de sinal oposto

SPR – Princípios básicos: Onda Evanescente

- Amplitude da onda diminui exponencialmente
- $\lambda = \lambda_{onda\ incidente}$
- Energia dissipada por calor



- Na refração
 - Alteração do meio → alteração do índice de refração
- Na onda evanescente
 - Alteração do meio → alteração da velocidade dos plasmons → alteração do momento → alteração do fenómeno de hibridização → alteração da intensidade de luz refletida

SPR – Princípios Básicos: Tipos de Medição do SPR

Angular:

- Alteração do momento → alteração do ângulo de ressonância

Espetral:

- Ângulo constante + variar λ → ocorre ressonância

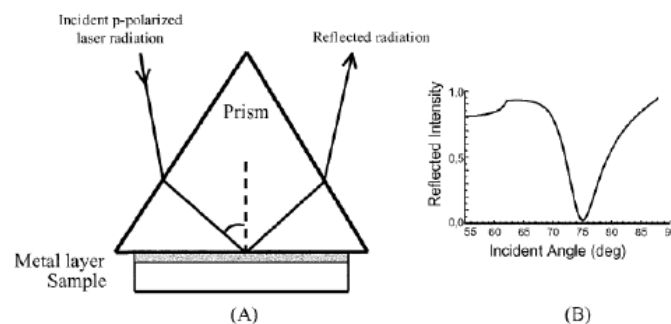
SPR – Parâmetros dos SPR

O ângulo de ressonância depende de 3 fatores:

- Das propriedades do filme metálico
- Do comprimento da onda do feixe incidente
- Do índice de refração do meio (índice de refração é sensível à temperatura → manter T constante)

SPR

Fenómeno ótico provocado por oscilações na densidade de carga na interface de dois meios com constantes dielétricas de sinal oposto



Surface Plasmon: Resumo

- Onda eletromagnética, excitada com luz polarizada, que se propaga ao longo de metal
- Excitação provocada por ondas evanescentes; feixe de luz incidente é refletido na superfície de um substrato de vidro coberto com uma camada fina de metal
- Escolha apropriada do metal e espessura → SPR → absorção da luz a um determinado ângulo do feixe de luz incidente
- *Plasmon* gerado quando os fótons interatuam com os elétrons da camada de metal → oscilações das cargas da superfície

Parâmetros dos Sensores: Filme Metálico

Elétrons na banda de valência

Metais possíveis: Ag, Au, Cu, Al, Na, Ir

- Ir → demasiado caro
- Na → muito reativo
- Cu e Al → possuem resposta de SPR muito alargada
- Ag → muito suscetível a oxidação
- Au mais utilizado

Parâmetros dos Sensores: Feixe de Luz

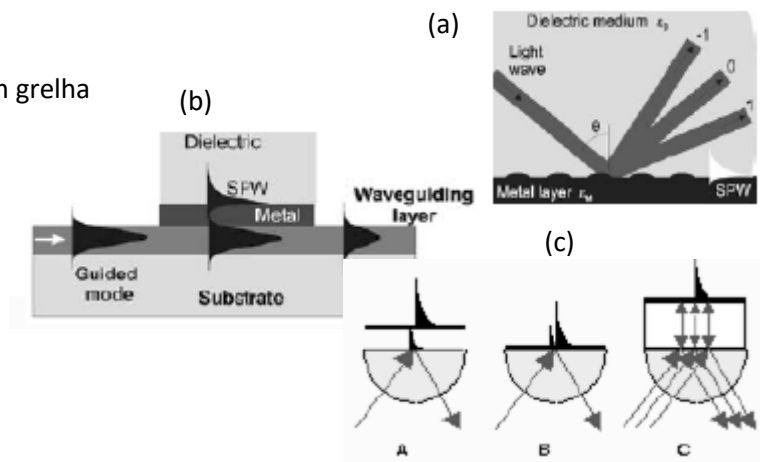
- Monocromática
- Luz p-polarizada (se não for p, não sofre ressonância, só provoca ruído)

Princípio do Biossensor de Afinidade SPR

- A maior parte do campo da SPW está concentrado no dielétrico → constante de propagação da SPW é sensível a alterações no índice de refração do dielétrico
- Elementos de reconhecimento biomolecular na superfície do metal reconhecem e capturam analitos presentes numa amostra líquida, produzindo um aumento (local) no índice de refração da superfície do metal

Configurações dos SPR

- (a) Sistema de difração em grelha
- (b) Sistema de guia de onda ótico
- (c) Sistema de reflexão total atenuada de prisma acoplado



Quantificação

A interação de uma onda de luz com uma SPW pode alterar as características da luz

- Amplitude
- Fase
- Polarização
- Distribuição espectral

Alterações nesta característica → alterações na constante de propagação da SPW

Alterações induzidas no índice de refração na interface → alterações na constante de propagação da SPW → determinadas pela alteração de uma das 4 características

Surface Plasmon Resonance (SPR)

- Luz refletida desaparece para determinado ângulo (en. luz transferida para *plasmons*)
- Moléculas ligadas à superfície do metal → índice de refração altera-se → condição de ressonância altera-se
- Determinado ponto de trabalho para maior inclinação → alterações no índice medidas em tempo real

Biossensor SPR

- Alterações do coeficiente de reflexão proporcional à quantidade de analito ligado
- Concentração das moléculas calculada se condições de eq. forem conhecidas

Biossensor SPR de Fibra Ótica

- Remoção da camada isolante; depois esta é colocada num bloco de sílica
- Zona da fibra ótica polida revestida por método de evaporação em vácuo por 3 camadas:
 - Camada de crómio (facilita adesão)
 - Camada de metal (ouro)
 - Camada dielétrica

Conclusões Biossensores SPR

- Detecção de substancias em escalas nanométricas (elevada sensibilidade)

Vantagens:

- Versatilidade
- Não necessita de marcadores
- Elevada velocidade de análise
- Flexibilidade

Limitações

- Técnica de fabrico de membranas imobilizadas
 - Membranas devem ser depositadas precisamente (na região mais sensível do elemento ótico)
 - Camada depositada não se deve desprender durante utilização
 - Enzima de cobertura deve ser compatível com processo do circuito integrado
- Especificação da deteção
- Sensibilidade a efeitos que produzem interferência (luz ambiente)
- Tempos de resposta longos
- Custo de fabrico mais elevado que sensores eletroquímicos

Questões Capítulo 7 II

Na figura, qual é o espectro de excitação e o espectro de emissão?

- Emissão → luz visível → gráfico de baixo

Qual é a diferença entre bioluminescência e quimioluminescência?

- A quimioluminescência biológica converte a energia de ligações químicas em luz; normalmente, tem baixa eficiência → não é detetável pelo olho humano
- Na bioluminescência a eficiência de emissão é muito elevada → sinais luminosos visíveis a outros organismos → úteis como meio de comunicação biológica.

