



Mestrado Integrado em Eng. BIOMÉDICA e Eng. FÍSICA

UC – BIOSSENSORES

Cap3 – Métodos de Imobilização dos elementos biológicos



Imobilização dos elementos biológicos

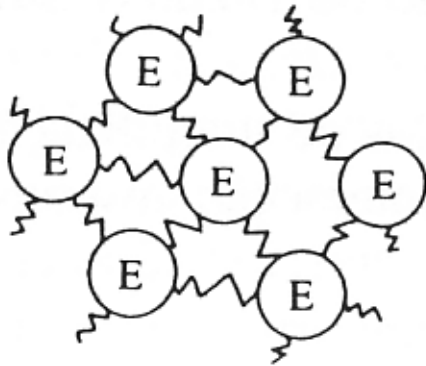
Para se fazer um biossensor fiável, o elemento biológico deve ser adequadamente ligado ao transdutor.

Para anexar o elemento de sensorização ao transdutor alguns destes métodos são utilizados em combinação.

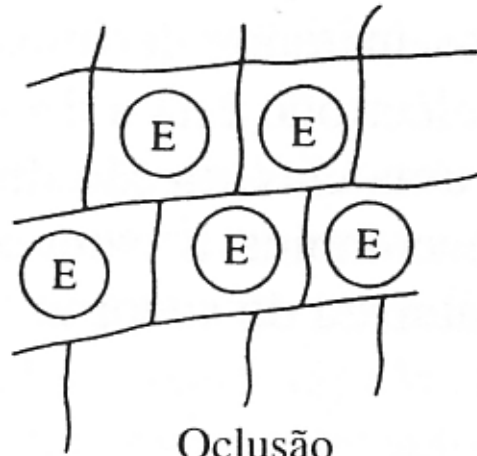
- adsorção (é o método mais simples)
- micro-encapsulamento (mais popular)
- cilada ou oclusão (numa matriz polimérica ex.)
- ligação covalente (ligação directamente ao transdutor)
- ligação cruzada ou reticulação (entre moléculas individuais de um determinado material)



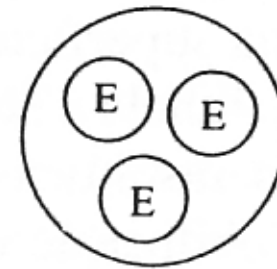
Métodos de Imobilização



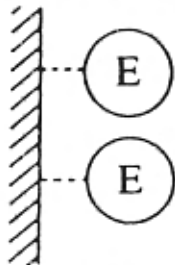
Reticulação



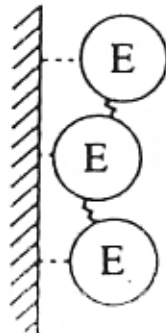
Oclusão



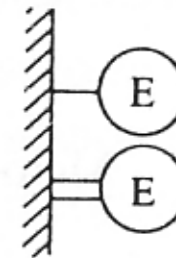
Microencapsulação



Adsorção



Adsorção-Reticulação



Ligação covalente

Métodos de Imobilização

O tempo de vida do biossensor aumenta com uma adequada imobilização.

Para o mesmo biossensor, no qual são utilizados diferentes métodos de imobilização, temos 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

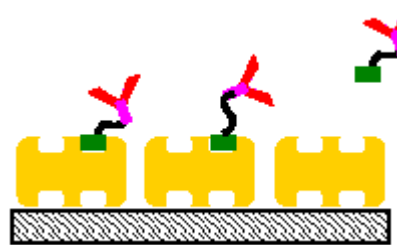


Adsorção

Adsorção directa numa membrana ou transdutor:



Adsorção em proteínas pré-adsorvidas (adsorção usada em conjunto com outro método):



Adsorção e
micro-encapsulamento

Por ex. Uma enzima é adsorvida na superfície de um eléctrodo e depois aí imobilizada com uma membrana ou outra forma de encapsulamento.

Adsorção

Adsorção pode ser (grosseiramente) dividida em 2 formas:

Adsorção física

Adsorção química

Normalmente a **adsorção física** é fraca e ocorre através da formação da ligação denominada de “Van der Waals”.

São forças atractivas relativamente fracas que actuam nos átomos neutros e nas moléculas e que aparecem devido à polarização eléctrica induzida em cada uma das partículas pela presença de outras partículas



Adsorção

Adsorção química é bem mais forte e envolve a formação de ligações covalentes.

Existem várias equações que são utilizadas para descrever a adsorção, mas a mais utilizada é o **Modelo de Langmuir para adsorção reversível** que é derivada das considerações cinéticas e relaciona a fracção da superfície coberta pelo adsorvente com vários parâmetros cinéticos.

O biomaterial adsorvente é muito susceptível a alterações de pH, temperatura, força iónica e ao substrato.

Contudo, este método tem provado ser satisfatório em investigações (pouca duração).



Adsorção

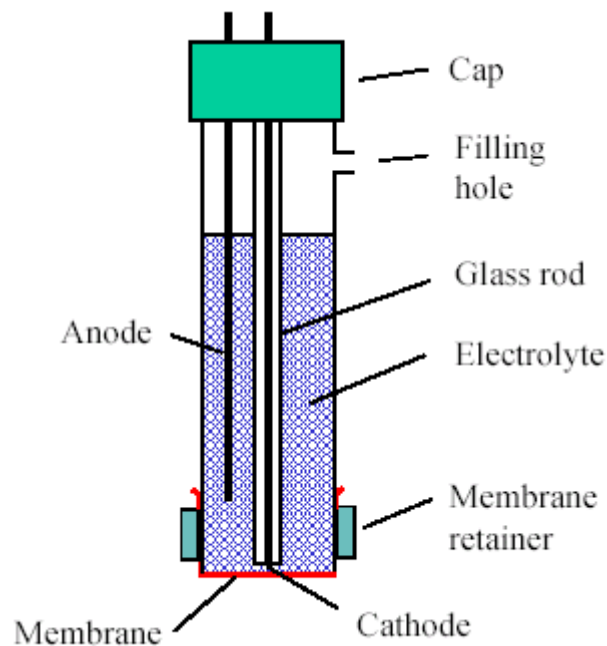
Em experiências envolvendo o método de adsorção, o valor normalmente medido é a concentração da superfície, ou seja, em ng/cm^2 ou $\mu\text{g/cm}^2$, normalmente denotado por Teta.

Se assumirmos uma monocamada completamente coberta, podemos calcular a área efectiva por molécula de proteína na superfície



Micro-encapsulamento

Neste método, é utilizada uma membrana inerte para ligar o biomaterial ao transdutor.



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.

Micro-encapsulamento

O primeiro **biossensor de glucose** utilizou esta técnica



Clark cell

Micro-encapsulamento

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 e concentração do substrato
 - Pode actuar como um dispositivo embutido para limitar contaminações e biodegradações pelo que se for utilizado com um paciente, a infecção pode ser evitada
- Existe sempre a opção de ligar o elemento biológico ao sensor através de moléculas que conduzem electrões, tais como *polypyrrole*



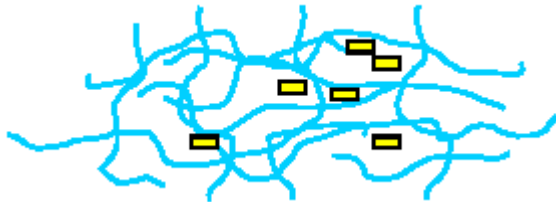
“Cilada” ou Oclusão

Um gel polimérico é preparado numa solução contendo o material biológico.

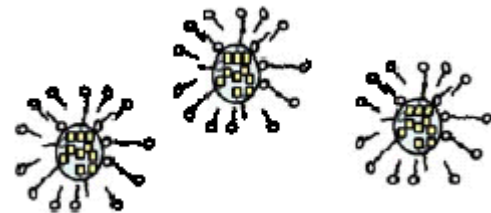
A enzima é então ligada dentro da matriz

Polímero mais comum: *polyacrylamida* (a polimerização pode ser efectuada pela radiação UV na presença de vitamina B1)

Gel



Partículas de carbono que são incorporadas num gel ou membrana



“Cilada” ou Oclusão

Outros materiais: nylon, polímeros condutores, gel *silastic*

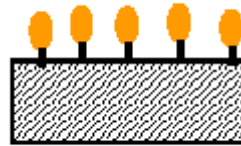
Problemas deste método:

- São criadas grandes barreiras, inibindo assim a difusão no substrato, o que abranda a reacção e de igual modo o tempo de resposta do sensor.
- Existe perda da actividade enzimática através dos poros no gel, contudo isto pode ser ultrapassado pela ligação cruzada



Ligação cruzada

Esta abordagem utiliza agentes biofuncionais para ligar o biomaterial aos suportes sólidos, e provou ser um método com sucesso para estabilizar enzimas adsorvidas



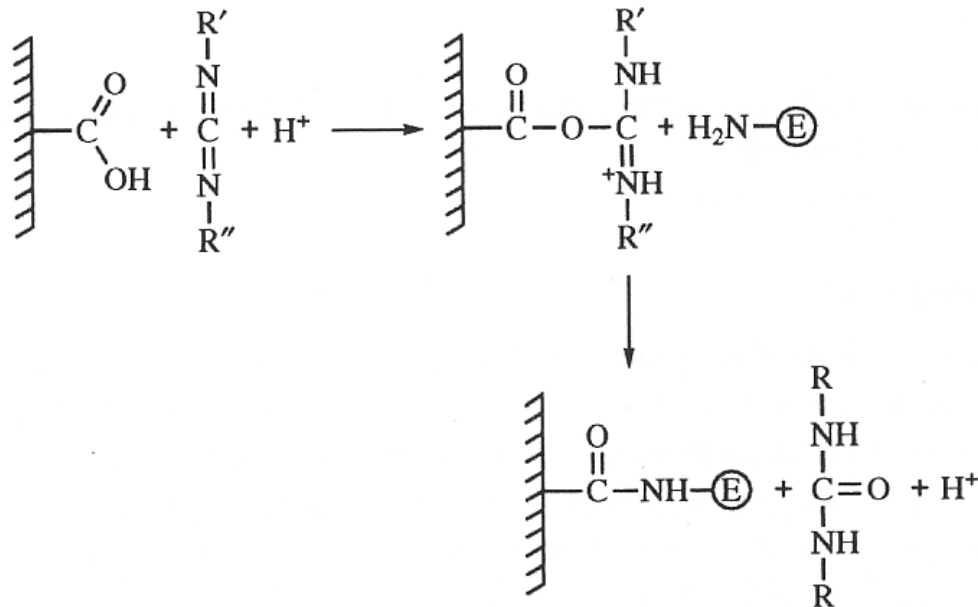
Ligação cruzada (através da *glutaraldehyde*) ao transdutor ou membrana

Desvantagens:

- A enzima pode estragar-se
- Difusão do substrato é limitada

Ligação covalente

Envolve uma ligação entre um grupo funcional no biomaterial e a matriz de suporte



Através dos químicos
COOH, NH₂, OH



} Covalent bonding of an enzyme to a transducer via a carbodiimide.

Ligação covalente

Envolve uma ligação entre um grupo funcional no biomaterial e a matriz de suporte

A reacção deve funcionar em condições de baixa temperatura, baixa força iónica, e pH neutro, e deste modo a enzima não será perdida do biossensor quando se utiliza esta técnica.

Um dos principais objectivos da ligação de enzimas a eléctrodos é para se obter bom contacto eléctrico e assim facilitar uma rápida transferência de electrões.

Isto é particularmente importante quando se desenvolvem biossensores que envolvem a transferência directa de electrões e não através de um intermediário => **Daí a ligação covalente**



Discussão

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



Discussão

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



Discussão

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

E se for para bactérias?

