Paula Cristina de Almeida Jerónimo

SENSORES ÓPTICOS DE MATRIZ SOL-GEL COM INTERESSE NA ANÁLISE FARMACÊUTICA E CLÍNICA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO
2005

Paula Cristina de Almeida Jerónimo

SENSORES ÓPTICOS DE MATRIZ SOL-GEL COM INTERESSE NA ANÁLISE FARMACÊUTICA E CLÍNICA

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

U.PORTO
FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

PORTO
2005

Trabalho realizado no Departamento de Química-Física
da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto
com o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não seria possível sem vários apoios com que pude contar ao longo do período de doutoramento, e que não posso deixar de referir:

- Prof. Doutor Alberto Araújo, que tive o privilégio de ter como orientador, e a quem devo grande reconhecimento e admiração pela forma como orientou o meu trabalho.
- Prof. Doutora Maria da Conceição Montenegro, a quem agradeço todo o apoio enquanto co-orientadora e a forma como contribuiu para o meu enriquecimento científico e pessoal.
- Fundação para a Ciência e Tecnologia, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio, a quem agradeço a bolsa de doutoramento atribuída e o apoio financeiro, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.
- Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, que me acolheu como estudante de doutoramento.
- Prof. Doutor José Luís Costa Lima, que como director do Departamento de Química Física da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto me recebeu no laboratório e me disponibilizou todos os meios necessários para a realização deste trabalho.
- Profs.(as) Doutores(as) Agostinho Almeida, Beatriz Quinaz, Eduarda Fernandes, João Santos, Lúcia Saraiva, Marcela Segundo, Rui Lapa e Salete Reis, a quem agradeço por tão bem me terem recebido no laboratório e pelo apoio por todos disponibilizado.
- Os meus colegas e amigos do laboratório: Adriana Pimenta (Doutora), Célia Amorim, Christophe Siquet, Cristina Lopes, David Costa, Emília Santos, Helena Ferreira, João Prior, Karine Marques, Luís Magalhães, Luísa Silva, Marlene Lúcio, Marta Ribeiro, Nestor Zarate, Paula Pinto, Pedro Maia, Rodrigo Santos, Sofia Gomes; a todos agradeço a amizade, o companheirismo, a boa-disposição, a ajuda preciosa.... enfim, por me aturarem!
- Grupo de Instrumentação e Automação do Departamento de Química Analítica do Instituto de Física da UNICAMP, em particular aos Profs. Doutores Ivo Raimundo e Celio Pasquini, a quem agradeço a imensa hospitalidade aquando da minha estadia em Campinas, bem como os meios e apoio disponibilizados para a realização do trabalho.
- Prof. Doutor Julián Alonso, do Departamento de Química Analítica da Faculdade de Ciências da Universidade Autónoma de Barcelona, Grupo de Sensores e Biosensores, que me recebeu e possibilitou a realização de ensaios de caracterização de sensores.
- Prof. Doutora Cristina Couto, a quem agradeço a atenção dedicada.
- D. Belmira Pereira, a quem agradeço todo o apoio e amizade demonstrados.
- Dra. Isabel Cardoso, a quem estou grata pelas longas conversas científicas, lições de vida, sábios conselhos, incentivos, elogios ou nem-por-isso, e pela sua valiosa amizade.
- Pedro Fernandes, a quem agradeço a realização das fotografias incluídas na tese.
- Os meus amigos, sempre presentes.
- Os meus pais e o meu irmão, a quem dedico esta tese.

ÍNDICE

Resumo	xi
Abstract	xiii
Résumé	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO I	
SENSORES QUÍMICOS COM TRANSDUÇÃO ÓPTICA	
1.1. Sensores químicos: definição e classificação	9
1.2. Sensores ópticos	12
1.2.1. Vantagens e classificação dos sensores ópticos	12
1.2.2. Configurações básicas dos (bio)sensores ópticos	15
1.2.3. Instrumentação e componentes básicos	19
1.2.4. Princípios da transdução óptica	28
1.2.5. A fase reactiva	36
1.2.5.1. Interacção com o analito	36
1.2.5.2. Elementos de reconhecimento (bio)químico	40
1.2.5.3. Matrizes e suportes para imobilização de agentes de reconhecimento	43
1.3. Aplicações analíticas dos (bio)sensores ópticos	50
Referências bibliográficas	55
CAPÍTULO II	
A QUÍMICA SOL-GEL	
2.1. Introdução	63
2.2. O processo sintético sol-gel	65
2.2.1. Etapas do processo sol-gel	67
2.2.2. Factores que influenciam o processo sol-gel	76

2.2.2.1.Tipo de precursor 77
2.2.2.2. Efeito do pH 80
2.2.2.3. Natureza e concentração do catalisador 83
2.2.2.4. Razão molar H_2O:Si (R) 87
2.2.2.5. Efeito do solvente 88
2.2.3. Preparação de filmes pelo processo sol-gel 91
2.2.4. Vantagens e aplicações da tecnologia sol-gel 97
2.3. Sensores ópticos baseados em filmes sol-gel 99
2.3.1. Imobilização de elementos de reconhecimento (bio)químico 100
2.3.2. Aplicações analíticas 105
Referências bibliográficas 118

CAPÍTULO III

ASPECTOS GLOBAIS DA PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Objectivos 129
3.2. Desenvolvimento e optimização de sensores ópticos baseados em filmes sol-gel 130
3.2.1. Preparação de soluções sol-gel 131
3.2.2. Protocolo de deposição dos filmes sol-gel 134
3.2.3. Metodologias de caracterização dos filmes obtidos 135
3.2.4. Características dos sensores desenvolvidos: parâmetros de qualidade 142
3.3. Acoplamento de sensores ópticos a sistemas de fluxo contínuo 146
3.3.1. Multicomutação e amostragem binária 147
3.3.2. Componentes e optimização das montagens de fluxo multicomutado 149
3.3.3. Avaliação da qualidade dos resultados obtidos 154
Referências bibliográficas 156

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ÓPTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES CATIÓNICAS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

4.1. Determinação colorimétrica de bismuto em produtos farmacêuticos utilizando um sensor óptico acoplado a um sistema de fluxo multicomutado 159
4.2. Desenvolvimento de um sensor óptico de matriz sol-gel para determinação de zinco em produtos farmacêuticos 169

CAPÍTULO V

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ÓPTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES CATIÓNICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.1. Determinação directa de cobre na urina utilizando um sensor óptico associado a um sistema de fluxo multicomutado 183

CAPÍTULO VI

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR ÓPTICO PARA APLICAÇÃO NA ANÁLISE FARMACÊUTICA

6.1. Biosensor óptico associado a um sistema de fluxo multicomutado para determinação de acetazolamida em produtos farmacêuticos 195

CONSIDERAÇÕES FINAIS 205

RESUMO

O desenvolvimento de sensores e biosensores ópticos tem sofrido uma grande expansão nos últimos anos, beneficiando dos avanços nas áreas das telecomunicações, química de materiais, microelectrónica e nanotecnologia. Concretamente na área química, a maioria dos sensores ópticos existentes baseia-se em princípios de transdução como a fluorescência ou a absorvância. Neles, a resposta analítica é conseguida pela alteração das propriedades ópticas de um agente de reconhecimento imobilizado num suporte sólido devido à interacção com a espécie a determinar. Apesar do seu elevado potencial analítico e da simplificação do controlo que suscitam em áreas diversas, algumas limitações relacionadas com a diversidade da sua oferta, a estabilidade, sensibilidade e tempo útil de algumas unidades, fazem com que a utilização prática destes sensores seja ainda restrita. Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de novos sensores ópticos, por imobilização de agentes químicos e bioquímicos em filmes sol-gel, e a sua aplicação ao controlo farmacêutico e clínico. No que concerne à obtenção de suportes rígidos para desenvolvimento de sensores ópticos, a tecnologia sol-gel é reconhecida pela sua versatilidade e pelo modo como permite, de forma simples, manipular a estrutura, composição e configuração física dos materiais obtidos, mediante o controlo rigoroso dos parâmetros reaccionais. Neste sentido, procedeu-se a um estudo sistemático do processo sol-gel: foram avaliados parâmetros como o tipo de precursor, o catalisador, a quantidade de água, o tempo de envelhecimento e as condições de deposição dos filmes finos. Os sensores obtidos, depois de optimizados e caracterizados, foram acoplados a sistemas de fluxo contínuo baseados nos conceitos de multicomutação e amostragem binária. Estes permitiram o processamento automático e flexível das soluções, maximizando as características de sensibilidade, tempo de resposta e estabilidade dos sensores. Foram desenvolvidos quatro metodologias assentes nesta abordagem: um sensor baseado na imobilização de laranja de xilenol foi aplicado à determinação de bismuto em várias formulações farmacêuticas; um sensor óptico obtido pela imobilização de 4-(2-piridilazo)resorcinol foi aplicado à determinação de zinco em insulinas de acção lenta; o mesmo sensor foi utilizado para determinação de cobre na urina; finalmente, a imobilização da enzima anidrase carbónica, associada a um indicador de pH (vermelho de cresol), resultou num biosensor óptico que foi utilizado para determinação de acetazolamida em formulações farmacêuticas. As metodologias

desenvolvidas são simples, versáteis e económicas, constituindo uma alternativa viável a procedimentos analíticos mais morosos e dispendiosos utilizados na rotina laboratorial.

ABSTRACT

The development of optical sensors and biosensors has experienced a great development in the recent years, instigated by improvements in the fields of telecommunication industry, chemistry of materials, microelectronics and nanotechnology. Most of the optical sensors currently used in the chemistry area are based on transduction phenomena such as fluorescence or absorbance. The analytical response is accomplished by a recognizing agent immobilised in a solid support, which interacts with a species of interest to undergo a change in its optical properties. Despite the enormous analytical potential these sensors offer, and the simplification of chemical control that they bring to several areas, their practical application is still restricted, due to some limitations concerned with the diversity of available sensing devices, as well as stability, sensitivity and useful lifetime of some sensor units. In this work, the development of new optical sensors, by means of immobilisation of chemical and biochemical recognizing agents in sol-gel thin films, and their application to pharmaceutical and clinical control, is described. As far as preparation of solid supports for development of optical sensors is concerned, the sol-gel technology is well known for its versatility, and for providing a simple means of tailoring the structure, composition and shape of the obtained materials, through strict control of the reaction parameters. Hence, a systematic study of the sol-gel process was performed: variables such as the type of precursor, catalyst, amount of water, aging time and thin films deposition conditions were considered. The obtained sensors, after being optimised and fully characterized, were coupled to continuous flow systems based on a multicommutation and binary sampling approach. These systems enabled automatic and flexible processing of solutions, maximizing the sensitivity, response time and stability of the sensors. Based on this strategy, four different methodologies were developed: a sensor based on the immobilisation of xylenol orange was applied to the determination of bismuth in pharmaceuticals; an optical sensor obtained by immobilisation of 4-(2-pyridylazo)resorcinol was applied to the determination of zinc in slow-action insulin; the same sensor was used for the determination of copper in urine; finally, the immobilisation of the enzyme carbonic anhydrase, together with a pH indicator dye (cresol red), rendered an optical biosensor that was applied to the determination of acetazolamide in pharmaceuticals. The developed methodologies are simple, versatile and economical,

presenting a feasible alternative to more expensive and time consuming routine analytical procedures.

RÉSUMÉ

Le développement de senseurs et bio-senseurs optiques est en grande expansion ces dernières années grâce aux progrès réalisés dans les domaines des télécommunications, chimie des matériaux, microélectronique et nanotechnologie. Concrètement, en chimie, la majorité des senseurs optiques existants se basent sur des principes de transduction comme la fluorescence et l'absorbance. La réponse analytique est obtenue par l'altération des propriétés optiques d'un agent de reconnaissance, immobilisé sur un support solide, par l'interaction avec l'espèce à déterminer. Malgré leur potentiel analytique élevé et la simplification du contrôle qu'ils suscitent dans divers domaines, diverses limitations connectées avec la diversité de l'offre, la stabilité, sensibilité et temps de vie de certaines unités, font que leur utilisation pratique est encore restreinte. Ce travail décrit le développement de nouveaux senseurs optiques par immobilisation d'agents chimiques et biochimiques en films sol-gel et leur application au contrôle pharmaceutique et clinique. En ce qui concerne l'obtention de supports rigides pour le développement de senseurs optiques, la technologie sol-gel est reconnue pour sa versatilité et pour sa manière de permettre, de façon simple, de manipuler la structure, la composition et la configuration physique des matériaux obtenus, grâce à un contrôle strict des conditions réactionnelles. Dans ce sens, une étude systématique du procédé sol-gel a été effectuée: des paramètres comme le type de précurseur, le catalyseur, la quantité d'eau, le temps de vieillissement et les conditions de déposition des films fins ont été évalués. Les senseurs obtenus, après optimisation et caractérisation, ont été couplés à des systèmes de flux continu basés sur le concept de la multi-commutation et de l'échantillonnage binaire. Ceci a permis la manipulation automatique et flexible des solutions, maximisant les caractéristiques de sensibilité, temps de réponse et stabilité des senseurs. Dans cette optique, quatre méthodologies ont été développées: un senseur basé sur l'immobilisation de l'orange de xylénol a été appliqué à la détermination du bismuth dans plusieurs formulations pharmaceutiques; un senseur optique obtenu par l'immobilisation du 4-(2-pyridylazo)résorcinol a été appliqué à la détermination du zinc en insulines d'action lente; ce même senseur a été utilisé pour la détermination de cuivre dans l'urine; finalement, l'immobilisation de l'anhydrase carbonique, associée à un indicateur de pH (rouge de crésol), a donné un bio-senseur optique qui a été utilisé pour la détermination de l'acétazolamide dans les formulations pharmaceutiques. Les méthodologies développées sont simples, versatiles et économiques, constituant une

alternative viable aux procédés analytiques plus complexes et onéreux utilisés en routine de laboratoires.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Atomic Absorption Spectrophotometry / Espectrofotometria de Absorção Atómica
AFM	Atomic Force Microscopy / Microscopia de Força Atómica
APTES	Aminopropiltrietoxisilano
ATR	Atenuated Total Reflectance / Reflectância Total Atenuada
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BBOB	1,4-bis(1,3-benzoxazol-2-il)benzeno
CA	Carbonic Anhydrase / Anidrase Carbónica
BTMS	Butiltrimetoxisilano
CCD	Charged-Coupled Device / Dispositivo de Carga Acoplada
CPG	Controled Pore Glass / Vidro de Poro Controlado
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamónio
DCCA	Drying Control Chemical Additives / Aditivos Químicos para Controlo da Secagem
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DO	Dissolved Oxygen / Oxigénio Dissolvido
DPO	4-(p-N,N-dimetilaminofenilmetileno)-2-fenil-5-oxazolona
EDMA	Dimetilacrilato de etilenoglicol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido etilenodiaminotetracético
ER	Erro Relativo
ETES	Etiltrietoxisilano
FIA	Flow Injection Analysis / Análise por Injecção em Fluxo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTIR	Fourier Transform Infrared Region / Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GFAAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry / Espectrofotometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica
HPLC	High-pressure Liquid Cromatography / Cromatografia Líquida de Alta Pressão
HPTS	Ácido hidroxipirenetrisulfónico
ICP-MS	Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry / Espectrometria de Massas Induzida por Acoplamento de Plasma
IV	Infravermelho
LASER	Light Amplified Stimulated Emission Radiation / Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação
LED	Light-Emitting Diode / Diodo Emissor de Luz
MIP	Molecularly Imprinted Polymer / Polímero de Impressão Molecular
MTES	Metiltrietoxisilano
MTMS	Metiltrimetoxisilano
NIR	Near Infrared Region / Região do Infravermelho Próximo

ORMOSIL	Organically Modified Silicate / Silicato Modificado Organicamente
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PAR	4-(2-piridilazo)resorcinol
PBBO	2-(4-difenil)-6-fenilbenzoxazol
PDMS	Polidimetilsiloxano
PE	Ponto de Ebulição
PEG	Polietilenoglicol
PEVA	Acetato de polietilenovinilo
PHMA	Poli(hexil-metacrilato)
PIN	Positive Intrinsic Negative ou p-n Photodiode / Fotodiodo de união p-n
PM	Peso Molecular
PMAA	Ácido polimetacrílico
PMMA	Polimetacrilato de metilo
PTES	Feniltrietoxisilano
PTFE	Politetrafluoroetileno
PTMS	Feniltrimetoxisilano
PVA	Acetato de polivinilo
PVC	Cloreto de polivinilo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RSD	Relative Standard Deviation / Desvio Padrão Relativo
SIA	Sequential Injection Analysis / Análise por Injecção Sequencial
SEM	Scanning Electron Microscopy / Microscopia Electrónica de Varrimento
SNARF-1C	Carboxilato de seminaftordamina-1
SPR	Surface Plasmon Ressonance / Ressonância Plasmónica de Superfície
TEOS	Tetraetoxisilano
TIR	Total Internal Reflection / Reflexão Interna Total
TMAOH	Hidróxido de tetrametilamónio
TMOS	Tetrametoxisilano
UV	Ultravioleta
Vis	Visível
XO	Xylenol Orange / Laranja de Xilenol

De um modo geral optou-se por utilizar as abreviaturas derivadas da designação anglo-saxónica.

INTRODUÇÃO

Os seres humanos interagem de forma consciente com o universo que os rodeia através de mecanismos sensitivos, os cinco sentidos. O desenvolvimento dos órgãos sensoriais teve por base um processo evolutivo lento, que envolveu a sua integração com o cérebro, capaz de processar e armazenar a informação. Se uma melhor consciência do meio circundante constituiu uma força motriz para o processo evolutivo, pode estabelecer-se um paralelismo com o esforço levado a cabo pelo Homem para criar dispositivos e equipamentos que o auxiliem a compreender o mundo com o qual interage e a ultrapassar as suas próprias limitações sensoriais.

O recurso à utilização de dispositivos autónomos, capazes de substituir de forma continuada os nossos sentidos ou de ministrar informação à qual estes não têm acesso – os *sensores* – abrange áreas de grande impacto na sociedade, sendo visível em quase todos os aspectos da vida quotidiana. Edifícios "inteligentes", concebidos para responder a determinados estímulos, ou automóveis equipados com sensores ópticos capazes de actuar como dispositivos de alarme, fazem já parte do dia-a-dia. Este desenvolvimento surge como resposta ao notável aumento da actividade industrial, e à consequente modificação da qualidade e do modo de vida actual.

Do ponto de vista analítico, os sensores constituem ferramentas valiosas para fazer face à crescente exigência de informação química rápida, completa e fiável, em áreas como a segurança alimentar, os estudos ambientais, a biotecnologia, a química clínica, a indústria química e farmacêutica. O controlo ambiental é um dos campos em que esta necessidade é mais evidente; a interacção Homem/meio ambiente tem muitas vezes resultados nocivos, conduzindo a uma grande preocupação com o controlo da qualidade da água, do solo e do ar, e a limites cada vez mais restritos de potenciais contaminantes. A evolução da medicina, aliada ao aumento da esperança de vida média, implica a necessidade de monitorização contínua de vários parâmetros para um controlo clínico efectivo dos pacientes, quer em situação de internamento quer em ambulatório. Na indústria, cresce a exigência dos mercados por processos mais limpos, económicos, eficientes e dotados de controle mais eficaz; o controlo de qualidade tornou-se uma preocupação universal. Na indústria farmacêutica este controlo está presente em todas as etapas do desenvolvimento e produção do medicamento, de forma a garantir a sua qualidade, eficácia e segurança. O controlo analítico acompanha todas as fases desde o desenvolvimento de um novo fármaco até ao produto acabado, passando pelas etapas

de formulação, fabrico, ensaios de estabilidade, toxicológicos, farmacológicos, ensaios clínicos, e ainda o armazenamento e a distribuição.

Como resultado destas imposições, em diferentes áreas, pensa-se que todos os dias são efectuadas em todo o mundo mais de 10^9 análises químicas, prevendo-se uma taxa de crescimento de 2 dígitos.[1] Esta enorme exigência actual de informação analítica, exaustiva e, desejavelmente, de acesso imediato, faz com que o próprio conceito de *processo analítico*, entendido como um conjunto de etapas que conduzem à obtenção da referida informação, tenha vindo a ser revisto. A tendência actual é a substituição das tradicionais medidas de *diagnóstico*, cujo objectivo é a caracterização detalhada do comportamento de um sistema, por medidas de *monitorização*, que envolvem a recolha de informação analítica de uma forma dinâmica e continuada, de modo que os resultados possam servir de indicadores em tempo real da qualidade do produto obtido. Enquanto que uma medida de diagnóstico pressupõe uma análise completa (o que implica a obtenção de uma amostra representativa, o seu transporte ao laboratório, a preparação para análise, a aplicação do método analítico e por fim a obtenção de resultados), a monitorização permite uma actuação rápida com resultados imediatos, o que se traduz numa redução substancial de custos e num aumento da qualidade e eficácia. Os sensores, como dispositivos capazes de fornecer informação analítica directa e imediata, permitindo a determinação *in situ* e em tempo real de diferentes analitos, enquadram-se totalmente dentro desta filosofia. Não só podem ser utilizados como dispositivos de rastreio, contribuindo para uma gestão mais económica e racional dos recursos laboratoriais, como podem constituir alternativas vantajosas a processos analíticos dispendiosos e morosos tradicionalmente usados, contribuindo ainda para a resolução de problemas inerentes à falta de estabilidade das amostras, ou a alterações das mesmas durante o seu transporte e/ou armazenamento. Assim, o desenvolvimento de sensores como ferramenta de simplificação dos procedimentos analíticos constitui um dos grandes desafios que se colocam à investigação em química analítica neste século.

Dependendo do fenómeno de interacção/transdução, existe uma grande variedade de sensores químicos, e a sua complexidade pode variar de forma considerável. Os sensores ópticos têm sofrido um grande desenvolvimento nos últimos anos, em parte graças à associação da transdução óptica com os avanços tecnológicos conseguidos pela indústria das telecomunicações, no campo da transmissão de informação por fibras ópticas. Este tipo de sensores apresenta princípios de operação muito simples, não necessitando de sinal de referência, sendo fácil a sua utilização em ambientes agressivos e em meios biológicos. O princípio subjacente à maioria dos sensores ópticos

[1] K. Cammann, B. Ross, A. Katerkamp, J. Reinbold, B. Gründig, R. Renneberg, *Chemical and Biochemical Sensors*, in *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag, 2002

é a alteração dos parâmetros ópticos de moléculas activas imobilizadas em suportes sólidos, devido a interacções com parâmetros químicos externos. O desenvolvimento de áreas como a química de materiais, a microelectrónica ou a nanotecnologia, aliado ao aparecimento de novos reagentes e configurações inovadoras, tem levado a um crescimento no desenvolvimento e na utilização dos sensores ópticos. No entanto, o elevado potencial analítico destes dispositivos encontra-se ainda insuficientemente explorado; a sua aplicação em procedimentos laboratoriais concretos é ainda subaproveitada, sobretudo devido a problemas relacionados com a robustez e a estabilidade. Em áreas como o controlo farmacêutico, o número de sensores ópticos disponíveis é ainda reduzido, se comparado, por exemplo, com os electroquímicos, e o recurso a formas mais recentes de imobilização de reagentes e a novos materiais é ainda limitado.

Neste contexto, a presente dissertação pretende contribuir para o conhecimento e modo de implementação de novas metodologias analíticas baseadas em sensores ópticos de matriz sol-gel, preenchendo algumas das lacunas referidas. Propõe-se assim o desenvolvimento de sensores e biosensores ópticos robustos e versáteis, de dimensões reduzidas, dotados de sensibilidade, selectividade, estabilidade e rapidez de resposta. Para tal, foram adoptadas metodologias reprodutíveis e de baixo custo para fabrico dos sensores, através da imobilização de agentes de reconhecimento químico e bioquímico em filmes obtidos pela tecnologia sol-gel. Este processo sintético tem sido crescentemente utilizado na produção de sensores ópticos, uma vez que permite obter materiais com excelentes características ópticas, inércia química, estabilidade mecânica, elevada área superficial e porosidade controlada. Permite imobilizar de forma simples e versátil moléculas sensoras que continuam a poder interagir com o meio circundante. As propriedades finais dos vidros porosos obtidos, tais como a hidrofobicidade, a porosidade, a área de superfície e a configuração física, podem ser facilmente definidas mediante o controlo das condições de síntese.

Adicionalmente, propõe-se ainda potenciar o desempenho analítico dos sensores desenvolvidos através da sua associação a procedimentos automáticos baseados em técnicas de fluxo contínuo. Os sensores ópticos permitem compactar a química subjacente à determinação analítica no sistema detector, pelo que poderão contribuir para a simplificação dos módulos analíticos. Por outro lado, as técnicas de fluxo contínuo possibilitam o processamento automático e flexível de soluções, podendo maximizar a sensibilidade, a reprodutibilidade e o tempo de resposta dos sensores a acoplar. Para demonstração e aplicação deste conceito, os sensores ópticos desenvolvidos foram inseridos em célula de fluxo construída para o efeito e acoplada a fibras ópticas, e associados a montagens de fluxo multicomutado. Os sistemas resultantes foram

optimizados e aplicados à análise de princípios activos em formulações farmacêuticas e também de parâmetros químicos relevantes no diagnóstico clínico. Desta forma, propõe-se associar as características vantajosas dos sensores com a precisão e facilidade de miniaturização dos sistemas de fluxo, de modo a obter metodologias analíticas simples, económicas, versáteis e inócuas do ponto de vista ambiental.

Com o propósito de enquadrar o conjunto de estudos realizados, a presente dissertação encontra-se organizada em 6 capítulos.

No Capítulo I abordam-se os Sensores Químicos com Transdução Óptica. São aqui apresentados os conceitos fundamentais relativos aos sensores químicos, bem como à sua classificação, após o que o capítulo se debruça em concreto sobre os sensores ópticos. São abordados aspectos relativos à sua classificação, vantagens, princípios básicos de funcionamento, configurações e instrumentação associada. São descritos os princípios de transdução óptica e aspectos inerentes à fase reactiva: tipos de interacção com o analito, elementos de reconhecimento químico ou biológico e matrizes de suporte mais usados, e ainda métodos de imobilização. Finalmente, é apresentada uma perspectiva global das aplicações analíticas mais relevantes destes sensores em diversas áreas, dando especial destaque ao controlo farmacêutico.

No Capítulo II faz-se uma síntese da Química Sol-Gel na perspectiva da utilização destes materiais como matrizes de suporte para sensores ópticos. Após uma descrição das etapas do processo sol-gel, são discutidas as variáveis que o influenciam e é descrito em particular o processo de preparação de filmes finos utilizando esta tecnologia. Seguidamente, é considerada a obtenção de sensores ópticos baseados em filmes sol-gel, sobretudo no que diz respeito aos diferentes métodos de imobilização de elementos de reconhecimento (bio)químico e às interacções entre estes e a matriz. Finalmente faz-se uma revisão das aplicações analíticas de sensores ópticos baseados em filmes sol-gel.

No Capítulo III efectua-se uma descrição geral dos procedimentos experimentais adoptados nos trabalhos experimentais propostos, justificando o enquadramento geral das etapas que permitiram o desenvolvimento e aplicação dos sensores estudados.

Nos Capítulos IV a VI são apresentados os trabalhos experimentais realizados, sob a forma de compilação de artigos científicos redigidos ao longo do período correspondente à realização desta investigação. Esta apresentação, embora possa parecer menos exaustiva no que concerne aos diferentes aspectos relativos à caracterização de cada sensor e respectiva aplicação, deve-se ao facto de na sua redacção não ter sido descurado nenhum dos aspectos estudados, considerando mesmo a obtenção de sensores com desempenho inadequado. No Capítulo IV é descrito o desenvolvimento de

sensores ópticos para determinação de espécies catiónicas em produtos farmacêuticos, nomeadamente bismuto e zinco, sendo demonstrada a versatilidade das estratégias propostas para determinação de diferentes espécies. Pelas características de selectividade e sensibilidade verificadas nos sensores desenvolvidos, foram de seguida estudadas aplicações que exigem estas características, como seja a determinação de espécies catiónicas em amostras biológicas. Assim, no Capítulo V é proposta a aplicação de sensores ópticos de matriz sol-gel à determinação directa de cobre na urina. Seguidamente, procurou-se avaliar se o procedimento implementado para desenvolvimento das membranas sensoras seria extensível à imobilização de enzimas. Para tal foi desenvolvido um biosensor óptico, cuja preparação, optimização e aplicação à análise farmacêutica é descrita no Capítulo VI.

A terminar a dissertação são apresentadas algumas considerações finais, onde se destacam os aspectos mais relevantes do trabalho desenvolvido.

Capítulo I

SENSORES QUÍMICOS COM TRANSDUÇÃO ÓPTICA

1.1
SENSORES QUÍMICOS: DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Os sensores fazem parte do quotidiano há mais de 80 anos; dispositivos como o termómetro de mercúrio, o eléctrodo de pH ou o papel indicador são já considerados como parte da rotina. Mas foi nos últimos 20 anos que os sensores se tornaram parte aceite e integrante da Química Analítica, vindo ao encontro da crescente necessidade de dados, obtidos de forma exaustiva e de acesso imediato [1]. Desde então, o desenvolvimento e aplicação destes sensores tem sido exponencial em campos diversos, e abrange hoje todas as áreas da vida quotidiana, desde a segurança dos cidadãos até à defesa militar, da química clínica à química ambiental, da indústria à robótica [2].

Um *sensor* pode ser definido como um dispositivo capaz de registar de forma directa, continua e reversível um parâmetro físico (*sensor físico*) ou a concentração de uma espécie química (*sensor químico*). Por outras palavras, um sensor baseia-se na transformação de sinais entre diferentes domínios, de um domínio ao qual não podemos aceder directamente para um que possamos medir. Um sensor deve fornecer informação de forma contínua e em tempo real, da mesma forma que o fazem os sentidos do corpo humano [2,3].

Os *sensores químicos* são dispositivos que convertem informação química (composição química quantitativa e/ou qualitativa de um sistema) num sinal analítico útil. A informação química pode ter origem numa reacção química do determinando ou numa propriedade física do sistema investigado [3,4]. O princípio geral de construção de um sensor químico é ilustrado pela Fig. 1.1. Os sensores químicos contêm duas unidades funcionais básicas: um elemento de reconhecimento (receptor) e um mecanismo de transdução. O *receptor*, onde o processo de reconhecimento molecular ou iónico tem lugar, é a parte mais importante do sensor, já que define a sua selectividade. A superfície do receptor pode ser coberta por uma camada adicional que actua como elemento protector para melhorar o tempo de vida ou os limites de aplicação, ou ainda para prevenir o acesso de substâncias interferentes. O reconhecimento do analito pode dar-se na superfície do elemento sensor ou, em alternativa, no seio do material. A informação química é transformada numa forma de energia mensurável pelo *transdutor*. Este, por sua vez, é um dispositivo capaz de converter a energia, referente à informação química sobre a amostra, num sinal analítico.

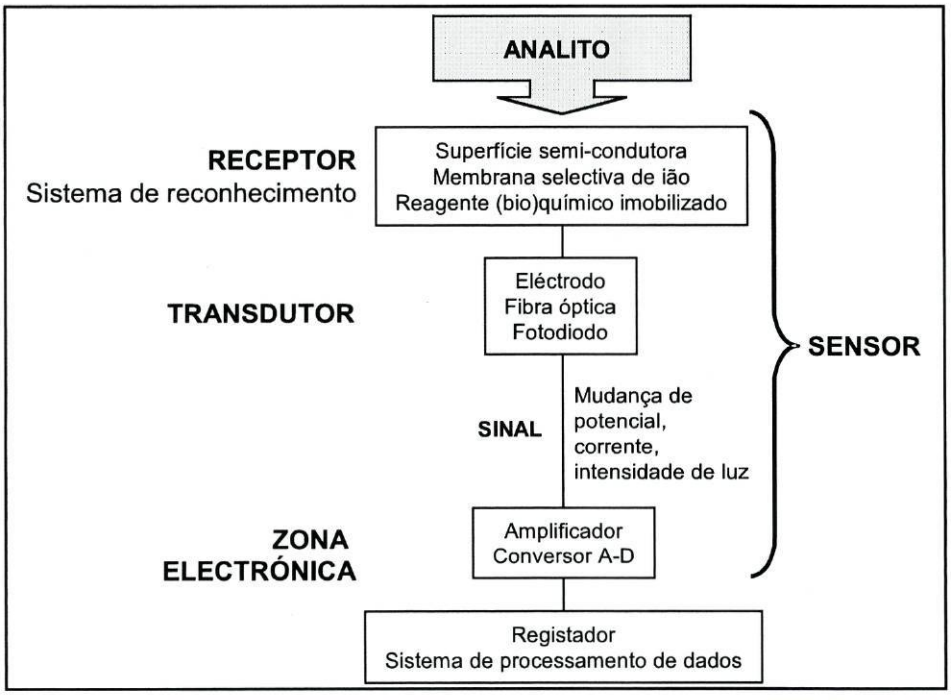


Figura 1.1. Esquema de um sensor químico típico.

O elemento receptor dos sensores químicos pode basear-se em diferentes princípios [4]:

i) físicos, em que não há uma reacção química envolvida. Exemplos típicos são os sensores que se baseiam na medida da absorvância, índice de refracção, conductividade, temperatura ou alteração de massa.

ii) químicos, em que uma reacção química na qual participa a espécie sob avaliação origina o sinal analítico.

iii) bioquímicos, em que um processo bioquímico constitui a fonte do sinal analítico. São exemplo os sensores enzimáticos ou os imunosensores, que podem ser classificados como um subgrupo dos sensores químicos – os *biosensores*.

Os sensores químicos são geralmente classificados com base no mecanismo de transdução [3,4] em 4 tipos principais:

1. *Sensores ópticos* baseiam-se na medida das propriedades ópticas do analito, ou das resultantes de interacções deste com o receptor.
2. *Sensores electroquímicos* (voltamétricos, potenciométricos e conductimétricos) baseiam-se no efeito de interacção electroquímica à superfície do eléctrodo, ou seja,

na medida do potencial ou corrente eléctrica que se gera entre diferentes eléctrodos na presença do analito. Este efeito pode ser estimulado electricamente ou resultar de uma perturbação espontânea em condições de corrente zero.

3. *Sensores piezoeléctricos* envolvem a geração de corrente eléctrica a partir de um cristal piezoeléctrico em vibração. A frequência de vibração é afectada pela massa do material adsorvido na sua superfície (efeito piezoeléctrico), que pode ser relacionada com alterações numa reacção.
4. *Sensores térmicos* baseiam-se na medida do calor (produzido ou absorvido) envolvido numa reacção química específica, na qual participa a espécie sob medida.

Os sensores são habitualmente concebidos para operar mediante condições bem definidas, para determinandos específicos, em tipos de amostras pré-estabelecidos. Em condições devidamente controladas, o sinal referente a uma espécie pode ser independente dos demais componentes da amostra, permitindo assim a sua determinação sem recurso a tratamentos prévios significativos. Por outro lado, sensores inespecíficos mas satisfatoriamente reprodutíveis podem ser utilizados em série para análise multicomponente, utilizando *software* de calibração multivariada e processamento de sinal adequado [4].

Os avanços da instrumentação, microelectrónica e informática tornam hoje possível o desenvolvimento de sensores baseados em quase todos os princípios químicos, físicos e biológicos conhecidos que são utilizados na química. Por outro lado, a utilização dos sensores químicos nas suas áreas de aplicação prossegue de forma lenta, já que exige um conhecimento multidisciplinar que abarca áreas como a electrónica, óptica, química analítica, química orgânica, bioquímica e química de materiais. Problemas inerentes à miniaturização, como robustez insuficiente e reduzida sensibilidade, colocam entraves à comercialização generalizada destes dispositivos [5]. No entanto, inúmeros sensores têm sido desenvolvidos e aplicados com sucesso para monitorização de parâmetros clínicos, ambientais e para controlo de processos industriais [6,7].

1.2
SENSORES ÓPTICOS

Os sensores ópticos e electroquímicos constituem as principais categorias de sensores utilizados para extrair informação química, sendo que a importância relativa dos sensores ópticos tem vindo a crescer nos últimos anos [8]. Estudos de mercado comprovam esta tendência, assim como o aumento de publicações científicas pertinentes a eles dedicadas. A expansão da investigação destinada ao desenvolvimento destes sensores tem beneficiado do crescente conhecimento em termos de métodos de análise ópticos de uso corrente, aliado aos avanços recentes em áreas como a química de interfaces, química de materiais, ou mesmo a nanotecnologia. Inicialmente, o uso destes sensores restringia-se à análise de espécies possuidoras de resposta colorimétrica ou de fluorescência intrínseca. No entanto, o aparecimento de novos reagentes, que alteram de forma reversível as suas propriedades ópticas ao interagir com o analito, tornou possível o alargamento do seu campo de aplicação a espécies sem propriedades ópticas mensuráveis de modo directo, como o pH, os metais pesados ou os gases. Adicionalmente, progressos recentes no campo das telecomunicações, na optoelectrónica e nos componentes semicondutores permitiram uma grande variedade de esquemas de detecção óptica que antes não eram muito atractivos para o desenvolvimento de sensores.

1.2.1. Vantagens e classificação dos sensores ópticos

Os sensores ópticos [9-11], ou *optrodos* (de "*optical electrode*"), apresentam várias vantagens em relação aos sensores electroquímicos:

i) Não requerem um sinal de referência.

ii) Não sofrem interferências eléctricas ou electromagnéticas, o que os torna os sensores de eleição para efectuar medidas sob fortes campos eléctricos ou em atmosferas explosivas.

iii) Como não requerem ligações eléctricas, não apresentam perigos no seu manuseamento, e são mais seguros para monitorização *in vivo* de parâmetros de interesse clínico.

iv) Permitem, através de fibras ópticas de baixo custo, a transmissão de sinais ópticos a grandes distâncias; a detecção remota constitui uma vantagem importante na análise de ambientes perigosos, tóxicos ou radioactivos, ou em locais de difícil acesso.
v) São facilmente miniaturizáveis, o que constitui uma vantagem em termos de concepção de dispositivos portáteis e também em situações em que se dispõe de volume reduzido de amostra, ou ainda para aplicações em química clínica.
vi) Podem transmitir mais informação em paralelo do que um sensor electroquímico; por exemplo, podem responder a mais do que um analito em simultâneo, usando vários reagentes imobilizados com resposta a diferentes comprimentos de onda.
vii) Nem sempre implicam o uso de reagentes, o que os torna ideais para serem aplicados em ambientes biológicos.

Teoricamente, os sensores ópticos são capazes de medir o pH com maior exactidão do que os eléctrodos de vidro, e são de resposta mais célere do que estes nos procedimentos que envolvem titulações. Mas também apresentam alguns inconvenientes:

i) Sofrem interferência da luz exterior, o que obriga muitas vezes à modulação do sinal.
ii) Os reagentes utilizados são susceptíveis de sofrer fotodecomposição e lixiviação, o que prejudica o tempo de vida do sensor.
iii) O número de reacções reversíveis é limitado, o que obriga à regeneração dos sensores após cada medida.
iv) Apresentam um intervalo de resposta analítico limitado (exceptuando os de transdução fluorimétrica) em comparação com os sensores electroquímicos – tipicamente 10^2, em oposição a 10^6-10^{12} para os eléctrodos selectivos a ião.

Apesar destas limitações, os sensores ópticos apresentam-se como potenciais alternativas a outros sistemas e têm sido largamente aplicados em várias áreas, que serão discutidas ao longo deste capítulo.

A variedade e complexidade de sensores ópticos existentes hoje em dia torna a sua classificação uma tarefa por vezes difícil. Existem várias classificações, segundo diferentes critérios, algumas esquematizadas na Tabela 1.1, e qualquer uma delas possível.

Tabela 1.1. Classificação dos sensores ópticos.

CRITÉRIO	TIPO DE SENSOR
Natureza da propriedade óptica medida	Sensores de absorvância
	Sensores de reflectância
	Sensores de luminescência
	Sensores de dispersão Raman
	Sensores de onda evanescente
	Sensores de índice de refracção
	Sensores de ressonância plasmónica de superfície
	Sensores interferométricos
	Sensores elipsométricos
Configuração	Sensores ópticos de radiação não-confinada
	Sensores ópticos de onda guiada
Função exercida pela fibra óptica	Sensores passivos ou extrínsecos
	Sensores activos ou intrínsecos
Tipo de interacção com o analito	Sensores reversíveis
	Sensores irreversíveis
Fase reactiva	Sensores baseados em fenómenos de superfície
	Sensores de matriz polimérica

Um critério importante de classificação é igualmente aquele que permite agrupar os sensores ópticos cujo elemento de reconhecimento é um componente biológico activo: os *biosensores ópticos* [12-16]. Os componentes bioactivos de um biosensor podem ser enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, células, organelas, microorganismos ou tecidos. Os *biosensores catalíticos* usam biocatalizadores, como as enzimas, para reconhecer, ligar e converter quimicamente o substrato. O recurso a enzimas imobilizadas permite esquemas de detecção muito difíceis de implementar com os indicadores químicos convencionais. Os *biosensores de afinidade* utilizam moléculas receptoras, como anticorpos, ácidos nucleicos e receptores hormonais, para ligar o analito de forma irreversível e não-catalítica.

O desenvolvimento deste subgrupo de sensores tem suscitado um interesse notável na última década, já que apresentam características muito vantajosas em termos de selectividade e sensibilidade. De facto, este tipo específico de sistemas tem respondido com eficácia e rapidez à crescente necessidade de técnicas analíticas rápidas, simples e

contínuas, beneficiando do desenvolvimento da biologia molecular e do aparecimento de novos materiais [7]. O crescente número de dispositivos e aplicações, em áreas como a medicina, a indústria farmacêutica, o controlo ambiental e a engenharia alimentar, faz com que sejam destacados como uma subdivisão especial dos sensores ópticos.

1.2.2. Configurações básicas dos (bio)sensores ópticos

A construção de um sensor óptico pode ser mais ou menos complexa, dependendo do tipo de sensor, da propriedade óptica a medir, do veículo de transmissão da radiação a utilizar e da aplicação que se pretende. No entanto, todos os sensores ópticos são constituídos genericamente pelos mesmos componentes básicos, ilustrados pela Fig. 1.2: uma zona de reconhecimento químico, ou receptor, um elemento transdutor que transforma a informação química em óptica, e um sistema de amplificação e processamento de sinal que permite obter os resultados finais nas unidades de interesse [10].

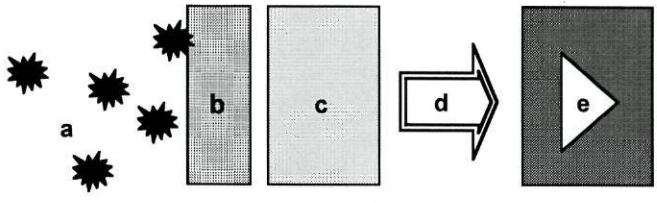


Figura 1.2. Esquema de um sensor óptico. a) Analito; b) Receptor; c)Transdutor; d) Sinal eléctrico; e) Processamento do sinal.

De uma forma geral, todos os sensores ópticos operam também segundo o mesmo princípio. A luz, proveniente de uma fonte adequada, atinge a zona onde interage com o sistema sob medida, ou com o transdutor químico. Desta interacção resulta uma modulação do sinal óptico, sendo a luz modulada em função da informação química captada pelo detector. Dependendo do tipo de sensor e dos princípios ópticos utilizados, o sinal medido pode ser absorvância, reflectância, luminescência ou outro. Quanto ao elemento químico que interage com o analito, geralmente consiste num reagente imobilizado.

A radiação electromagnética pode ser transmitida até ao sensor e posteriormente ao detector de forma guiada ou não, resultando assim em sensores ópticos de diferentes configurações. Nos *sensores ópticos de radiação não-confinada* (Fig. 1.3), a membrana sensora não está integrada fisicamente numa estrutura que circunscreva a radiação (guia de onda). Esta configuração é a mais simples de obter, bastando por exemplo colocar uma membrana sensora na célula do próprio detector, mas também mais difícil de miniaturizar ou de aplicar a medidas *in situ*; é geralmente utilizada quando se pretendem medidas rápidas e contínuas de rotina, normalmente sob a forma de escoamento controlado. Como não há necessidade de integrar a fase reactiva em fibras ópticas, os problemas cinéticos de transferência de massa são minimizados, e a regeneração e renovação da camada sensora são facilitadas.

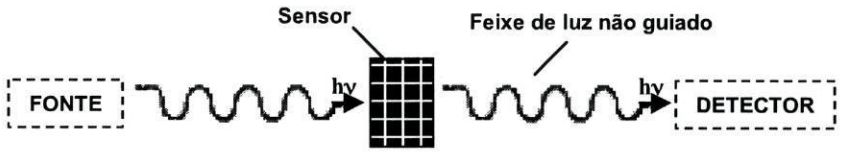


Figura 1.3. Configuração de um sensor de radiação não-confinada.

Nos *sensores ópticos de onda guiada* a radiação é transportada desde a fonte até à zona sensora, e desta ao detector, através de fibras ópticas. Permitem a obtenção de informação de forma discreta ou contínua (se integrados em células de fluxo) e apresentam vantagens em termos de versatilidade, facilidade de miniaturização e obtenção de medidas *in situ* e em tempo real. A maioria dos sensores ópticos descritos são deste tipo, baseados em diferentes tipos de integração directa entre a zona receptora e a guia de onda, diferentes tipos de guias de onda (cilíndricas ou planas) e vários modos de transdução [15,17-20].

A fibra óptica pode desempenhar diferentes funções nestes sensores. Na configuração mais simples, a guia de onda apenas transporta a radiação electromagnética desde a fonte até à amostra, e posteriormente conduz a radiação transmitida, reflectida ou emitida pela amostra até ao detector. Estes sensores designam-se *sensores passivos ou extrínsecos* e utilizam-se quer para quantificar espécies que possuem propriedades ópticas características, não necessitando de transdutor, quer para analitos que necessitam de sistema de transdução óptica (fase

reactiva contendo o reagente). No que diz respeito à interacção, estes sensores são análogos aos de radiação não confinada, uma vez que a radiação abandona temporariamente a fibra óptica para interagir com o analito. Portanto, a presença de fibras ópticas não é essencial ao princípio de funcionamento do sensor, se bem que oferece claras vantagens em termos de miniaturização e possibilidade de transmissão de informação à distância.

Nos *sensores activos* ou *intrínsecos* a fibra óptica actua simultaneamente como transdutor e veículo de transmissão da luz. A interacção da radiação com a amostra, ou com a fase reactiva, ocorre dentro da guia de onda ou na sua vizinhança (onda evanescente). As características da luz transmitida sofrem alteração como resultado da presença do analito. A fibra óptica pode constituir parte integrante do sensor, como acontece nos sensores de índice de refracção, ou servir-lhe de suporte, como nos sensores de onda evanescente [18,21].

Na Fig. 1.4 estão representadas as configurações típicas dos sensores baseados em fibras ópticas, extrínsecos e intrínsecos.

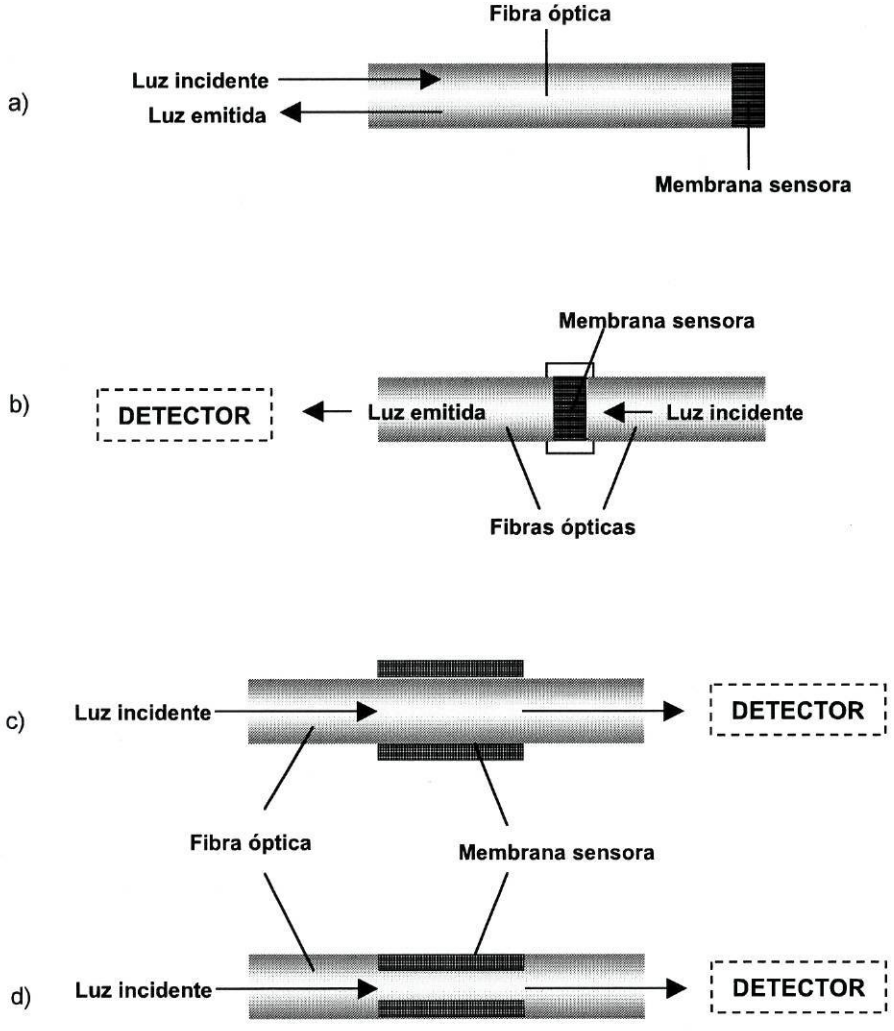


Figura 1.4. Configurações típicas de sensores ópticos de radiação confinada. Os sensores do tipo a) e b) são extrínsecos, em que a fibra serve apenas de meio de condução de luz, enquanto que nos sensores intrínsecos c) e d) a zona sensora modifica as propriedades de transmissão da fibra. A membrana sensora pode dispor-se no final da fibra (a e b) ou lateralmente (c); parte do revestimento pode ser extraído para deixar o núcleo exposto ao meio de interacção química (d).

1.2.3. Instrumentação e componentes básicos

A instrumentação básica associada aos sensores ópticos é simples e requer componentes ópticos e electrónicos convencionais [10]. Os dispositivos construídos podem incluir ou não fibras ópticas, e a sua complexidade varia consoante os objectivos propostos. O facto de serem geralmente constituídos por componentes isolados (módulos), seleccionados individualmente, oferece a vantagem de se poderem projectar dispositivos com tamanho, portabilidade e compatibilidade adequadas a cada caso concreto. Por exemplo, os sensores de quimiluminescência não necessitam de fonte de radiação, já que se baseiam na emissão de luz. A Figura 1.5 mostra os elementos tipicamente associados a um sensor óptico.

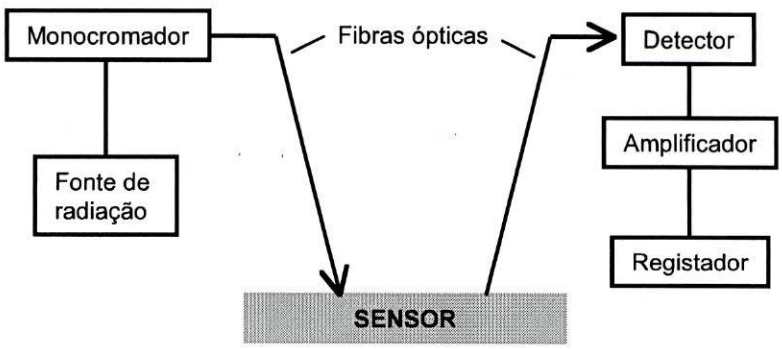


Figura 1.5. Diagrama da instrumentação habitualmente associada a um sensor óptico.

Estes componentes podem estar sujeitos a oscilações durante o seu funcionamento; por exemplo, a intensidade da fonte de luz pode variar devido a envelhecimento ou a flutuações na fonte de alimentação. O efeito destas variações pode ser eliminado utilizando uma referência interna, o que envolve a monitorização de radiação que não se altere durante o processo de medida. Muitas vezes, para a medida da radiação sobre superfícies sólidas recorre-se apenas a ligeiras modificações dos espectrofotómetros convencionais, em que simplesmente se adapta o compartimento da amostra e se alinha o sistema de fibras ópticas com o sistema óptico do instrumento. No caso dos sistemas de fluxo, por si só muito versáteis, geralmente a única optimização exigida é a da configuração da célula de fluxo, que deve permitir uma interacção máxima entre a radiação e a superfície sensora.

Os *sensores ópticos integrados* incluem as etapas de amplificação e processamento do sinal no elemento sensor. Apresentam um tamanho muito reduzido e os seus componentes básicos são construídos utilizando técnicas associadas à microelectrónica [22,23].

FONTES DE RADIAÇÃO

A fonte de luz deve fornecer radiação intensa e estável. Vários tipos de fontes disponíveis no mercado têm sido utilizadas em sensores ópticos, tais como: lâmpadas incandescentes, diodos emissores de luz (LEDs, *light-emitting diodes*) e fontes de luz coerente *laser*, convencionais ou de diodo semi-condutor.

As *lâmpadas* são fontes de baixa intensidade e emitem luz branca, pelo que requerem o uso de selectores de comprimento de onda. As fontes incandescentes, como as lâmpadas de tungsténio e de quartzo-halogéneo, emitem num espectro bastante alargado de radiação óptica, e são usadas como fontes de luz ultravioleta e visível. De uma forma geral, as lâmpadas são dispositivos de difícil miniaturização, e cujo acoplamento a fibras ópticas exige componentes ópticos especiais, pelo que a sua aplicação se restringe aos sensores ópticos de radiação não-confinada convencionais.

Os *LASERs* (de *Light Amplified Stimulated Emission Radiation*) são fontes úteis para a obtenção de radiação muito intensa e coerente, e são geralmente utilizados em sistemas sensores remotos [24,25]. Apesar de facilmente acopláveis a fibras ópticas, apresentam um custo elevado e não solucionam o problema da miniaturização das lâmpadas convencionais. Os *lasers* de diodo, de baixo custo e dimensões reduzidas, constituem uma excepção. A par com os LEDs, estes *lasers* constituem fontes miniaturizadas de radiação intensa monocromática. Irradiam um feixe coerente de luz com intervalo espectral muito estreito (5-10 nm) e são excelentes para transmissão de luz em fibras de elevado comprimento.

A grande maioria dos sensores ópticos recorre ao uso de *diodos emissores de* luz, os LEDs, como fontes de radiação [26]. Estes dispositivos estão disponíveis numa grande variedade de geometrias, formas e tamanhos, cobrindo o intervalo UV-Vis (aproximadamente 360-900 nm), e têm custo reduzido, já que se fabricam em grande escala. Operam a baixa voltagem, com tempo de vida longo e emissão estável. Em termos de eficiência de conversão de energia eléctrica em luminosa, são ainda suplantados pelas lâmpadas fluorescentes e de halogéneo; a sua grande virtude é a eficiência de produção de luz num intervalo espectral muito estreito (40-50 nm), cujo comprimento de onda depende da composição do semi-condutor, e as reduzidas

dimensões, que os convertem nas fontes mais adequadas para a instrumentação portátil. Os LEDs UV de alta potência surgem, em áreas como o diagnóstico biomédico e biológico, como sérias alternativas aos *lasers* (mais caros) ou às lâmpadas [27]. LEDs pulsados, a elevada frequência e de forma reprodutível, permitem medidas de tempos de vida de fluorescência/fosforescência. Os LEDs são ainda verdadeiros transdutores bidireccionais, podendo funcionar simultaneamente como fonte de luz e detector [28]. Apesar de serem bastante mais eficientes como emissores do que como fotodiodos, respondendo apenas a comprimentos de onda abaixo da sua emissão normal, consegue-se grande sensibilidade para medidas de luz muito intensa.

Na Tabela 1.2 estão resumidas as características mais importantes de algumas fontes de radiação usadas na construção de sensores ópticos.

Tabela 1.2. Fontes de radiação utilizadas na instrumentação de sensores ópticos [11].

TIPO DE FONTE	CARACTERÍSTICAS	APLICAÇÃO
Lâmpada de tungsténio-halogéneo	Intensidade moderada Emite na região do visível Baixo custo / baixo consumo Longa duração	Absorvância Reflectância
Lâmpada de deutério	Emite no UV Intensidade reduzida	Absorvância Reflectância
Lâmpada de arco de mercúrio	Espectro de linhas (UV-Vis) Intensidade elevada	Fluorescência
Lâmpada de arco de xenon	Espectro amplo Intensidade elevada Tempo de vida curto	Fluorescência
LED	Espectro estreito Tamanho reduzido Intensidade intermédia Baixo custo	Absorvância Reflectância
Laser	Espectro muito estreito Alta intensidade e estabilidade Custo elevado	Fluorescência Raman

SELECTORES DE COMPRIMENTO DE ONDA E ACOPLADORES ÓPTICOS

O sinal analítico gerado nos sensores ópticos deve ser distinguido do espectro contínuo emitido pela fonte de radiação, ou seja, antes que a radiação atinja o detector os comprimentos de onda que não o da espécie de interesse devem ser excluídos. Para tal, faz-se a resolução óptica, por meio de *filtros* (de absorção e de interferência) e *monocromadores* de rede. Enquanto que os filtros ópticos atenuam a luz de forma significativa, podendo reduzir a sensibilidade do sistema óptico, os monocromadores são bastante eficientes e podem ser adaptados a diferentes comprimentos de onda.

Os *acopladores ópticos* são necessários para focar o feixe de luz a partir da fonte para a fibra óptica, e também para dirigir a radiação da fibra para o detector. É importante garantir que a máxima intensidade de radiação penetra na guia de onda, e que a intensidade que chega ao detector procedente da fase reactiva seja também máxima. O acoplamento da luz entre a fonte e a fibra óptica pode ser bastante complexo: enquanto que um *laser* emite um feixe coerente com um diâmetro quase igual ao da fibra, o que torna o acoplamento bastante simples, os LEDs e as lâmpadas incandescentes irradiam feixes divergentes que requerem o uso de lentes de focagem. Já o acoplamento da fibra com o fotodetector é mais fácil, uma vez que os detectores têm geralmente áreas de superfície activa bastante grandes e ângulos de aceitação elevados.

FOTODETECTORES

Os fotodetectores actualmente utilizados no desenvolvimento de sensores ópticos variam desde pequenos fotodiodos PIN até matrizes de fotodiodos, de ganho mais elevado, e tubos fotomultiplicadores; também o seu tamanho e custo pode variar, desde os fotodiodos de poucos mm^3 e com custos associados de poucos euros, até aos fotomultiplicadores de grandes dimensões, com sistemas de arrefecimento, e que podem custar alguns milhares de euros. Basicamente, o sistema de detecção consiste num dispositivo contador de fotões, onde os sinais ópticos são convertidos em sinais eléctricos que podem depois ser facilmente amplificados por meios electrónicos. O fotodetector deve possuir um máximo de sensibilidade no comprimento de onda a que se efectua a medida, deve gerar o mínimo de ruído e deve responder com rapidez a variações de intensidade da luz incidente [29].

Os detectores podem ser divididos em dois grupos: fotoemissores e fotocondutores. Os *detectores fotoemissores* baseiam-se no efeito fotoeléctrico, ou seja, na interacção

da radiação electromagnética com uma superfície que emite electrões. Os mais comuns são os tubos fotomultiplicadores e os fototubos. Apresentam relação sinal/ruído favorável, resposta rápida e elevada sensibilidade, mas o seu custo elevado e as suas dimensões consideráveis fazem com que não sejam muito aplicados na construção de sensores miniaturizados, sendo mais usados em espectrofotómetros UV/Vis convencionais.

Nos *detectores fotocondutores* a absorção de um fotão num elemento semi-condutor promove electrões a estados energéticos em que se conduz electricidade [30,31]. Este grupo inclui os fotodiodos PIN de polarização inversa, que são uma série de diodos *p-n* inversamente polarizados, que produzem uma corrente eléctrica quando radiação de um determinado comprimento de onda incide sobre eles. Este tipo de dispositivos, pelas suas dimensões reduzidas, elevada estabilidade e resposta rápida num intervalo amplo de comprimentos de onda, assume uma grande importância na construção de equipamentos portáteis. Os fotodiodos mais comuns são os de silício (300-1000 nm), GaAsP (300-600) e InGaAs (800-1100 nm).

Os detectores baseados em séries lineares de diodos (*diode arrays*) ou em séries de diodos numa matriz bidimensional (CCD, *dispositivos de carga acoplada/charge-coupled devices*) permitem a detecção múltipla e simultânea em vários comprimentos de onda [32,33]. As cargas livres geradas pelos fotões absorvidos por cada diodo armazenam-se numa zona determinada de cada um. Para um dado tempo de integração aplica-se um potencial de forma sincronizada, que provoca uma transferência de carga sequencial, lida no final da série.

FIBRAS ÓPTICAS

Uma fibra óptica é basicamente uma guia capaz de conduzir a radiação electromagnética a grandes distâncias, de forma eficiente. As guias de onda foram inicialmente desenvolvidas pela indústria de telecomunicações e são hoje em dia largamente aplicadas no desenvolvimento de sensores ópticos, graças às características únicas que apresentam. Além de terem dimensões reduzidas, são flexíveis, imunes a interferências eléctricas e capazes de conduzir a luz a distâncias consideráveis sem perdas, sendo ideais para aplicações clínicas, controlo de processos, monitorização ambiental e análises remotas em geral.

As guias de onda para aplicações analíticas podem ser fibras cilíndricas ou estruturas planas, com diâmetros e geometrias variadas, apropriadas a diferentes técnicas espectroscópicas, assim como a diferentes matrizes e analitos. A estrutura de

uma fibra óptica em corte longitudinal encontra-se esquematizada na Figura 1.6. É constituída por dois cilíndricos concêntricos de índice de refracção diferente: o cilindro interior denomina-se *núcleo*, e o exterior *revestimento*. A fibra pode ainda ser recoberta por uma camada protectora, que lhe confere protecção térmica e mecânica.

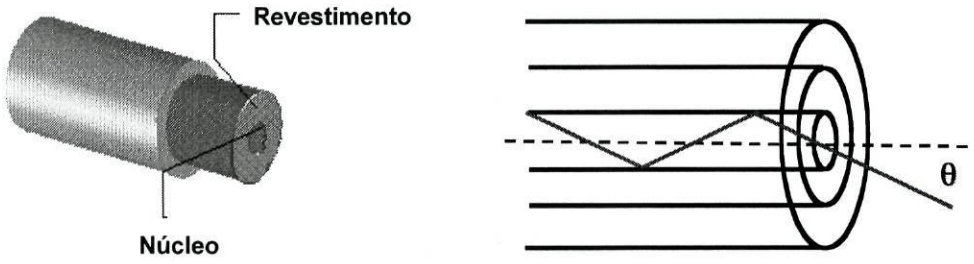


Figura 1.6. Estrutura de uma fibra óptica (guia de onda cilíndrica).

As guias de onda planas (Fig. 1.7) são estruturas formadas por um ou mais filmes poliméricos, com alguns μm de espessura e índices de refracção adequados, depositados num substrato de suporte. Para acoplar a luz a estas guias são geralmente utilizados prismas com elevado índice de refracção.

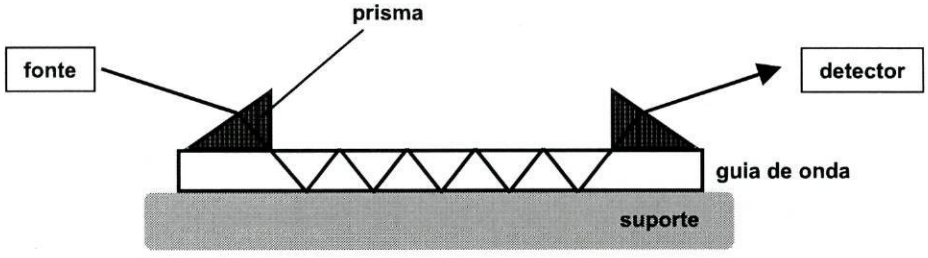


Figura 1.7. Guia de onda plana.

As fibras ópticas transmitem a luz com base no princípio da reflexão interna total (TIR) [10,11]. Este fenómeno ocorre quando a radiação que percorre um material de índice de refracção n_1 elevado (núcleo) atinge a interface de um material de menor índice de refracção, n_2 (revestimento); parte da radiação é reflectida e a outra é refractada. A relação entre o ângulo de incidência, θ_i, e o ângulo de refracção θ_r é dada pela Lei de Snell:

$$n_1 \text{ sen } \theta_i = n_2 \text{ sen } \theta_r$$

Tendo em conta que *sen* $n_1 > n_2$, deduz-se a que ângulo de incidência não há refracção, ou seja, a que ângulo se produz apenas reflexão:

$$\text{sen } \theta_i > n_1 / n_2$$

Para evitar a refracção na interface dos dois meios, o ângulo de incidência tem que ser superior a um determinado valor, designado por ângulo crítico (θ_C):

$$\theta_C > \text{arc sen } n_1 / n_2$$

Nestas condições a radiação fica confinada no núcleo, propagando-se no seu interior por reflexões sucessivas. Por outro lado, os feixes que incidem na interface com ângulos menores que o ângulo crítico sofrem refracção, e portanto não se propagam através da fibra.

Além do ângulo crítico, as fibras são caracterizadas pelo ângulo limite de entrada da radiação:

$$\theta_{Lim} < \text{arc } [\text{sen } (n_1 / n_0) \cos \theta_C]$$

em que θ_{Lim} é o ângulo limite de aceitação e n_0 é o índice de refracção do meio exterior à fibra (geralmente o ar). Portanto, toda a radiação que penetra na fibra com um ângulo inferior a θ_{Lim} será transmitida, já que não se produz refracção.

Quando a luz sofre reflexão interna total, a intensidade de luz reflectida não cai abruptamente para zero na interface núcleo-revestimento. Em vez disso, a intensidade do campo electromagnético decai exponencialmente em função da distância à interface, estendendo-se portanto para o meio de índice de refracção mais baixo. Este fenómeno é conhecido como *onda evanescente* (Figura 1.8), e o campo electromagnético gerado é o *campo evanescente* [10,11,18,19]. A sua profundidade de penetração, d_p, é definida pela distância da interface em que decai até uma fracção 1/e do seu valor na interface:

$$d_p = \lambda / 2\pi \, [(n_d^2 \text{sen}^2\theta - n_r^2)]^{1/2}$$

sendo λ o comprimento de onda da luz que se propaga na guia de onda, n_d e n_r os índices de refracção do núcleo e do meio circundante, respectivamente, e θ o ângulo do modo guiado relativamente à interface guia/meio circundante. O ângulo de incidência θ_i influencia a profundidade de penetração. Os valores de d_p variam entre 50-200 nm,

aumentando com a diminuição de θ_i; d_p atinge o seu máximo quando θ_i está muito próximo do ângulo crítico.

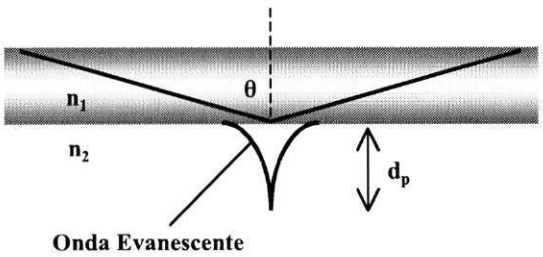


Figura 1.8. Onda evanescente.

As fibras ópticas são caracterizadas pelo seu comportamento (atenuação, dispersão), pelas suas propriedades físicas (índice de refracção) e ópticas (intervalo de comprimentos de onda de propagação) [10,11]. A *abertura numérica* é um parâmetro que indica a quantidade de energia electromagnética que a fibra consegue captar. É definida pelo ângulo limite de aceitação, θ_{Lim}, que por sua vez depende das diferenças de índice de refracção e de espessura entre o núcleo e o revestimento. Aumentando a diferença, aumenta também o ângulo de aceitação, pelo que a radiação que se pode reflectir na guia de onda com ângulos de reflexão diferentes aumenta. Portanto, existem diferentes modos de transmissão que se propagam pela fibra. Desta forma, podemos distinguir as *fibras multimodo*, em que a luz se propaga por mais do que um modo de transmissão, das *fibras monomodo*, em que só há uma forma de transmissão. Estas últimas são utilizadas na construção de sensores interferométricos e de índice de refracção. De um modo geral, as fibras multimodo são mais utilizadas no desenvolvimento de sensores, uma vez que permitem uma boa transmissão de luz a distâncias médias e curtas, e são compatíveis com numerosos componentes ópticos comerciais.

A *atenuação* é outro parâmetro importante na caracterização das fibras ópticas. A radiação que é guiada pela fibra sofre redução de potência como consequência de processos inerentes ao próprio material da fibra, ou por processos extrínsecos relacionados com impurezas, defeitos de geometria ou curvaturas; a perda total de potência é representada pelo coeficiente de atenuação. Quando um impulso luminoso é transmitido através de uma fibra óptica sofre ainda *dispersão temporal*, devido a

diferentes longitudes das trajectórias de cada um dos raios que se propagam pela fibra (dispersão intermodal), e à diferente velocidade com que avança cada um dos comprimentos de onda que compõem cada raio (dispersão intramodal). A dispersão temporal produz separação entre impulsos sucessivos e limita a velocidade máxima através da fibra. Quanto mais monocromática for a radiação, menor será a dispersão intramodal.

Existe uma grande variedade de fibras ópticas, com diferentes estruturas e geometrias (simples, duplas ou múltiplas), acopladas a lentes ou com extremidades recortadas, e geralmente fabricadas em plástico, vidro, sílica ou quartzo. O material mais utilizado no fabrico de fibras ópticas para aplicações no intervalo UV-Vis-NIR é o vidro de SiO_2, enquanto que os vidros de fluoretos de Ca, Sr, Ba ou Pb são utilizados na zona do NIR. As guias de plástico, como policarbonato, poliestireno e polimetacrilato, só transmitem na zona do visível, e são bastante usadas em aplicações médicas. O diâmetro das fibras ópticas mais frequentemente utilizadas varia entre 100 e 600 μm.

Componentes Ópticos Adicionais

Além dos componentes principais descritos, os sistemas ópticos podem incluir outros elementos [10]. Os amplificadores *lock-in* são dispositivos úteis quando se utilizam sensores de modo aberto à luz ambiente; para uma dada frequência de interesse, convertem a corrente alterna gerada no transdutor num sinal contínuo facilmente mensurável. Para tornar a radiação descontínua, pode fazer-se com que esta atravesse um modulador mecânico, que consiste basicamente num disco rotatório com fendas dispostas a intervalos regulares. Outros elementos, como lentes, espelhos e polarizadores, podem ser usados para focar, conduzir e polarizar o feixe de radiação; apesar de serem, em geral, bastante económicos, aumentam a complexidade do sistema e exigem um alinhamento muito cuidadoso. Assim, a tendência actual é o desenvolvimento de sistemas que contenham o mínimo possível destes componentes. Por exemplo, a utilização de fibras ópticas reduz, de forma significativa, a necessidade de espelhos, uma vez que a flexibilidade que as caracteriza permite a condução espacial da radiação. As fontes de luz e os detectores podem ser facilmente acoplados às extremidades das fibras, eliminando a necessidade de lentes. Além disso, os sistemas ópticos integrados oferecem o potencial de reduzir ainda mais o número de componentes ópticos necessários.

1.2.4. Princípios da transdução óptica

Os sensores ópticos monitorizam espécies químicas através da interacção destas com a luz. O conceito básico da recolha de informação óptica por um sensor está esquematizado na Fig. 1.9. A radiação electromagnética, proveniente de uma fonte adequada, interage com o sistema a analisar. O elemento receptor (mecanismo de transdução primário) extrai informação química do ambiente circundante, e uma série de outros transdutores secundários ajudam a transformar o sinal do receptor em sinais eléctricos facilmente processáveis. O sinal eléctrico gerado pelo transdutor é geralmente amplificado por dispositivos próximos a ele, ou mesmo integrados.

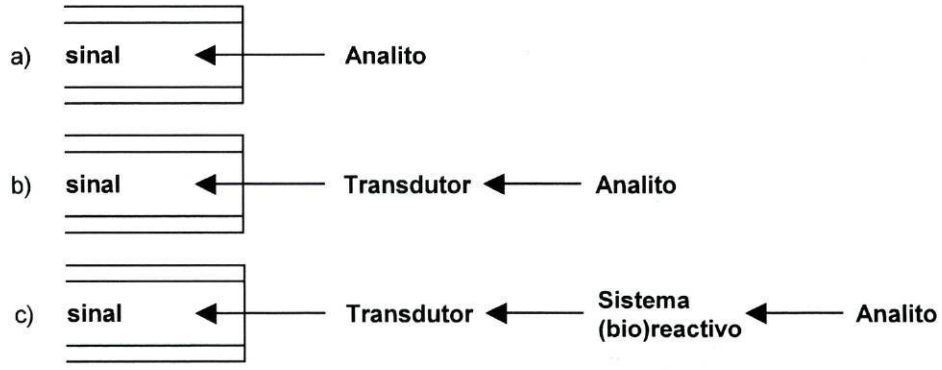


Figura 1.9. Recolha de informação óptica pelo sensor. a) *Sensor de primeira geração*: a informação óptica é obtida directamente do analito. b) *Sensor de segunda geração*: um elemento transdutor extrai informação óptica do analito. c) *Sensor de terceira geração*: um sistema (bio)reactivo ajuda a converter um analito imensurável num produto mensurável. Logicamente, o tempo de resposta aumenta com a complexidade do sensor.

Dependendo do dispositivo de medida em particular, ou dos princípios ópticos utilizados, o sinal óptico medido pode traduzir-se em absorvância, reflectância, luminescência ou dispersão [34-36]. A utilização destes sensores cobre assim diferentes regiões do espectro (UV, Visível, IR, NIR), e tira partido não só da medida da intensidade da radiação electromagnética, como também de outras grandezas físicas relacionadas, como índice de refracção, variações na direcção da luz, difracção e polarização. A detecção a vários comprimentos de onda e a análise multicomponente proporcionam formas adicionais, cada vez mais utilizadas, de quantificar componentes em amostras complexas.

SENSORES DE ABSORVÂNCIA

A absorção de radiação pelas moléculas ou átomos origina transições nos estados energéticos electrónicos, e constitui a base de funcionamento destes sensores. As radiações ultravioleta (190-400 nm) e visível (400-800 nm) induzem excitação electrónica, a radiação infravermelha (1-100 μm) promove excitação vibracional, enquanto que a radiação por microondas (100-1000 μm) origina transições rotacionais. Após interagir com as moléculas, um feixe de luz de intensidade inicial I_0 é transmitido pela amostra com uma intensidade reduzida, I. A relação entre estas duas intensidades denomina-se *transmitância*, e depende dos grupos cromóforos presentes, da sua concentração e do comprimento de onda. A redução da intensidade da luz é determinada pelo número de espécies absorventes presentes no percurso óptico, e pode então ser relacionada com a concentração das mesmas pela equação de Lambert-Beer:

$$A = \log I_0/I = \varepsilon.b.C$$

em que A é a absorvância, b é o comprimento do percurso óptico, C representa a concentração da espécie absorvente e ε é a absortividade molar, que é característica de cada substância a um determinado comprimento de onda.

Pela sua simplicidade, a medida da absorvância constitui um dos procedimentos ópticos mais utilizados na química analítica tradicional, e foi também o primeiro a ser aplicado no desenvolvimento de sensores ópticos, sendo inúmeros os sensores deste tipo descritos na literatura [37-42]. Apesar de ser a técnica mais indicada quando o analito apresenta bandas de absorção intrínsecas, exibe geralmente intervalos dinâmicos de trabalho curtos e não é muito selectiva, ou seja, sofre frequentemente interferências inespecíficas da matriz da amostra. Além disso, perde em sensibilidade e selectividade para outras técnicas como a fluorescência ou a luminescência.

SENSORES DE REFLECTÂNCIA

Quando um feixe de radiação incide sobre uma superfície sólida, plana e opaca, tem lugar o fenómeno de reflexão, que pode ser especular ou difusa. No caso da reflectância especular, ou regular, que é produzida em superfícies polidas, a radiação não penetra na amostra, e os ângulos de incidência e reflexão são iguais; este tipo de reflectância não se utiliza em sensores químicos. A reflexão difusa produz-se em superfícies rugosas, formadas por partículas empacotadas de tamanho igual ou superior a duas vezes o

comprimento de onda da radiação incidente. A radiação penetra no interior da amostra, e dá-se absorção, refracção, reflexão e difracção, antes de regressar à superfície.

De forma análoga à absorvância, a reflectância difusa é dependente da composição da amostra. Vários modelos foram propostos para expressar esta relação, mas o mais usado é a equação de Kubelka-Munk:

$$F(R) = (1-R)^2/2R = \varepsilon C/S$$

em que R é a reflectância, C é a concentração do analito, ε é o coeficiente de absortividade molar e S o coeficiente de dispersão. F(R) é conhecido como a função Kubelka-Munk. Esta técnica utiliza-se geralmente em combinação com fibras ópticas e a sua reprodutibilidade depende basicamente do fabrico do material reflector. Envolve instrumentação mais complexa do que os sensores de absorvância, mas possui um intervalo dinâmico mais alargado [43-46].

SENSORES DE LUMINESCÊNCIA

A absorção quantificada de energia promove átomos e moléculas a estados energéticos mais altos. No entanto, a espécie excitada tem um tempo de vida curto e rapidamente regressa ao estado fundamental, libertando a energia em excesso sob a forma de radiação característica (emissão luminescente). Se a energia de excitação procede de uma reacção química, o fenómeno designa-se *quimiluminescência*; se é proveniente de uma fonte de energia radiante, chama-se *fluorescência* ou *fosforescência*. A fluorescência é um processo extremamente rápido, que ocorre 1-100 ns após a excitação, enquanto que a fosforescência tem um tempo de vida maior (1-1000 μs) e persiste após remoção da fonte de excitação. Nos dois casos, a radiação emitida é de frequência diferente da radiação excitante, e a sua intensidade, I_L, depende da intensidade da excitante, I_0, e da concentração da espécie luminescente, C. Assim, para determinações directas, em que o luminóforo é o próprio analito, a intensidade de luminescência pode ser expressa pela seguinte relação:

$$I_L = k.I_0.\phi.\varepsilon.b.C$$

em que k é a fracção de emissão que pode ser medida, ϕ é o rendimento quântico da luminescência (n.º de moléculas que emitem/n.º de moléculas excitadas), ε é o coeficiente de absortividade molar e b o percurso óptico.

Outra possibilidade é a quantificação indirecta de espécies presentes no meio (por exemplo oxigénio) que podem atenuar (*quenching*) a fluorescência de um reagente luminescente. O tempo de vida médio da espécie activada diminui e a intensidade de

luminescência é reduzida. Neste caso, a intensidade de luminescência, I_L, relaciona-se com a concentração da espécie desactivadora, C_Q, através da equação de Stern-Volmer:

$$I^0 / I_L = 1 + K_{SV} C_Q$$

em que I^0 é a intensidade de luminescência na ausência do atenuador, e K_{SV} a constante de Stern-Volmer.

A luminescência pode quantificar-se também com base na medida do tempo de vida do luminóforo. Para tal, a amostra é excitada através de um pulso breve de radiação e é medido o decaimento da intensidade de fluorescência em função do tempo. O cálculo do tempo de vida segue critérios estatísticos, determinando-se o tempo que a fluorescência demora a cair 63%; o valor obtido é o tempo de vida do luminóforo. Este tipo de quantificação é útil para determinandos que modificam o tempo de vida do reagente luminescente por interacção com este no estado excitado (desactivação dinâmica). A equação de Stern-Volmer modificada demonstra que existe uma relação linear entre a concentração do desactivador, C_Q, e a relação τ/τ_0, em que τ e τ_0 são os tempos de vida do luminóforo na ausência e na presença do desactivador, respectivamente:

$$\tau/\tau_0 = 1 + K_{SV} C_Q$$

Outra forma de luminescência que pode ser explorada no desenvolvimento de sensores ópticos é a que envolve a transferência energética extra molecular para uma segunda espécie, seguida de luminescência por parte desta última [47]. A intensidade de luminescência da segunda espécie, S, é proporcional a $K_{et}.[L^*].[S]$, em que K_{et} é a taxa de transferência de energia entre as duas espécies, e depende da separação entre a espécie dadora, L*, e a receptora, S. Como a intensidade depende da concentração de L*, os factores que determinam a intensidade da luminescência detectada estão também directamente envolvidos na intensidade de luminescência da segunda espécie S. A principal vantagem desta técnica é o facto de permitir a distinção entre a porção da espécie S que se encontra na proximidade de L* da porção S dissociada, podendo portanto ser usada para determinar a quantidade de S em equilíbrio competitivo, por exemplo num imunoensaio.

Os sensores baseados em luminescência [48-51] são muito mais selectivos que os sensores baseados em absorvância, uma vez que são biparamétricos, ou seja, baseiam-se em dois comprimentos de onda (o de excitação e o de emissão) para a diferenciação. São também extremamente sensíveis: um só fotão é por vezes suficiente para quantificar a emissão. No entanto, os sensores baseados na medida da intensidade de fluorescência apresentam algumas limitações em termos de estabilidade e reprodutibilidade. São afectados por fenómenos de fotodecomposição ou lixiviação do reagente e sofrem variações de sinal devido a flutuações da fonte ou do detector, exigindo re-calibração frequente. Os sensores baseados na medida do tempo de vida de

fluorescência requerem geralmente instrumentação mais complexa, mas permitem ultrapassar a maioria das desvantagens dos sensores de intensidade de fluorescência, sendo ainda mais selectivos, já que é acrescentado um terceiro parâmetro adicional [52-55]. A medida da anisotropia de fluorescência pode também ser utilizada, permitindo determinar mudanças estruturais ou reorientações, nomeadamente para monitorizar processos que envolvem difusão rotacional [56,57]. Os sensores baseados em fosforescência apresentam características ainda mais vantajosas em termos de selectividade e sensibilidade, já que este fenómeno, de tempo de vida mais alargado, ocorre a comprimentos de onda bastante afastados do de excitação [58,59]. Quanto aos sensores quimiluminescentes, baseiam-se em instrumentação muito simples, já que não requerem fontes de radiação, exigindo apenas um excesso de reagente imobilizado para se produzir a reacção [60-62].

SENSORES DE DISPERSÃO RAMAN

A espectroscopia de Raman é uma técnica de emissão em que a radiação dispersada pelas moléculas apresenta um comprimento de onda diferente da radiação absorvida. Quando uma molécula absorve um fotão de energia $E = h\nu$, passa a um estado excitado denominado virtual (não-quantizado); se regressa ao estado fundamental emitindo a mesma energia absorvida, E, origina-se a dispersão Rayleigh, mas se emite uma energia diferente, correspondente a $E \pm \Delta E$ (emissão Stokes e anti-Stokes), origina-se a dispersão Raman.

Apesar de a radiação Raman ser bastante fraca, o fotão disperso apresenta uma energia diferente dos fotões incidentes, o que confere a esta técnica vantagens sobre a absorvância similares às da luminescência. A sua principal vantagem é permitir a análise com base na "impressão digital" vibracional do analito a comprimentos de onda na região do visível, podendo assim beneficiar da associação com fibras ópticas. Ao contrário do espectro de IV, que representa a absorvância de radiação que não chega ao detector, o espectro Raman mostra a dispersão ou emissão detectada. Nas duas técnicas, quase todas as vibrações moleculares originam um sinal, mas com bandas de forma e intensidade relativa bastante diferentes. De uma forma geral, os grupos simétricos e não-polares detectam-se melhor no espectro Raman, enquanto que os assimétricos e polares se observam melhor no IV. A espectroscopia Raman constitui uma técnica idónea para a análise de espécies biológicas em meios aquosos.

A principal desvantagem desta técnica é a sua baixa sensibilidade, já que a intensidade da emissão Raman é bastante fraca, o que obriga ao uso de fontes de luz de

alta potência, como os *lasers*, e equipamento sofisticado. A fluorescência (4 a 6 vezes mais intensa que a dispersão Raman), quer seja emitida pelo analito, quer pelos componentes da fibra óptica, pode assim dissimular o sinal Raman; este efeito pode no entanto reduzir-se de forma significativa utilizando fibras ópticas diferentes para fazer incidir a luz de excitação e para recolher o sinal. Estas limitações podem, contudo, ser bastante melhoradas usando a espectroscopia de Raman com transformada de Fourier, que recorre a *laser* de 1.064 μm como fonte de luz, e reduz substancialmente o efeito da fluorescência. Desta forma, os sensores baseados nesta técnica têm-se tornado mais vantajosos, sendo aplicados com sucesso, por exemplo, à multi-determinação em linha de compostos orgânicos em bioprocessos industriais [63].

SENSORES DE ONDA EVANESCENTE

Estes sensores baseiam-se no fenómeno denominado *onda evanescente*, que se produz na interface óptica entre o núcleo e o revestimento de uma guia de onda (fibra óptica). Uma guia de onda caracteriza-se por reflexão interna total da luz transmitida pelo núcleo da fibra; no entanto, a radiação remanescente penetra dentro do revestimento a uma determinada profundidade, que depende do comprimento de onda da radiação transmitida, dos índices de refracção dos dois meios e do ângulo de incidência. A intensidade do campo evanescente diminui exponencialmente com a distância em relação à interface. Os sensores de onda evanescente utilizam a radiação do campo evanescente para interagir opticamente com o material reactivo imobilizado sobre o núcleo da guia de onda [18]. Esta radiação pode ser absorvida, reflectida ou dispersada pelo reagente, ou mesmo induzir a sua fluorescência se se tratar de um composto luminescente. Posteriormente, a variação produzida na transmissão da radiação através da fibra é detectada. Os sensores de absorvância baseados na onda evanescente têm por base a atenuação da luz no campo evanescente, de acordo com a lei de Lambert-Beer [64,65]. De uma forma geral, são pouco sensíveis devido à baixa intensidade da luz no campo evanescente, mas as suas características podem ser melhoradas através do aumento do comprimento e da espessura da guia de onda, ou pela utilização de guias cilíndricas [66], capilares [67] ou planas [68,69]. Os sensores de onda evanescente baseados em medidas de fluorescência são mais complexos, já que implicam dois comprimentos de onda diferentes (excitação e emissão), mas têm sido aplicados com êxito na detecção de níveis vestigiais de várias substâncias químicas e biológicas.

Sensores de Índice de Refracção

Um fibra óptica cujo revestimento seja eliminado torna-se sensível à variação do índice de refracção do meio que a rodeia, alterando-se as características de transmissão através da guia de onda e, consequentemente, a intensidade da radiação que chega ao detector. Esta propriedade é utilizada para o desenvolvimento de sensores ópticos, mediante a substituição do revestimento por reagentes específicos. Estes sensores constituem uma forma sensível, porém inespecífica, de determinar concentrações de compostos ou percentagens de misturas de solventes [70,71]. Como principal desvantagem apresentam a dependência térmica, o que fez com que se tenham também desenvolvido sensores físicos de temperatura baseados neste fenómeno.

Sensores de Ressonância Plasmónica de Superfície

O conceito de ressonância plasmónica de superfície (*surface plasmon ressonance*, SPR) é por vezes confundido com a onda evanescente, embora neste último haja uma interacção directa da espécie a determinar, ou do elemento de reconhecimento, com a radiação incidente. A SPR baseia-se no registo da reflectância da superfície de um filme de metal que contacta com a superfície sensora, em função do ângulo de incidência. A um ângulo particular, dependente do comprimento de onda da radiação polarizada incidente e do índice de refracção à superfície do filme metálico, ocorre transferência energética ressonante para os plasmões à superfície do metal, diminuindo a intensidade do feixe reflectido. Dado que o índice de refracção varia com a natureza e concentração do material em contacto com o filme, é assim possível obter informação analítica. Os sensores SPR têm sido aplicados à análise de misturas de líquidos e gases, e sobretudo à monitorização de reacções imunológicas [72-76].

As possíveis interacções da radiação guiada no campo evanescente, que estão na base dos sensores de onda evanescente, índice de refracção e SPR, estão esquematizadas na Figura 1.10.

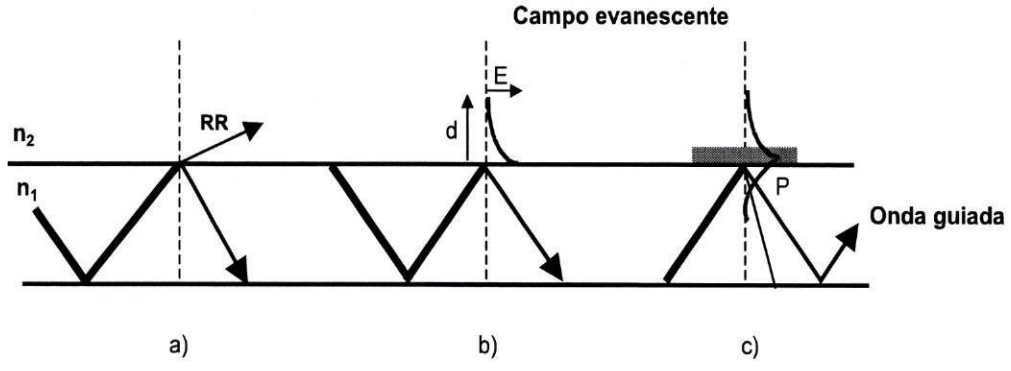


Figura 1.10. Princípios ópticos básicos de vários transdutores: a) refracção; b) onda evanescente; c) SPR. n_1 e n_2: índice de refracção; RR: raio refracto; d: distância; E: energia do campo eléctrico: P: plasmão (densidade de carga) à superfície do filme.

SENSORES INTERFEROMÉTRICOS

Os sensores interferométricos baseiam-se no fenómeno de interferência que se produz ao dividir uma guia de onda em dois ramos paralelos; um dos feixes funciona como referência, enquanto que o outro atravessa a amostra. A interacção entre o analito e o campo evanescente desta última guia causa uma alteração na velocidade de propagação da luz neste ramo. Os dois feixes voltam depois a combinar-se, detectando-se a alteração de fase entre as duas ondas. A fibra de referência compensa assim possíveis interferências da amostra, o que torna este método muito sensível. No entanto, o seu modo de funcionamento exige um controlo rigoroso da temperatura e a utilização de fibras monomodo. Os interferómetros Mach-Zehnder, Michelson e Fabry-Perot constituem exemplos de dispositivos baseados nesta técnica [77]. Basicamente os sensores interferométricos são mais utilizados para determinar parâmetros físicos do que químicos; há no entanto alguns sensores interferométricos descritos para determinação de pesticidas [78-81].

SENSORES ELIPSOMÉTRICOS

Os sensores elipsométricos [82] baseiam-se na mudança de polarização da luz ao ser reflectida numa superfície. Trata-se de uma técnica indirecta, vulgarmente utilizada para medir a espessura de monocamadas ou revestimentos superficiais. A instrumentação complexa e volumosa associada à elipsometria dificulta ainda a sua

implementação no campo dos sensores ópticos, no entanto foram já descritos imunosensores e sensores para determinação de gases na atmosfera [83].

1.2.5. A fase reactiva

A concepção e construção da fase reactiva, ou de reconhecimento químico, constitui a etapa chave no desenvolvimento de um sensor óptico. Dela dependem alguns dos parâmetros de qualidade fundamentais do sensor, como a sensibilidade, a selectividade, o tempo de vida ou o intervalo dinâmico de trabalho. Construir a fase reactiva envolve a selecção do princípio de interacção com a espécie a determinar, a eleição dos compostos participantes no processo de reconhecimento e ainda a optimização das matrizes de suporte adequadas para os mesmos.

1.2.5.1. Interacção com o analito

Na maioria dos casos, o analito não possui propriedades ópticas intrínsecas que possibilitem a sua medida, sendo necessária a utilização de componentes intermediários. A função da resposta de um sensor óptico depende da forma como o analito interage com a fase contendo o reagente.

SENSORES REVERSÍVEIS

Os sensores ópticos recorrem frequentemente a espécies químicas imobilizadas, que mudam de cor de forma reversível na presença/ausência do analito, podendo reagir com este de forma directa ou por reacção competitiva com uma terceira espécie.

Os indicadores que desenvolvem reacções directas reversíveis com a espécie sob medida são geralmente preferidos para integração em sensores ópticos, uma vez que possibilitam medidas contínuas. A maioria dos *sensores directos* envolve um equilíbrio entre o analito e o reagente imobilizado. Se a estequeometria for 1:1, a reacção pode ser representada como:

$$A + R \leftrightarrow AR$$

em que A é o analito, R é o reagente e AR é o produto final. Neste caso, R ou AR são geralmente corados ou luminescentes, e podem portanto ser medidos opticamente. A

transdução química baseia-se geralmente no equilíbrio estabelecido durante a reacção química entre A e R, e este equilíbrio pode ser descrito como:

$$K = [AR] / [A].[R]$$

em que K é a constante de equilíbrio. Durante a reacção química o reagente R é consumido, e portanto qualquer absorvância ou luminescência que lhe seja inerente diminui, ou então à medida que o produto AR se forma a sua absorvância ou luminescência característica aumenta. Em qualquer dos casos, a alteração nas propriedades ópticas de R ou AR pode ser relacionada com a sua concentração, e, por outro lado, com a concentração do analito A.

Se o reagente é consumido durante a reacção, a concentração inicial total a um dado momento é dada por:

$$C_R = [AR] + [R]$$

Assim, a concentração do analito pode ser expressa da seguinte forma:

$$[A] = 1/K \, . \, (C_R/[R] - 1)$$

Se o que é medido são as propriedades ópticas do produto AR, então a concentração do analito será relacionada com a concentração de AR:

$$1/[A] = 1/K \, . \, (C_R/[AR] - 1)$$

A resposta do sensor depende assim da quantidade total de indicador presente. Qualquer variável não controlada que possa afectar a constante de equilíbrio constitui uma potencial fonte de erro; por exemplo, nas reacções envolvendo iões, as variações da força iónica afectam o valor de K.

Se o parâmetro óptico medido depende da razão das concentrações das duas formas do indicador, [AR]/[R], a resposta não depende da quantidade total de indicador, mas a dependência da constante de equilíbrio mantém-se. A resposta em equilíbrio do indicador também não depende de transferências de massa, ao contrário do tempo de resposta, ou seja, o tempo necessário para se atingir o equilíbrio. Interacções reversíveis que não envolvam reacção química, como os fenómenos de atenuação de fluorescência, que se baseiam em transferências de energia, apresentam tempos de resposta mais curtos.

A medida da razão entre intensidades ópticas, a dois comprimentos de onda diferentes, pode ser utilizada para determinar a concentração do analito. Esta abordagem apresenta vantagens, já que torna os sensores menos sensíveis a flutuações instrumentais ou possíveis perdas de reagente, conferindo-lhes estabilidade a longo prazo em termos de calibração. Desta forma, a concentração do analito é dada pela expressão:

$$[A] = 1/K \, . \, [AR]/[R]$$

Sendo a razão [AR]/[R] independente da quantidade de indicador, é possível deste modo desenvolver sensores "pré-calibrados", baseados na medida da razão de intensidades, e a análise pode ser feita directamente. No entanto, AR e R têm que estar presentes em quantidades suficientes para serem medidos com precisão adequada, o que limita o intervalo dinâmico.

As condições aqui descritas para o funcionamento dos sensores ópticos reversíveis diferem das situações analíticas mais comuns, em que são necessárias constantes de equilíbrio elevadas e excesso de reagente para que as reacções sejam completas. Se um sensor funcionasse dessa forma, todo o analito seria consumido pelo reagente e este apresentar-se-ia saturado, perdendo-se a reversibilidade tão desejável. Uma vez que a resposta depende da constante de equilíbrio, os sensores ópticos medem apenas a concentração de analito numa forma disponível para interagir com o reagente.

Os *sensores indirectos* incluem dois ou mais reagentes imobilizados, cujas interacções variam com a concentração do analito. Assim, o ligando L compete com o analito A para a ligação ao reagente R:

$$L + R \leftrightarrow LR$$

Na ausência do analito, esta reacção prossegue no sentido da formação do produto LR. À medida que a concentração do analito aumenta na amostra, a reacção anterior prossegue no sentido inverso, e a reacção com o analito dá-se no sentido da formação de AR:

$$A + R \leftrightarrow AR$$

Desta forma aumenta a quantidade de L livre. As propriedades ópticas de L podem ser medidas como uma função da concentração de A. Note-se que é essencial que L livre e LR apresentem propriedades ópticas distintas.

Os sensores baseados neste mecanismo de ligação indirecta competitiva tornam possível a utilização de reacções em que não se produz directamente uma alteração óptica. Apesar de implicarem, geralmente, tempos de resposta superiores, já que envolvem maior número de equilíbrios químicos, apresentam a possibilidade de variar a constante de equilíbrio global, o que por seu lado determina o intervalo de concentrações a que o sensor responde.

SENSORES IRREVERSÍVEIS

O recurso a reacções químicas irreversíveis dá origem a sensores em que há consumo de reagente:

$$A + R \rightarrow AR$$

Estas reacções são completas, independentes da constante de equilíbrio, e dão a medida da quantidade total de analito. Obtêm-se desta forma sensores descartáveis, muitas vezes designados por *sondas* (do inglês *probe*), como os que se utilizam na química clínica. Quando comparados com os sensores reversíveis, podem ser extremamente sensíveis e permitem determinar maior número de espécies, para as quais não foram ainda desenvolvidos dispositivos reversíveis. Têm que ser preparados com grande reprodutibilidade, de forma a garantir que a resposta é a mesma de sensor para sensor.

RECONHECIMENTO BIOLÓGICO

Os biosensores utilizam enzimas, que actuam como catalisadores biológicos de reacções e substractos específicos. O mecanismo de catálise enzimática pode esquematizar-se da seguinte forma:

$$S + E \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_2} E + P$$

$$K_m = (K_{-1} + K_2) / K_1$$

O substrato S reage na presença de E (enzima, célula ou tecido), resultando o produto P. A constante de afinidade K_m, ou constante de Michaelis-Menten, reflecte a afinidade da enzima para o substrato; valores baixos de K_m reflectem elevada afinidade. Esta constante corresponde numericamente à concentração de substrato que determina uma velocidade de reacção intermédia da velocidade máxima, o que significa, na prática, que para baixas concentrações de substrato ($S << K_m$) a taxa de formação de produto é proporcional à concentração de substrato, enquanto que a concentrações de substrato mais elevadas ($S >> K_m$) a formação de produto atinge o seu valor máximo, e o sinal relacionado torna-se independente de S. A linearização do sinal pode obter-se para o intervalo $S < K_m$ ou $S > K_m$, dependendo da aplicação específica.

Este tipo de reconhecimento é vulgarmente utilizado para determinação directa do substrato da enzima, estabelecendo-se uma relação entre a quantidade de produto formado e a quantidade de substrato consumido, mas pode também ser útil para determinação indirecta de activadores enzimáticos. Algumas enzimas requerem a presença de co-factores, geralmente iões metálicos, para terem actividade catalítica. Se o metal for removido (por exemplo, através de um agente complexante apropriado), a enzima torna-se inactiva, recuperando a sua actividade apenas após tratamento com

iões metálicos. Esta reactivação é extremamente sensível e selectiva em relação à natureza e quantidade do ião metálico. De uma forma semelhante, também os inibidores enzimáticos podem ser determinados mediante o acompanhamento de reacções de reconhecimento biológico. A exposição da enzima a inibidores causa redução da actividade enzimática, e consequente diminuição do sinal analítico.

1.2.5.2. Elementos de reconhecimento (bio)químico

Grande parte dos iões e moléculas de interesse analítico não possuem características ópticas que as permitam mensurar com adequada sensibilidade, pelo que é necessário utilizar outras espécies que modifiquem as respectivas características espectroscópicas durante o processo de reconhecimento, permitindo assim a sua determinação. Estas últimas funcionam portanto como transdutor químico-óptico.

Inúmeros reagentes químicos e bioquímicos (corantes, compostos fluorescentes, enzimas, anticorpos, entre outros) são usados na análise química para a determinação de diferentes espécies. No entanto, para que possam ser transpostos para o desenvolvimento de sensores ópticos com sucesso, é fundamental que possuam determinadas características. Um requisito essencial é serem suficientemente selectivos para determinado analito. Devem ainda ser facilmente imobilizáveis numa membrana sem perderem a sua reactividade, e possuir elevada estabilidade fotoquímica, de forma a viabilizar o desenvolvimento de dispositivos robustos e de baixo custo. Muitos reagentes apresentam limitações que devem ser avaliadas no momento da sua selecção para implementação num sensor: comprimentos de onda pouco favoráveis, necessidade de reagentes adicionais, funcionamento em condições extremas de pH, ou simplesmente não estarem disponíveis no estado de pureza requerido para a aplicação. De um modo geral, o elemento/sistema químico de reconhecimento deve ter características compatíveis com o uso de fibras ópticas, com as condições impostas pelo processo de imobilização e com a utilização de fontes de luz e detectores de baixo custo (LEDs, fotodiodos). Outro factor a ter em conta é a facilidade de regeneração do reagente. Finalmente, a quantidade de reagente a imobilizar, que depende fundamentalmente do tipo de reacção envolvida, é um parâmetro importante a considerar, e que por vezes coloca igualmente limitações práticas. Em reacções reversíveis, como as que se produzem com indicadores ácido-base, a concentração do reagente na fase sólida é reduzida; já no caso das reacções irreversíveis é necessário imobilizar uma quantidade elevada de reagente de modo a dispor de uma reserva considerável do mesmo, que possibilite utilizar o dispositivo durante um período de tempo considerável.

Os sensores ópticos descritos na literatura até ao momento envolvem uma grande variedade de reagentes e moléculas biológicas, que cumprem total ou parcialmente os requisitos enumerados. Por exemplo, o desenvolvimento de sensores de pH tem assentado na imobilização de *indicadores de pH* clássicos. O pH é talvez o parâmetro químico mais frequentemente monitorizado, por conferir uma utilização vantajosa dos respectivos sensores ópticos [84]. Alguns dispositivos baseiam-se na co-imobilização de misturas de vários indicadores com zonas de viragem convenientes, obtendo-se sensores de resposta mais alargada e linear [85,86].

A determinação de catiões e aniões [87-89] tem sido feita à custa de *ionóforos*, moléculas orgânicas não-coradas que formam complexos com iões. O termo engloba os transportadores iónicos lipofílicos e os agentes quelantes capazes de se ligarem a iões reversivelmente e transportá-los através de membranas orgânicas. Até há pouco tempo tinham a sua aplicação generalizada nos eléctrodos selectivos de iões, sendo um dos exemplos mais conhecidos a valinomicina, um transportador neutro muito selectivo de potássio. Vários esquemas de utilização de ionóforos em sensores ópticos são possíveis: introdução de grupos cromogénicos ou fluorogénicos para obter os chamados cromoionóforos ou fluoroionóforos; combinação dos ionóforos com indicadores corados sensíveis; extracção de iões para membranas utilizando transportadores iónicos (permuta iónica); extracção do ião juntamente com um contra-ião para uma fase membranar (co-extracção). Estes dois últimos processos são muito aplicados em sensores com membranas poliméricas hidrofóbicas, como as de cloreto de polivinilo (PVC). Alguns exemplos típicos destas espécies são as porfirinas [37,38], o laranja de xilenol [44], o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) e o 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) [45], a ditizona (difeniltiocarbazona) [90], a difenilcarbazida [91] e o Zincon [92].

A atenuação dinâmica de fluoróforos (*quenching fluorophores*) é também utilizada em sensores ópticos, quer em termos de redução de intensidade de emissão, quer de tempo de vida de fluorescência. Os complexos de ruténio e os sistemas porfirínicos de Pd(II) e Pt(II), por exemplo, têm sido muito estudados e aplicados em sensores de oxigénio [93,94].

De forma a conseguir uma aproximação ao elemento de reconhecimento ideal, têm sido desenvolvidas novas espécies especificamente para aplicação em sensores ópticos. Por modificação química dos reagentes colorimétricos e fluorimétricos tradicionais obtêm-se moléculas que podem ser ligadas quimicamente a materiais poliméricos de suporte, ou com características de solubilidade/polaridade melhoradas para a aplicação pretendida [95]. A investigação neste âmbito concentra-se sobretudo no desenvolvimento de moléculas para reconhecimento de analitos neutros de forma

reversível [96,97], de reagentes para zonas do espectro específicas, como o NIR [98,99], e de indicadores multifuncionais [100].

Os biosensores utilizam componentes biológicos no processo de reconhecimento do analito. As *enzimas* foram os primeiros bio-receptores a serem aplicados em biosensores, e continuam a ser ainda os mais usados, já que são bastante selectivas e sensíveis, em comparação com outros receptores biológicos, e podem ser utilizadas em combinação com diferentes técnicas de transdução óptica [14,16]. Existe um grande número de reacções com catálise enzimática, possibilitando assim a detecção de uma vasta gama de espécies (substratos, produtos, inibidores e moduladores da actividade catalítica). Uma vez que as enzimas transformam um substrato específico num produto sem serem consumidas na reacção, podem ser facilmente aplicadas à determinação contínua de determinados compostos; a estabilidade da enzima imobilizada constitui o factor que determina o tempo de vida do sensor. Muitas reacções com catálise enzimática requerem a presença de outras moléculas, como iões inorgânicos (co-factores) ou moléculas orgânicas complexas (co-enzimas), que podem sofrer modificação química durante o decurso da reacção. As alterações nas propriedades ópticas dos co-reagentes são muitas vezes utilizadas para monitorizar a evolução das reacções enzimáticas.

Por vezes o recurso a enzimas não é viável, por serem instáveis, difíceis de purificar ou terem um custo muito elevado. Nestas circunstâncias, o recurso a *células* vivas (microorganismos, células animais, ou até organelas sub-celulares) em vez dos seus componentes biológicos isolados, apresenta-se como uma alternativa vantajosa [15,101]. As células são mais resistentes a mudanças de pH ou temperatura do que as enzimas purificadas, estando contidas numa só célula todas as enzimas e co-factores necessários à detecção do analito, sem necessidade de os imobilizar separadamente. Geralmente, este tipo de biosensores não requer processos extensos de preparação das amostras, e a actividade catalítica é facilmente regenerada deixando as células crescer novamente. No entanto, apresentam tempos de resposta mais longos e selectividade inferior, quando comparados com os biosensores enzimáticos.

Os *anticorpos*, com a sua capacidade única de se ligarem de forma selectiva a um composto específico, ou antigénio, constituem o elemento chave no desenvolvimento dos chamados *imunosensores* [102]. Estes baseiam-se nos princípios dos imunoensaios de fase sólida. Quanto maior for a afinidade do anticorpo para o analito, melhor será a sensibilidade do biosensor; a selectividade, por seu turno, é uma propriedade específica do anticorpo aplicado. Estes biosensores permitem separar componentes individuais de misturas complexas de biomoléculas, com base na função biológica ou química, através

de interacções de afinidade. Geralmente os anticorpos são marcados com radioisótopos, enzimas, sondas fluorescentes e quimiluminescentes ou marcadores metálicos, de forma a permitirem a transdução óptica [103]. Os sensores que utilizam anticorpos são muito selectivos e ultra sensíveis, apresentando apenas a desvantagem de não terem efeito catalítico.

Os *neurotransmissores* e *receptores hormonais* geram respostas fisiológicas amplificadas no organismo, desencadeadas pelas ligação de um ligando. Assim, estes receptores biológicos tendem a apresentar afinidade para um conjunto de compostos ou analitos estruturalmente relacionados, o que é uma característica atractiva para a sua utilização em biosensores [13].

Também os *ácidos nucleicos* têm sido utilizados como elementos receptores para desenvolvimento de biosensores. O mecanismo de transdução mais usado nestes dispositivos, designados por *genosensores*, é a detecção de oligonucleótidos com marcação fluorescente, utilizando um ensaio competitivo [104]. A descodificação do genoma humano promoveu, de forma significativa, a utilização e aplicação deste tipo de biosensores.

O desenvolvimento e síntese de sistemas receptores artificiais, com propriedades de reconhecimento semelhantes às dos anticorpos, tem suscitado grande interesse nos últimos anos, e a sua aplicação em biosensores tem dado origem aos *sensores biomiméticos*. Nestes, o reconhecimento do analito é feito recorrendo a moléculas geneticamente modificadas, membranas artificiais ou polímeros com impressão molecular (MIP, *molecularly imprinted polymer*), que mimetizam os bio-receptores [105].

1.2.5.3. Matrizes e suportes para imobilização de agentes de reconhecimento

Os reagentes utilizados em sensores ópticos imobilizam-se geralmente em suportes rígidos, que podem ser polímeros ou superfícies orgânicas activadas, a própria guia de onda, o revestimento de uma fibra óptica, ou um elemento óptico.

Nos *sensores baseados em fenómenos de superfície*, os componentes activos são imobilizados directamente sobre a superfície do elemento óptico, ou sobre um suporte polimérico ou matriz porosa. Este polímero pode ser macroporoso ou microporoso; a reacção de reconhecimento tem lugar apenas na superfície de contacto com o analito. Apesar de o reagente imobilizado ter mobilidade limitada, os tempos de resposta são geralmente curtos, devido à excelente acessibilidade do analito.

Nos chamados *sensores de matriz tridimensional* o reagente encontra-se dissolvido no seio de uma fase imiscível, suportada sobre uma matriz polimérica inerte (membrana sensora). O funcionamento destes sensores baseia-se na difusão do analito a partir da solução para o interior da membrana, originando um sinal óptico. A selectividade rege-se pelos coeficientes de distribuição de iões entre a membrana e a solução e pelas constantes de formação dos complexos. O facto de apresentarem uma resposta baseada num mecanismo semelhante ao dos sensores potenciométricos tem proporcionado um rápido desenvolvimento, já que permite a utilização de elementos de reconhecimento anteriormente utilizados na preparação daqueles [106,107].

Além do material de suporte, os sensores ópticos podem ainda incluir uma membrana protectora, que em muitos casos apresenta características de permeabilidade selectiva. No entanto, nos sensores miniaturizados a distinção entre membrana e suporte torna-se complicada, e o indicador é geralmente imobilizado num filme ou membrana que lhe serve simultaneamente de suporte físico e de protecção.

Existe actualmente uma grande variedade de materiais utilizados na construção de suportes e membranas para sensores ópticos. A sua escolha depende da afinidade para com o reagente, da permeabilidade ao analito, da compatibilidade com a amostra e com outros materiais usados no fabrico do sensor. A matriz de suporte deve ter transparência óptica na região espectral de interesse analítico, deve ser apropriada à imobilização do reagente, permitindo simultaneamente o acesso rápido do analito, deve ser mecanicamente estável e quimicamente inerte. O material polimérico tem um efeito marcado sobre as características do sensor, afectando sobretudo o tempo de resposta e a selectividade [92]. O facto de poder favorecer, ou não, a difusão de espécies interferentes, e de constituir uma barreira para o solvente durante as medidas em fase aquosa, pode influenciar em certa extensão a selectividade do sensor. Por outro lado, pode ainda influenciar o tempo de resposta, na medida em que tem que haver transferência de matéria do seio da solução para a zona reactiva; sendo o tempo de resposta ditado pelo coeficiente de difusão dos gases ou líquidos, pela solubilidade do polímero, ou ainda pela transferência de cargas através de uma membrana, é natural que a sua presença possa condicionar este parâmetro analítico.

Na Tabela 1.3 estão resumidos os materiais poliméricos mais utilizados como matrizes e suportes de sensores ópticos.

Tabela 1.3. Materiais poliméricos utilizados na construção de suportes para sensores ópticos.

Tipo de Polímero		Exemplos
Polímeros Orgânicos	Lipofílicos	Cloreto de polivinilo (PVC)
		Acetato de polivinilo (PVA)
		Acetato de polietilenovinilo (PEVA)
		Polimetacrilato de metilo (PMMA)
		Derivados do poliestireno
		Polidimetilsiloxano (PDMS)
		Poli(hexil-metacrilato) (PHMA)
	Hidrofílicos	Celulose
		Quitosano
		Poliacrilamida
		Poliuretano
		Poli-glicóis
	Iónicos	Nafion®
		Polianilina
Polímeros Inorgânicos		Silicone
		Vidro de poro controlado (CPG)
		Vidro sol-gel

Os polímeros orgânicos de características hidrofóbicas são os mais utilizados, já que os elementos de reconhecimento mais comuns são moléculas orgânicas. São inúmeros os sensores ópticos descritos que usam membranas de cloreto de polivinilo (PVC) [95,108-112], baseados nos mecanismos de troca-iónica ou co-extração. Outros polímeros orgânicos lipofílicos utilizados são o polimetacrilato (PMMA), o acetato de polivinilo (PVA) e os derivados do poliestireno [37,113-115]. Estes materiais apresentam uma elevada temperatura de transição vítrea (T_g), o que os torna frágeis e quebradiços; além disso, a sua elevada rigidez e densidade prejudica a difusão de iões e gases para a matriz polimérica. Assim, são geralmente associados a agentes plastificantes, como o bis(2-etilexil)sebacato, o dibutilsebacato, o dibutilftalato ou o *o*-nitrofeniloctileter, habitualmente numa razão 2:1 (polímero:plastificante). Apesar de melhorarem a permeabilidade dos sensores, condicionando a sua selectividade e, logo, a sua resposta, os plastificantes podem contudo exsudar dos polímeros e constituir uma potencial fonte de contaminação da amostra. Polímeros com baixa T_g, como o polidimetilsiloxano (PDMS), o poli-hexilmetacrilato (PHMA) ou o acetato de polietilenovinilo (PEVA), não

requerem plastificantes, mas são geralmente apolares, o que os torna maus solventes para moléculas de reconhecimento polares, e portanto menos úteis.

Os polímeros orgânicos hidrofílicos são caracterizados por um grande número de funções capazes de estabelecer pontes de hidrogénio (hidroxi, amino, grupos carboxílicos ou sulfo) e fornecem uma matriz que corresponde a um ambiente aquoso. Os iões podem assim difundir-se de forma bastante livre, mas a elevada retenção de água (10-100%) pode causar um considerável aumento de volume do polímero, o que afecta as propriedades ópticas dos sensores. A celulose [116-118], o quitosano [119,120], a poliacrilamida [121], o poliuretano e os poli-glicóis constituem exemplos típicos deste tipo de polímeros.

Os polímeros orgânicos iónicos, ou polielectrólitos, apresentam uma grande quantidade de grupos dissociáveis, sendo também muito aplicados em cromatografia de troca iónica. Nos sensores ópticos, são utilizados para troca iónica do contra-ião pelos iões do indicador. O Nafion®, por exemplo, é considerado uma alternativa vantajosa à celulose e às resinas de troca-iónica convencionais no desenvolvimento de sensores para espécies iónicas [122-126]. A polianilina, que possui condutividade eléctrica elevada, boa estabilidade, e sofre variação de cor com o pH, oferece também a possibilidade de construção de sensores ópticos com intervalo dinâmico alargado [66,127-129].

Os polímeros inorgânicos, como as silicones, possuem excelentes propriedades ópticas e mecânicas para serem utilizadas como membranas em sensores ópticos [130]. Apesar de constituirem o material mais adequado para monitorização de gases, pela elevada capacidade de difusão que estes apresentam, as silicones retêm as espécies iónicas e a sua superfície não é facilmente modificável para imobilização covalente de reagentes. Além disso, são pouco compatíveis com outros polímeros e materiais usados como estruturas de suporte. Os vidros de poro controlado (CPG, *controled pore glass*) são também suportes inorgânicos muito usados, devido à sua estabilidade mecânica, transparência óptica e compatibilidade com as fibras ópticas [131]. Uma alternativa vantajosa a estes materiais são os vidros obtidos através da tecnologia sol-gel, que associam as propriedades típicas do vidro a uma grande versatilidade e facilidade de fabrico [132,133]. O processo sol-gel e as características destes materiais serão abordados em detalhe no Capítulo II, uma vez que foram os suportes utilizados no trabalho de investigação descrito nesta dissertação.

O grande desenvolvimento da Química de Materiais tem trazido novas perspectivas ao campo dos sensores [134]; novos polímeros, com características melhoradas e mais compatíveis com os mecanismos de transdução utilizados, estão hoje disponíveis para o

desenvolvimento de sensores ópticos. Por exemplo, as zeolites são aluminosilicatos cristalinos microporosos, cujas propriedades estruturais apresentam vantagens em aplicações fotoquímicas [135,136]. Sensores ópticos baseados em filmes de azul da Prússia, que funcionam como electrólitos sólidos, catalisando a oxidação de muitas espécies, têm sido aplicados à análise farmacêutica [137]. Nos últimos 10 anos surgiu um novo tipo de materiais poliméricos, com locais de reconhecimento molecular específicos, preparados por um processo de impressão molecular – os MIPs [105,138]. Esta técnica produz polímeros sintéticos estáveis que possuem propriedades de reconhecimento selectivo, devido à existência, na própria matriz polimérica, de locais complementares, em forma e/ou funcionalidade, ao analito. Portanto, podem proporcionar selectividade e constantes de afinidade muito elevadas, numa escala comparável aos sistemas naturais, resultando nos sensores biomiméticos já referidos. De entre os monómeros mais usados para impressão molecular destacam-se o ácido metacrílico, a vilpiridina e o dimetilaminometacrilato; os polímeros obtidos são robustos, baratos e, na maioria dos casos, adequados a aplicações industriais.

Apesar da recente evolução, a grande maioria dos materiais utilizados como matrizes e suportes de sensores ópticos, e aqui referidos, apresentam algumas limitações. Uma estratégia cada vez mais promissora parece ser o fabrico de polímeros compostos, combinando diferentes materiais compatíveis entre si; desta forma, são reunidas as vantagens e minimizados muitos dos problemas, obtendo-se matrizes com características mais próximas das ideais.

Métodos de Imobilização de Reagentes

Os reagentes podem ser imobilizados nas matrizes poliméricas de diferentes formas, dependendo da estrutura do próprio reagente e do suporte polimérico utilizado, das características da espécie a analisar e do tipo de amostra onde se vai realizar a análise. No processo de desenvolvimento de um sensor, a selecção do método de imobilização deve ser feita com base nos seguintes critérios: estabilidade da fase reactiva no meio em análise, simplicidade do processo, reprodutibilidade, custo e, sobretudo, a possibilidade de obtenção de uma superfície activa com a actividade pretendida. No caso dos biosensores, a imobilização de moléculas biológicas, como as enzimas, permite não só a sua fixação sobre o transdutor óptico, facilitando o funcionamento e manuseamento do sensor, como também, na maioria dos casos, a sua estabilização [139,140]; o método de imobilização torna-se assim um factor determinante na obtenção de biosensores com características operacionais melhoradas. Os processos de imobilização podem dividir-se

em três tipos: imobilização física, imobilização electrostática e imobilização covalente, e encontram-se representados de forma esquemática na Fig. 1.11.

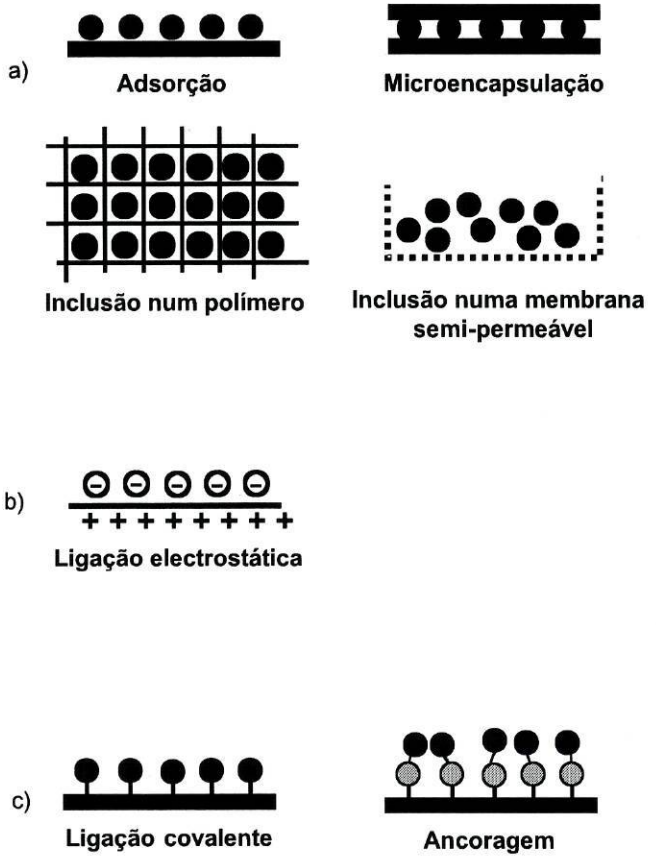


Figura 1.11. Métodos de imobilização de reagentes (bio)químicos em matrizes e suportes. a) Imobilização física; b) Imobilização electrostática; c) Imobilização química.

A *imobilização física* pode ser feita por adsorção do reagente sobre a superfície do suporte, ou por inclusão no interior do mesmo. A *adsorção* é o processo mais simples, no entanto, na maioria dos casos as ligações envolvidas são fracas, originando sensores com tempo de vida reduzido. A *microencapsulação* foi o método usado na construção dos primeiros biosensores, e baseia-se na imobilização do reagente entre duas membranas. Este fica assim protegido de contaminação e biodegradação, e estabilizado em relação a factores como temperatura, pH, força iónica e composição química da

amostra. A *inclusão*, ou aprisionamento de reagentes numa fase sólida, é um método actualmente muito utilizado e consiste em misturar o reagente numa solução de monómeros, que posteriormente polimerizam, aprisionando o reagente. Este processo pode ser feito em matrizes variadas, como os geles de poliacrilamida ou os vidros porosos de silício obtidos pelo processo sol-gel. É particularmente útil no caso de biomoléculas, como enzimas, já que mediante este processo as propriedades fisico-químicas do reagente não são alteradas. No entanto, o polímero pode causar barreiras à difusão do analito, retardando a reacção. Esta limitação pode ser melhorada controlando o tamanho de poro do polímero e o grau de interconectividade das suas cavidades interiores; o processo sol-gel, que permite definir rigorosamente e de forma versátil as características da fase sólida final, é assim uma tecnologia muito atractiva e vantajosa quando se pretende este tipo de imobilização.

A *imobilização electrostática* é feita sobre superfícies de suporte revestidas de grupos carregados, positivos ou negativos, capazes de se ligarem a iões de carga oposta. Os suportes utilizados são resinas de troca iónica com grupos sulfónicos ou fosfóricos, ou com grupos amina ou amónio quaternário. Trata-se de um processo simples e rápido, em que a acessibilidade do reagente activo em relação ao analito é muito boa. No entanto, a fraca estabilidade das ligações ou a deformabilidade do suporte com as variações de força iónica do meio, podem pôr em causa a sua aplicação na prática.

A *imobilização covalente* envolve o estabelecimento de uma ligação covalente entre o reagente e a matriz de suporte. Para tal é necessário que este disponha de grupos reactivos; caso isto não se verifique, pode proceder-se à activação quimica da superfície, ou pode recorrer-se a grupos químicos bifuncionais para fazer a ancoragem do reagente à matriz. Por exemplo, a introdução de grupos amino na superfície de um vidro permite a posterior ligação covalente de enzimas e indicadores [131]; o glutaraldeído é usado com frequência na construção de biosensores, servindo de agente de ligação de enzimas [141]. A imobilização covalente é mais estável e resulta em sensores com tempo de vida superior, uma vez que a lixiviação do reagente é drasticamente diminuída. No entanto, pode modificar consideravelmente as características físicas e químicas do reagente. Na maioria dos casos envolve a modificação química dos polímeros e dos reagentes, o que pode também afectar negativamente a selectividade e a sensibilidade.

1.3
APLICAÇÕES ANALÍTICAS DOS (BIO)SENSORES ÓPTICOS

Os sensores e biosensores ópticos constituem ferramentas analíticas valiosas e extremamente versáteis, com aplicação em várias áreas com grande impacto na qualidade de vida, incluindo a medicina, a agricultura, a indústria alimentar e farmacêutica, o controlo ambiental e a biotecnologia [7,142].

Os sensores químicos baseados em fibras ópticas são de grande utilidade na área ambiental, uma vez que permitem a detecção remota de contaminantes ambientais, de forma económica e em tempo real [143-146]. Uma vertente importante destes sensores é actuarem como dispositivos de alarme, quando não é necessário quantificar de forma exacta um determinado analito mas apenas efectuar a sua detecção ou controlo, para manter o seu valor dentro de determinadas margens de segurança. Assim, os sensores ópticos são utilizados na determinação de contaminações químicas em águas subterrâneas e superficiais, nomeadamente compostos orgânicos, metais pesados, aniões e oxigénio [46,124,126,143,147], no ar (NO, CO, SO_2, HCN) [83,123] e no solo (herbicidas e pesticidas [79-81,131,141]).

Na indústria alimentar, os sensores ópticos representam uma alternativa vantajosa aos métodos analíticos clássicos aplicados no controlo de qualidade, englobando a cadeia produção/processamento/distribuição, já que podem ser facilmente integrados em sistemas automatizados e desenvolvidos como equipamentos portáteis simples. São extremamente úteis na identificação de potenciais fontes de contaminação e na detecção de espécies implicadas na segurança alimentar [7]. De entre os sensores descritos para análise alimentar, têm tido aplicação mais alargada os destinados ao controlo de vinhos e outras bebidas [60,148-150]. Os sensores e biosensores ópticos têm também uma aplicação muito importante na área da biotecnologia. Podem fornecer medidas rápidas, selectivas e sensíveis em meios complexos, como o são as amostras em fermentação. Além disso permitem a monitorização automatizada, remota e em linha, sem sofrerem interferências electromagnéticas [14,63,151]. Recentemente os biosensores adquiriram grande destaque na área militar, com o desenvolvimento de dispositivos de alerta capazes de detectar agentes químicos usados nas chamadas guerras químicas e biológicas [142].

A monitorização de metabolitos no sangue, na urina e noutros fluídos biológicos é de extrema importância para o diagnóstico e tratamento de doenças. A resposta rápida, o tamanho reduzido e a segurança inerente (por não serem eléctricos) dos sensores

ópticos fazem com que sejam de grande utilidade para aplicações na química clínica [152,153]. Desde as décadas de 1970-1980 que se usam sensores ópticos para monitorização de parâmetros clínicos, como electrólitos, pH, glucose, ureia, albumina, colesterol, O_2 e CO_2, em análises clínicas laboratoriais ou mesmo na monitorização contínua *in vivo* dos pacientes [48,154-158].

Um número considerável de sensores ópticos desenvolvidos até à data encontra aplicação directa na indústria farmacêutica [142,154,159]; alguns exemplos representativos encontram-se reunidos na Tabela 1.4. O seu uso mais comum é a quantificação da substância activa e/ou dos excipientes na forma farmacêutica final; os sensores e biosensores ópticos permitem medidas exactas e precisas em todas as formas farmacêuticas tradicionais, desde os líquidos e comprimidos até às pomadas e pós. A aplicação de dispositivos baseados em fibras ópticas apresenta vantagens sobretudo na determinação de perfis de dissolução de produtos farmacêuticos com multicomponentes [160]. Comparados com os métodos discretos, estes procedimentos são rápidos, baratos e permitem a obtenção sequencial e de forma automática de um grande número de medidas *in-situ* e em tempo real, por cada ensaio realizado. Obtêm-se assim perfis de dissolução detalhados, que constituem sem dúvida uma ajuda preciosa no desenvolvimento futuro de novas formulações multicomponentes e com libertação controlada. Em particular, os sensores baseados na radiação da zona NIR associados à análise multivariada podem ser usados com vantagem no controlo de qualidade farmacêutico durante o processo de fabrico, em ensaios de tamanho de partícula, teor de humidade, identificação e quantificação [161,162]. Sensores ópticos não-invasivos podem ainda constituir ferramentas valiosas em estudos farmacocinéticos e toxicocinéticos [159].

Apesar destas vantagens, a aplicação de sensores ópticos no controlo farmacêutico é ainda reduzida se comparada, por exemplo, com os sensores electroquímicos. Além disso, de entre os sensores disponíveis poucos se baseiam em materiais inovadores ou nas formas mais vantajosas de imobilização referidas anteriormente. Assim, o desenvolvimento de sensores optoquímicos para análise farmacêutica constitui uma área a explorar, podendo contribuir para melhorar o processo de fabrico e, em última análise, a qualidade dos medicamentos.

Tabela 1.4. Sensores ópticos aplicados à determinação de produtos farmacêuticos.

ANALITO	REAGENTE IMOBILIZADO	PRINCÍPIO ÓPTICO	OBS.	REF.
Ácido ascórbico	Filme de azul da Prússia	Absorvância/Vis	Sensor descartável	[163]
Ácido ascórbico	Ferroína imobilizada em Nafion®	Absorvância/Vis	SIA	[164]
Ácido ascórbico	Gel de troca iónica Sephadex QAE A-25	Absorvância/UV	FIA	[165]
Ácido ascórbico	Filme de azul da Prússia	Absorvância/Vis	FIA	[137]
Ácido ascórbico	Filme de polianilina	Absorvância/Vis	-	[129]
Berberina	BBOB imobilizado em membrana de PVC	Atenuação de fluorescência	-	[108]
Berberina	PBBO imobilizado em membrana de PVC	Atenuação de fluorescência	-	[109]
Berberina	β-ciclodextrina imobilizada em PVC	Fluorescência	-	[112]
Cisteína	Filme de azul da Prússia	Absorvância/Vis	FIA	[137]
Cloreto	Indio(III) octaetil-porfirina imobilizada em filme de PVC	Absorvância/Vis	SIA	[166]
Glucose	Filme de azul da Prússia + glucose oxidase	Absorvância/Vis	FIA	[167]
Halotano	2,5-difeniloxazol e tris[4,4,4-trifluoro-1(2-tienil)butano-1,3-diono)európio(III) imobilizados em filme de PEG	Fluorescência	Transferência de energia	[168]
Halotano	tris[4,4,4-trifluoro-1(2-tienil)butano-1,3-diono)európio(III) imobilizado em Carbowax 20M	Fluorescência	-	[168]
Halotano	Decacicleno imobilizado em membrana de silicone	Atenuação de fluorescência	Pode ser aplicado a O_2	[130]

BBOB: 1,4-bis(1,3-benzoxazol-2-il)benzeno; FIA: análise por injecção em fluxo; PBBO: 2-(4-difenil)-6-fenilbenzoxazol; SIA: análise por injecção sequencial

Tabela 1.4. (Continuação)

ANALITO	REAGENTE IMOBILIZADO	PRINCÍPIO ÓPTICO	OBS.	REF.
Norefedrina	Tartaratos e indicador protonado co-imobilizados em membrana de PVC	Absorvância/Vis	-	[169]
Paracetamol	Gel de troca iónica Sephadex QAE A-25	Absorvância/UV	FIA	[165]
Penicilina	Azul do nilo incorporado em membrana de PVC	Fluorescência	-	[170]
Penicilina + Ampicilina	Penicilinase e vermelho de fenol imobilizados em filme de poliacrilamida	Reflectância/Vis	FIA; Análise multivariada	[171]
Penicilina	Penicilinase e acriloilfluoresceína imobilizadas em hidrogel	Fluorescência	-	[172]
Penicilina	FITC e penicilinase co-imobilizadas em membrana de Biodyne B	Fluorescência	FIA	[173]
Propanolol	Tartaratos e indicador protonado co-imobilizados em membrana de PVC	Absorvância/Vis	-	[169]
Quinino	Nenhum	Fluorescência	Aplicado ao doseamento no sangue	[174]
Sulfasalazina	Nenhum	Reflectância/NIR	Análise multivariada	[161]
Sulfametoxazol	Nenhum	Absorvância/UV	Análise multivariada	[160]
Tetraciclinas	Antraceno imobilizado em co-polímero de poli-acrilatos	Atenuação de fluorescência	Aplicado a comprimidos e urina	[114]
Tetraciclinas	1,4-bis(5,5'-dimetilbenzoxazole-1',3'-il-2')benzeno incorporado em filme de PVC	Atenuação de fluorescência	-	[175]
Trimetoprim	Nenhum	Absorvância/UV	Análise multivariada	[160]

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PEG: polietilenoglicol

Tabela 1.4. (Continuação)

ANALITO	REAGENTE IMOBILIZADO	PRINCÍPIO ÓPTICO	OBS.	REF.
Tiamina	Resina catiónica Sephadex CMC-25	Absorvância/UV	FIA	[176]
Zinco	PAN imobilizado em membrana de PVC	Absorvância/Vis	FIA	[110]
Xantinas (cafeína, teofilina)	MIP (polímero de PMMA-EDMA com impressão molecular)	SPR	-	[177]

PAN: 1-(2-piridilazo)-2-naftol; PMMA: polimetacrilato de metilo; EDMA: dimetilacrilato de etilenoglicol

Apesar do elevado potencial analítico dos sensores ópticos e das vantagens que apresentam em áreas tão diversas, são ainda pouco numerosos os dispositivos comercializados. Problemas como robustez insuficiente após miniaturização, baixa sensibilidade e selectividade, pouca reversibilidade, problemas de regeneração e limites de detecção inadequados, terão que ser resolvidos para que os sensores ópticos se transformem em instrumentos comercialmente viáveis. O desenvolvimento de dispositivos integrados é sem dúvida uma estratégia promissora para se conseguir melhor desempenho e estabilidade [22,23]. Sensores "inteligentes", com transdutores e circuitos para processamento do sinal englobados num único *chip* e capazes de auto-calibração automática, reduzem alterações de sensibilidade, oscilações, e introduzem sistemas de alarme em caso de falhas. A produção de unidades sensoras multifuncionais (*microarray sensors*), baseados no acoplamento simultâneo de vários sensores convencionais, de forma a medirem múltiplos analitos, constituem outra via atractiva [178]. Podem ser úteis não só para determinação de múltiplos analitos, como também para controlar um processo no seu todo, monitorizando as diferentes variáveis envolvidas. Apesar das limitações demonstradas, os dispositivos desenvolvidos e aplicados até à data ilustram de forma clara a grande variedade de abordagens e sistemas possíveis e o imenso potencial desta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J. Janata, *Anal. Chem.* 73 (2001) 150A-153A.
2. *Chemical Sensor Technology*, Vol. 1, ed. T. Seyama, Elsevier, Amesterdão, 1998.
3. B.R. Eggins, *Chemical sensors and biosensors*, John Willey & Sons, Ltd., Chichester, 2002.
4. A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Pure & Appl. Chem.* 63 (1991) 1247-1250.
5. D.M. Wilson, S. Hoyt, J. Janata, K. Booksh, L. Obando, *IEEE Sensors Journal* 4 (2001) 256-274.
6. J. Janata, M. Josowicz, P. Vanýsek, A. M. DeVaney, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 179R-208R.
7. J. Castillo, S. Gáspár, S. Leth, M. Niculescu, A. Mortari, I. Bontidean, V. Soukharev, S.A. Dorneanu, A.D. Ryabov, E. Csöregi, *Sens. Actuators B* 102 (2004) 179-194.
8. O. Wolfbeis, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 325 (1986) 387-392.
9. S. Borman, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1616A-1618A.
10. O.S. Wolfbeis, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1991.
11. C.P. Conde, *Sensores Ópticos*, Universitat de València, 1996.
12. C.M. Braguglia, *Chem. Biochem. Eng.* 12 (1998) 183-190.
13. M. Mehrvar, C. Bis, J.M. Scharer, M. Moo-Young, J.H. Luong, *Anal. Sci.* 16 (2000) 677-692.
14. B. Kuswandi, R. Andres, R. Narayanaswamy, *Analyst* 126 (2001) 1469-1491.
15. M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 664-682.
16. M.M.F. Choi, *Microchim. Acta* 148 (2004) 107-132.
17. W.R. Seitz, *Anal. Chem.* 56 (1984) 16A-34A.
18. R.E. Dessy, *Anal. Chem.* 61(1989) 1079A-1094A.
19. J.O.W. Norris, *Analyst* 114 (1989) 1359-1372.
20. M.A. Arnold, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1015A- 1025A.
21. C.R. Lavers, K. Itoh, S.C. Wu, M. Murabayashi, G. Stewart, T. Stout, *Sens. Actuators B* 69 (2000) 85-95.
22. W. Lukozs, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 37-50.
23. M. Puyol, Í. Salinas, I. Garcés, F. Villuendas, A. Llobera, C. Domínguez, J. Alonso, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3354-3361.
24. S. Svanberg, *Sens. Actuators B* 33 (1996) 1-4.
25. U. Panne, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 491-500.
26. P. K. Dasgupta, Y. Eom, K.J. Morris, J. Li, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 337-364.
27. Y. Song, A.V. Nurmikko, M. Gherasimova, S. Jeon, J. Han, *Phys. Stat. Sol. (a)* 201 (2004) 2721-2725.

28. K.T. Lau, S. Baldwin, R.L. Shepherd, P.H. Dietz, W.S. Yerzunis, D. Diamond, *Talanta* 63 (2004) 167-173.
29. W.A. DeOliveira, F.A.A. Matias, E. Moschim, *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 45 (1996) 326-328.
30. E. Monroy, F. Calle, J.L. Pau, E. Muñoz, F. Omnès, B. Beuamont, P. Gibart, *Phys. Stat. Sol. (a)* 185 (2001) 91-97.
31. I. Prochazka, K. Hamal, B. Sopko, *J. Modern Optics* 51 (2004) 1289-1313.
32. J. Bürck, B. Zimmermann, J. Mayer, H.J. Ache, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354 (1996) 284-290.
33. W.C. Rutledge, *ISA Transactions*, 31 (1992) 45-49.
34. R. Narayanaswamy, *Analyst* 118 (1993) 317-322.
35. R.A. Potyrailo, S.E. Hobbs, G.M. Hieftje, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998) 349-373.
36. G. Gauglitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 141-155.
37. R. Czolk, J. Reichert, H.J. Ache, *Sens. Actuators B* 7 (1992) 540-543.
38. E. Wang, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 673-682.
39. H. Lehmann, G. Schwotzer, P. Czerney, G.J. Mohr, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 392-400.
40. L.W. Burgess, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 10-15.
41. J.A. Morales, J.F. Cassidy, *Sens. Actuators B* 92 (2003) 345-350.
42. J. Shi, Y. Zhu, X. Zhang, W.R. Baeyens, A.M. García-Campaña, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 351-360.
43. G.F. Kirkbright, R. Narayanaswamy, N.A. Welti, *Analyst*, 109 (1984) 15-17.
44. I. Klimant, M. Otto, *Mikrochim. Acta* 108 (1992) 11-17.
45. N. Malcik, O. Oktar, M.E. Ozser, P. Caglar, L. Bushby, A. Vaughan, B. Kuswandi, R. Narayanaswamy, *Sens. Actuators B* 53 (1998) 211-221.
46. I.M. Raimundo Jr., R. Narayanaswamy, *Sens. Actuators B* 90 (2003) 189-197.
47. G. Di Marco, M. Lanza, A. Marno, I. Stefio, C. Di Pietro, G. Romeo, S. Campagna, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5019-5023.
48. M.J.P. Leiner, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 209-222.
49. P.R. Coulet, J.L. Blum, *Trends Anal. Chem.* 11 (1992) 57-61.
50. J.N. Demas, B.A. DeGraff, P.B. Coleman, *Anal. Chem.* 71 (1999) 793A-800A.
51. G. Orellana, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 344-346.
52. R.B. Thompson, J.R. Lakowicz, *Anal. Chem.* 65 (1993) 853-856.
53. H. Szmacinski, J.R. Lakowicz, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 16-24.
54. S. Draxler, M.E. Lippitsch, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 199-203.
55. M.E. Lippistch, S. Draxler, D. Kieslinger, *Sens. Actuators B* 38-39 (1997) 96-102.
56. M.E. Lippitsch, *Sens. Actuators B* 11 (1993) 499-502.
57. G.A. Baker, A.N. Watkins, S. Pandey, F.V. Bright, *Analyst* 124 (1999) 373-379.
58. Y. Liu, R.P. García, M.E.D. García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 255 (1991) 245-251.

59. J. Díaz-García, J.M. Costa-Fernández, N. Bordel-García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 429 (2001) 55-64.
60. X.Xie, A.A. Suleiman, G.G. Guibault, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 325-329.
61. M. Nakagawa, *Sens. Actuators B* 29 81995) 94-100.
62. M. Li, S.H. Lee, Z.U. Bae, K.P. Lee, Y.C. Park, M.S. Lee, *J. Fluorescence* 14 (2004) 597-601.
63. R. Ulber, J. Frerichs, S. Beutel, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 342-348.
64. J.E. Lee, S. S. Saavedra, *Anal. Chim. Acta* 285 (1994) 265-269.
65. A. Yimit, A.G. Rossberg, T. Amemiya, K. Itoh, *Talanta* 65 (2005) 1102-1109.
66. Z. Ge, C.W. Brown, L. Su, S.C. Yang, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2335-2338.
67. B.H. Weigl, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3323-3327.
68. L. Yang, S.S. Saavedra, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1307-1314.
69. L. Yang, S.S. Saavedra, N.R. Armstrong, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1834-1841.
70. D. Freiner, R.E. Kunz, D. Critterio, U.E. Spichiger, M.T. Gale, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 277-285.
71. K. Cherif, S. Hleli, A. Abdelghani, N. Jaffrezic-Renault, V. Matejec, *Sensors* 2 (2002) 195-204.
72. R.D. Harris, J.S. Wilkinson, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 261-267.
73. J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B* 54 (1999) 3-15.
74. L.M. Lechuga, A. Calle, F. Prieto, *Quimica Analitica* 19 (2000) 54-60.
75. J.D. Wright, C. Bültzingslöwen, T.J.N. Carter, F. Colin, P.D. Shepherd, J.V. Oliver, S.J. Holder, R.J.M. Nolte, *J. Mater. Chem.* 10 (2000) 175-182.
76. J. Homola, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 528-539.
77. A. Brecht, G. Gauglitz, *Sens. Actuators B* 38-39 (1997) 1-7.
78. E.F. Schipper, R.P.H. Kooyman, R.G. Heideman, J. Greve, *Sens. Actuators B* 24 (1995) 90-93.
79. L.M. Lechuga, A.T.M. Lenferink, R.P.H. Kooyman, J. Greve, *Sens. Actuators B* 25 (1995) 762-765.
80. A. Brecht, J. Piehler, G. Lang, G. Gauglitz, *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 289-299.
81. E.F. Schipper, A.J.H. Bergevoet, R.P.H. Kooyman, J. Greve, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 171-176.
82. H. Arwin, *Sens. Actuators A* 92 (2001) 43-51.
83. K. Brudzewski, *Sens. Actuators B* 9 (1992) 59-62.
84. J. Lin, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 541-552.
85. B.D. Gupta, S. Sharma, *Optics Commun.* 154 (1998) 282-284.
86. J. Lin, D. Liu, *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 49-55.
87. J. Janata, *Anal. Chem.* 64 (1992) 921-927A.
88. I. Oehme, O.S. Wolfbeis, *Mikrochim. Acta* 126 (1997) 177-192
89. K. Langry, B. Rambabu, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74 (1999) 717-732.
90. W.A. de Oliveira, R. Narayanaswamy, *Talanta* 39 (1992) 1499-1503.
91. M. Zevin, R. Reisfeld, I. Oheme, O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* 38-39 (1997) 235-238.

92. I. Oehme, S. Prattes, O.S. Wolfbeis, G.J. Mohr, *Talanta* 47 (1998) 595-604.
93. A.K. McEvoy, C.M. McDonagh, B.D. MacCraith, *Analyst* 121 (1996) 785-788.
94. S. Lee, I. Okura, *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 181-188.
95. K. Wang, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Analyst* 117 (1992) 57-60.
96. G.J. Mohr, D. Citterio, C. Demuth, M. Fehlmann, L. Jenny, C. Lohse, A. Moradian, T. Nezel, M. Rothmaier, U.E. Spichiger, *J. Mater. Chem.* 9 (1999) 2259-2264.
97. G. J. Mohr, *Chem. Eur. J.* 10 (2004) 1082-1090.
98. D. Citterio, S. Rásonyi, U.E. Spichiger, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354 (1996) 836-840.
99. M. Puyol, S. Miltsov, Í. Salinas, J. Alonso, *Anal. Chem.* 74 (2002) 570-576.
100. H. Hisamoto, H. Tohma, T. Yamada, K. Yamauchi, D. Siswanta, N. Yoshioka, K. Suzuki, *Anal. Chim. Acta* 373 (1998) 271-289.
101. J.R. Premkumar, R. Rosen, S. Belkin. O. Lev, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 11-23.
102. P.B. Luppa, L.J. Sokoll, D.W. Chan, *Clin. Chim. Acta* 314 (2001) 1-26.
103. R. Wang, U. Narang, P.N. Prasad, F.V. Bright, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2671-2675.
104. K.L. Beattie, W.G. Beattie, L. Meng, S.L. Turner, R. Coral-Vazquez, D.D. Smith, P.M. McIntyre, D.D. Dao, *Clin. Chem.* 41 (1995) 700-706.
105. D. Kriz, O. Ramström, K. Mosbach, *Anal. Chem.* 69 (1997) 345A-349A.
106. U.E. Spichiger-Keller, *Sens. Actuators B* 38-39 (1997) 68-77.
107. H. Hisamoto, K. Suzuki, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 513-524.
108. Y. Wang, K. Wang, W. Liu, G. Shen, R. Yu, Analyst 122 (1997) 69-75
109. Y. Wang, W. Liu, K. Wang, G. Shen, R. Yu, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 360 (1998) 702-706.
110. M.I. Albero, J.A. Ortuño, M.S. García, C. Sánchez-Pedreño, R. Expósito, *J. Pharm. Biomed. Analysis* 29 (2002) 779-786.
111. I.M. Steinberg, A. Lobnik, O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* 90 (2003) 230-235.
112. Y.Yang, X. Yang, C. Jiao, H. Yang, Z. Liu, G. Shen, R. Yu, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 385-392.
113. L. Gao, C.J. Seliskar, L. Milstein, *Appl. Spectroscopy* 51 (1997) 1745-1752.
114. W. Liu, Y. Wang, J. Tang, G. Shen, R. Yu, *Analyst* 123 (1998) 365-369.
115. Z. Liu, F. Luo, T. Chen, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 147-153.
116. O.S. Wolfbeis, N.V. Rodriguez, T. Werner, *Mikrochim. Acta* 108 (1992) 133-141.
117. T. Mayr, I. Klimant, O.S. Wolfbeis, T. Werner, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 1-10.
118. A.A. Ensafi, A. Aboutalebi, *Sens. Actuators B* 105 (2005) 479-483.
119. N.A. Yusof, M. Ahmad, *Sens. Actuators B* 86 (2002) 127-133.
120. N.A. Yusof, M. Ahmad, *Talanta* 58 (2002) 459-466.
121. O.S. Wolfbeis, M. Schäferling, A. Dürkop, *Microchim. Acta* 143 (2003) 221-227.
122. J.E. Madden, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, L.W. Deady, *Anal. Chim. Acta* 319 (1996) 129-134.
123. I.M. Raimundo Jr., R. Narayanaswamy, *Sens. Actuators B* 74 (2001) 60-68.
124. L. Coo, C.J. Belmonte, *Talanta* 58 (2002) 1063-1069.

125. T.J. Sands, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, J.R. Farrell, P.J. Iles, S. D. Kolev, *Sens. Actuators B* 85 (2002) 33-41.

126. L. Coo, I.S. Martinez, *Talanta* 64 (2004) 1317-1322.

127. Z. Lin, Y. Su, Y. Duan, *Sens. Actuators B* 72 (2001) 75-79.

128. P.T. Sotomayor, I.M. Raimundo Jr., A.J.G. Zarbin, J.J.R. Rohwedder, G. O. Neto, O.L. Alves, *Sens. Actuators B* 74 (2001) 157-162.

129. Y. Abreu, S. Marcos, J.R. Castillo, J. Galbán, *Talanta* 65 (2005) 1045-1051.

130. O.S. Wolfbeis, H.E. Posch, H.W. Kroneis, *Anal. Chem.* 57 (1998) 2556-2561.

131. M.P. Xavier, B. Vallejo, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, F. Baldini, A. Falai, *Biosens. Bioelectron.* 14 (2000) 895-905.

132. B.D. MacCraith, C.M. McDonagh, G. O'Keefe, A.K. McEvoy, T. Butler, F.R. Sheridan, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 51-57.

133. J. Lin, C.W. Brown, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 200-211.

134. M.E. Tess, J.A. Cox, *J. Pharm. Biomed. Analysis* 19 (1999) 55-68.

135. J. L. Meinershagen, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 448-449.

136. P.K. Dutta, Y. Kim, *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7 (2003) 483-490.

137. T. Lenarczuk, S. Glab, R. Koncki, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 163-169.

138. S.A. Piletsky, S. Alcock, A.P.F. Turner, *TIBTECH* 19 (2001) 9-12.

139. D.K. Eggers, J.S. Valentine, *Protein Sci.* 10 (2001) 250-261.

140. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1674-1679.

141. A.K. Singh, A.W. Flounders, J.V. Volponi, C.S. Ashley, K. Wally, J.S. Schoeniger, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 703-713.

142. O.S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3269-3284.

143. S.M. Klainer, J.R. Thomas, J.C. Francis, *Sens. Actuators B* 11 (1993) 81-86.

144. K.R. Rogers, E.J. Poziomek, *Chemosphere* 33 (1996) 1151-1174.

145. P.K. Choudhury, *Current Science* 74 (1998) 723-725.

146. S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, M.P. Marco, D. Barceló, *Talanta* 65 (2005) 291-297.

147. J. Tschmelak, G. Proll, G. Gauglitz, *Talanta* 65 (2005) 313-323.

148. S. de Marcos, J. Galindo, J.F. Sierra, J. Galbán, J.R. Castillo, *Sens. Actuators B* 57 (1999) 227-232.

149. L.F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo, C. Berenguer, M.D. Fernández-Ramos, R. Avidad, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 369 (2001) 139-144.

150. L. Zhu, X. Li, G. Zhu, *Sens. Actuators B* 86 (2002) 209-214.

151. L.S. Ferreira, M.B. De Souza Jr., J.O. Trierweiler, O. Broxtermann, R.O.M. Folly, B. Hitzmann, *Comp. Chem. Eng.* 27 (2003) 1165-1173.

152. U.E. Spichiger, D. Freiner, E. Bakker, T. Rosatzin, W. Simon, *Sens. Actuators B* 11 (1993) 263-271.

153. R.I. Stefan, J.F. van Staden, H.Y. Aboul-Enein, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366 (2000) 659-668.

154. P.R. Coulet, L.J. Blum, S.M. Gautier, *J. Pharm. Biomed. Analysis* 7 (1989) 1361-1376.

155. B. Zhu, X. Zhang, J. Chen, *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 311-315.

156. M. Mascini, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 121-125.

157. C. Müller, B. Hitzmann, F. Schubert, T. Scheper, *Sens. Actuators B* 40 (1997) 71-77.

158. J. Keirsse, C. Boussard-Plédel, O. Loréal, O. Sire, B. Bureau, P. Leroyer, B. Turlin, J. Lucas, *Vibrational Spectroscopy* 32 (2003) 23-32.

159. D. Meadows, *Adv. Drug Delivery Reviews* 21 (1996) 179-189.

160. P.J. Gemperline, J. Cho, B. Baker, B. Batchelor, D.S. Walker, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 155.

161. S.P. Jacobsson, M. Carlsson, U. Jonsson, G. Nilsson, *J. Pharm. Biomed. Analysis* 13 (1995) 419-423.

162. J. Rantanen, E. Räsänen, J. Tenhunen, M. Känsäkoski, J.P. Mannermaa, J. Yliruusi, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 271-276.

163. R. Koccki, T. Lenarczuk, S. Glab, *Anal. Chim. Acta* 379 (1999) 69-74.

164. D.T. Newcombe, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, S.D. Kolev, *Lab. Rob. Automation* 12 (2000) 200-204.

165. A. Ruiz-Medina, M.L.F. Córdova, M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz, *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 131-139.

166. A.M. Pimenta, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, C. Pasquini, J.J.R. Rohwedder, I.M. Raimundo Jr., *J. Pharm. Biomed. Analysis* 36 (2004) 49-55.

167. T. Lenarczuk, D. Wencel, S. Glab, R. Koncki, *Anal. Chim. Acta* 447 (2001) 23-32.

168. J.A.B. Howie, P. Hawkins, *Analyst* 118 (1993) 35-40.

169. H. He, G. Uray, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* 246 (1991) 251.

170. H. He, H. Li, G. Uray, O.S. Wolfbeis, *Talanta* 40 (1993) 453-457.

171. J. Polster, G. prestel, M. Wollenweber, G. Kraus, G. Gauglitz, *Talanta* 42 (1995) 2065-2072.

172. B.G. Healey, D.R. Walt, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4471-4476.

173. X. Xie, A.A. Suleiman. G.G. Guilbault, *Biotechnol. Bioeng.* 39 (1992) 1147-1150.

174. Y. Gu, Z. Qian, B. Tao, G. Wang, *Sens. Actuators B* 66 (2000) 197-199.

175. Y. Wang, W. Liu, K. Wang, G. Shen, R. Yu, *Talanta* 47 (1998) 33-42.

176. P.O. Barrales, M.L.F. de Córdova, A.M. Díaz, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 227-233.

177. E.P.C. Lai, A. Fafara, V.A. VanderNoot, M. Kono, B. Polsky, *Can. J. Chem.* 76 (1998) 265-273.

178. M.G. Weller, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 41-43.

Capítulo II

A QUÍMICA SOL-GEL

2.1 INTRODUÇÃO

O vidro possui características únicas para aplicação óptica, como transparência, homogeneidade, resistência mecânica e elevado índice de refracção. No entanto, os métodos convencionais utilizados na sua preparação requerem a fusão dos precursores a temperaturas elevadíssimas, seguida de arrefecimento rápido e subsequente vitrificação do material. Este procedimento restringe a escolha de moléculas que podem ser imobilizadas; apenas os óxidos metálicos e alguns sais inorgânicos resistem a condições tão drásticas sem sofrerem decomposição térmica. Além disso, o processo típico de preparação do vidro torna extremamente difícil a obtenção de filmes finos. Neste contexto, a tecnologia sol-gel constitui uma alternativa versátil para a produção de materiais cerâmicos e vítreos à temperatura ambiente e com características melhoradas em relação aos processos convencionais [1,2]. Permite o controlo preciso das condições de síntese e a obtenção de materiais com elevada pureza, homogeneidade e propriedades microestruturais. Uma vez que o processo tem início a partir de precursores em solução aquosa, é possível imobilizar substâncias de natureza variada, mesmo tão frágeis como as proteínas. Outra característica atractiva desta tecnologia é o facto de permitir obter materiais com formas diversas, que uma vez activados por imobilização, impregnação ou ligação covalente, originam materiais que podem ser utilizados como sensores, catalisadores, materiais médicos, revestimentos activos e passivos, ou materiais ópticos vários.

O processo em si é conhecido há mais de um século, no entanto estes materiais só ganharam importância acrescida nas últimas décadas. O interesse pelo processo sol-gel para produção de vidros e materiais cerâmicos teve início no século XIX. Ebelmen preparou os primeiros alcóxidos metálicos em 1846, utilizando $SiCl_4$ e álcool, e observou que, após exposição atmosférica, estes químicos formavam um gel; esta foi a primeira forma do processo sol-gel tal como é conhecido hoje [2,3]. Estes materiais mantiveram-se com interesse meramente químico durante quase um século, uma vez que requeriam longos períodos de secagem, por vezes superiores a um ano, para evitar que os geles de sílica formassem pós. Só nos anos 1930 foi reconhecido o interesse tecnológico dos materiais sol-gel, quando Geffcken e Bergen, da companhia vidreira alemã Schott, desenvolveram um processo em escala industrial para produzir camadas delgadas de óxidos metálicos com propriedades ópticas. Surgiram assim as bases da deposição de filmes por imersão, ou *dip-coating*, que esteve na origem da primeira patente baseada no

processo sol-gel, concedida em 1939 [4]. Os primeiros espelhos retrovisores para a indústria automóvel, fabricados segundo técnicas de obtenção de filmes delgados sol-gel, apareceram no mercado em 1953. Em 1959 teve início a sua produção em larga escala, seguidos de revestimentos anti-reflexo em 1964 e revestimentos com aplicações na arquitectura em 1969 [5,6]. No final da década de 1960 e início de 1970, o processo sol-gel começou a despertar maior curiosidade, graças ao crescente interesse da indústria cerâmica. Tradicionalmente, vidros e cerâmicas eram preparados por aquecimento da mistura de vários óxidos metálicos, nitratos e outros compostos a temperaturas muito elevadas (1300-2000ºC). O processo a baixas temperaturas conduziu a variadíssimas aplicações e a materiais com características singulares; a reacção controlada mediante o processo sol-gel para a formação de vidros multicomponentes foi desenvolvida nesta altura, de forma independente, por Dislich [7] e por Levene e Thomas [8].

Actualmente, a química sol-gel constitui uma das áreas da química contemporânea com crescimento mais rápido. O processo sintético sol-gel é hoje reconhecido e utilizado em laboratórios e indústrias em todo o mundo, com aplicações tão diversas como sensores, membranas inorgânicas, filmes supercondutores, revestimentos ópticos e protectores, entre outros, tendo o número de patentes nesta área quase triplicado nos últimos quinze anos [9,10]. Além dos inúmeros artigos de revisão [9,11-14], livros publicados [2,3,15], e de uma revista científica exclusivamente dedicada à divulgação dos avanços nesta área, o *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, têm-lhe sido dedicadas várias conferências nos últimos anos e foi fundada, em Agosto de 2003, a Sociedade Internacional de Sol-Gel. No entanto, apesar da recente expansão e do potencial que apresenta, a implementação desta tecnologia à escala industrial e as suas aplicações comerciais são ainda relativamente limitadas. Após anos de investigação dedicados à compreensão e ao controlo dos processos envolvidos, o investimento em aplicações concretas voltadas para a comercialização, nomeadamente nos campos em que a química sol-gel apresenta vantagens inequívocas sobre outros materiais, poderá reverter esta tendência.

2.2
O Processo Sintético Sol-Gel

O termo *sol-gel* é usado para descrever uma ampla classe de processos de natureza físico-química que levam à formação de sólidos amorfos a partir de soluções de moléculas precursoras, passando pelos estados de sol e de gel. Um *sol* é uma suspensão coloidal de partículas sólidas num líquido; um *gel* é uma rede sólida rígida, porosa e interconectada que inclui uma fase líquida contínua. O processo típico envolve as reacções de hidrólise e condensação de um precursor alcóxido metálico para formar um sol, seguida de gelificação, através de reacções de policondensação, das estruturas químicas previamente formadas. O gel obtido é submetido a secagem e pode ainda ser densificado a temperaturas elevadas para formar um vidro não-poroso. As condições reaccionais são suaves, e exceptuando os casos em que é necessária uma etapa de densificação, a síntese de materiais sol-gel realiza-se a baixas temperaturas, evitando assim a decomposição térmica das espécies imobilizadas e permitindo grande pureza estequeométrica. A tecnologia sol-gel é extremamente versátil porque permite manipular de forma simples a textura, estrutura, configuração, composição e até as características químicas das matrizes obtidas. O processo permite a produção de vidros com variadas formas e configurações geométricas: filmes, pós, monolitos, placas, fibras, etc. (Fig. 2.1).

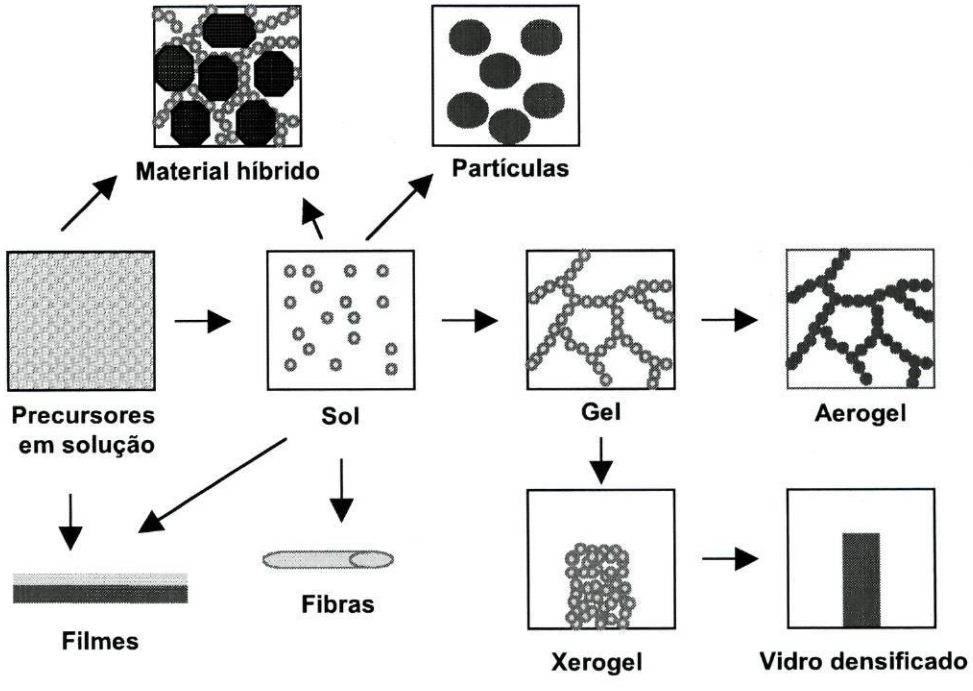


Figura 2.1. Esquema geral do processo sol-gel e das diferentes vias possíveis.

2.2.1. Etapas do processo sol-gel

A preparação de materiais rígidos pela técnica sol-gel tem início com a obtenção de uma solução de todos os componentes envolvidos; a mistura bem sucedida dos reagentes implica uma considerável homogeneidade da solução a nível molecular, que se for retida na subsequente conversão em óxidos origina também produtos altamente homogéneos. Podem ser utilizados vários tipos de materiais precursores, sendo que todos eles devem ser solúveis em solventes orgânicos e facilmente conversíveis no óxido correspondente, preferivelmente por hidrólise, ou alternativamente por reacção química ou decomposição oxidativa [6]. Habitualmente, recorre-se a sais metálicos ou espécies orgânicas (alcóxidos metálicos) como matérias-primas.

Os sais metálicos usados no processo sol-gel têm fórmula geral M_mX_n, em que M é o metal, X é um grupo aniónico e *m* e *n* são os coeficientes estequeométricos [2]. Estes sais constituem uma alternativa conveniente ao uso de espécies organometálicas dos elementos dos grupos I e II, cujos alcóxidos são sólidos, não-voláteis, muitas vezes pouco solúveis e difíceis de obter na forma pura [6]. Utilizam-se vulgarmente sais de nitrato e de ácidos orgânicos, em particular acetatos, formatos, citratos ou tartaratos. Quando em solução aquosa, os catiões metálicos são solvatados pelas moléculas de água. Dependendo das transferências de carga parcial entre o metal e a água, é estabelecido um equilíbrio entre três tipos de ligandos presentes: aquo, M-(OH_2), hidroxo, M-OH, e oxo, M=O. Aumentando o pH, os ligandos aquo são convertidos em hidroxo ou oxo, num processo designado como hidrólise. Pela alteração da concentração do sal, do pH ou da temperatura da solução obtêm-se precipitados, soles estáveis ou geles. A *via sol-gel inorgânica*, ou método não-alcóxido, não será objecto de discussão detalhada nesta dissertação. No entanto, pode acrescentar-se que constitui um método económico, quer em termos de equipamento quer de reagentes, que possibilita a obtenção, a baixas temperaturas, de micro ou nano cristais de formas e fases variadas. Por outro lado, apresenta várias desvantagens quanto ao seu uso mais genérico. A química dos iões metálicos de transição, em solução aquosa, é geralmente bastante complexa, devido à formação de um grande número de espécies oligoméricas, dependendo do estado de oxidação, do pH ou da concentração. O efeito do anião, que determina a microestrutura e a morfologia dos precipitados ou geles obtidos, coordenando os iões metálicos e consequentemente influenciando as vias de hidrólise e condensação, é por vezes impossível de prever; também a remoção destes aniões do produto final pode constituir um problema. Finalmente, este processo restringe-se a

sistemas monometálicos, já que é bastante difícil obter homogeneidade satisfatória em sistemas multimetálicos.

O processo sol-gel por *via orgânica* recorre a alcóxidos metálicos e é o mais utilizado, uma vez que permite obter materiais com grande homogeneidade e pureza. Os produtos finais são materiais de elevada porosidade, com larga distribuição de tamanho de poro e superfícies com áreas de várias centenas de metros quadrados por grama. A sequência de processos desde o precursor até ao xerogel ou ao vidro densificado engloba uma série de etapas sequenciais [2,11], esquematizadas na Fig. 2.2.

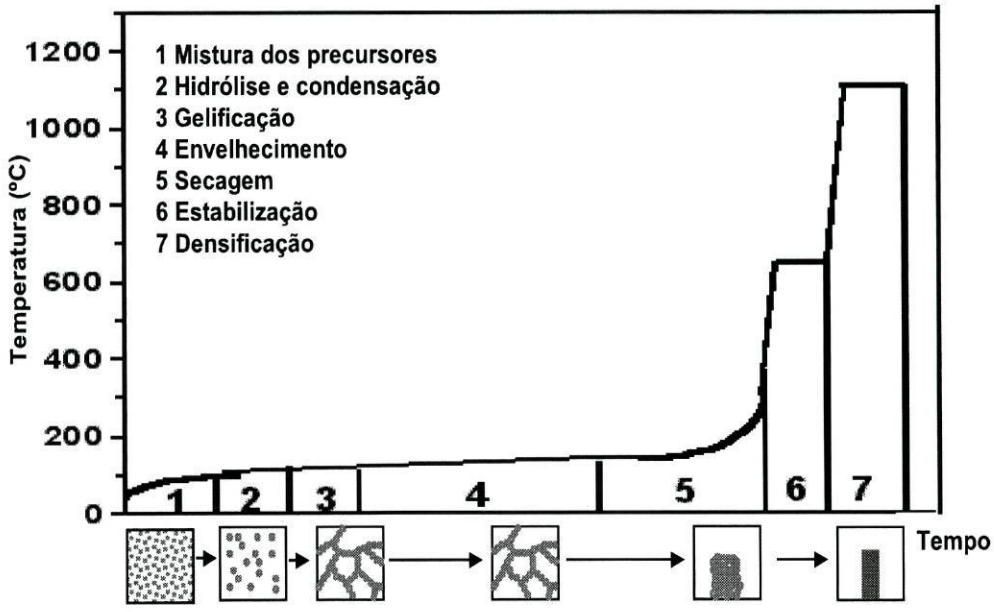


Figura 2.2. Etapas do processo sol-gel.

HIDRÓLISE E CONDENSAÇÃO

A grande maioria dos materiais sol-gel obtidos por via orgânica são sintetizados por hidrólise e condensação de precursores monoméricos tetrafuncionais de baixo peso molecular, os alcóxidos metálicos, utilizando um ácido mineral ou uma base como catalisador. Como a água e os alcoxisilanos são imiscíveis, é adicionado um solvente comum (geralmente um álcool), que funciona como agente homogeneizador. No entanto, é possível preparar geles a partir de misturas alcóxido-água sem adição de co-solvente, uma vez que o álcool gerado na própria reacção de hidrólise pode, em alguns casos, ser suficiente para garantir a homogeneização do sistema de duas fases inicial. O processo pode ser representado pela seguinte reacção global, utilizando um alcóxido de silício como exemplo:

$$Si(OR)_4 + (4\text{-}x)H_2O \rightarrow SiOx(OH)_{4-2x} + 4ROH$$

em que R é um grupo alquilo, e é geralmente descrito com base em três reacções:

(1) Hidrólise	$Si(OR)_4 + nH_2O \rightarrow Si(OR)_{4-n}(OH)_n + nROH$
(2) Condensação silanol-silanol	$(OR)_3SiOH + HOSi(OR)_3' \rightarrow (OR)_3Si\text{-}O\text{-}Si(OR)_3' + H_2O$
(3) Condensação silanol-éster	$(OR)_3SiOH + Si(OR)_4 \rightarrow (OR)_3Si\text{-}O\text{-}Si(OR)_3' + ROH$

Na primeira etapa (eq. 1) dá-se a hidrólise do alcóxido: os grupos OR são substituídos por grupos hidroxilo (OH) e é libertado o álcool (ROH). De seguida, os grupos silanol polimerizam por condensação (silanol-silanol e silanol-éster), formando estruturas tridimensionais unidas por ligações siloxano (Si-O-Si) e libertando água (eq. 2) ou álcool (eq. 3). Nesta fase obtém-se um sol, ou seja, uma suspensão de aspecto similar a uma solução, em que os polímeros têm dimensões coloidais.

A sequência reaccional é consideravelmente mais complexa do que a representação das equações 1, 2 e 3 pressupõe. As reacções de condensação têm geralmente início ainda antes de a hidrólise terminar; dependendo das condições, uma ou todas estas reacções consecutivas podem não ser completas, deixando grupos alcoxi ou hidroxilo por reagir. As variáveis de maior importância são o pH, a quantidade de água, a natureza e concentração do catalisador. Também a temperatura e a natureza do solvente produzem efeitos, embora em menor escala [11,16-18]. A cinética das reacções de hidrólise e condensação, que determina a estrutura final do gel, é igualmente influenciada por vários factores que serão discutidos em detalhe de seguida.

GELIFICAÇÃO

À medida que as reacções de hidrólise e condensação evoluem, os monómeros reagem entre si de forma irreversível através dos seus grupos terminais, formando macropartículas e agregados de tamanho e complexidade crescente. Estes colidem e interligam-se para formarem cadeias e redes que se estendem através do meio líquido, formando-se um agregado de dimensões macroscópicas, o gel. O ponto ou tempo de gelificação, t_{gel}, corresponde ao momento da reacção em que um número crítico de monómeros interligados é excedido e a massa total sólida se encontra interligada [19]. A transição de sol para gel é irreversível, e o líquido passa a um sistema de duas fases: o gel final é constituído por partículas amorfas de dimensões variáveis, com uma fase de líquido intersticial.

O processo tem início com a formação de agregados ou estruturas fractais, que crescem e se ligam entre si, de acordo com a *teoria da percolação* (modelo matemático de propagação em meios aleatórios) [2,11,19,20]. As ligações que contribuem para a formação do gel estabelecem-se de forma aleatória entre agregados próximos quase estacionários (polímeros ou agregados de polímeros), formando-se uma rede. O ponto de gelificação corresponde à transição de percolação: um único agregado (o gel), incapaz de expansão adicional, coexiste com a fase do sol contendo, eventualmente, alguns agregados mais pequenos. A gelificação pode ocorrer após o sol ser depositado num molde, tornando assim possível a obtenção de objectos com formas determinadas. Se o gel final tem dimensões superiores a alguns milímetros é designado por monolito; alternativamente, a gelificação pode ocorrer por evaporação rápida do solvente, como acontece na preparação de filmes finos ou fibras. Portanto, a estrutura final do gel é definida na etapa de gelificação, e os processos subsequentes, como envelhecimento, secagem, estabilização ou densificação, vão ser condicionados pela estrutura do gel formado nesta etapa.

A gelificação é caracterizada por uma alteração dramática nas características reológicas do material, cuja avaliação é frequentemente usada para identificar o ponto de gelificação [19,21,22]. Gradualmente, à medida que as reacções de hidrólise e condensação prosseguem e se dá o crescimento dos polímeros, o gel adquire propriedades elásticas e a viscosidade aumenta. No entanto, estas propriedades apresentam grandes variações em função das condições de preparação do sol-gel, pelo que os valores obtidos são muitas vezes incorrectos ou apenas aproximados, traduzindo-se em valores de t_{gel} meramente empíricos ou qualitativos. Além disso, o ponto de gelificação não é uma propriedade intrínseca do sol e depende do tamanho e da forma do recipiente em que a reacção é conduzida [11,23].

ENVELHECIMENTO DO GEL

Na realidade, as reacções envolvidas na formação do gel não terminam imediatamente após o ponto de gelificação, conforme anteriormente referido. Nesta fase existem ainda oligómeros livres para se difundirem e reagirem, e a rede sólida contém ainda a fase líquida contínua que permite um transporte rápido de moléculas no seu interior; portanto, o gel retém mobilidade interna suficiente para permitir a progressão mais lenta dos processos físico-químicos de agregação, pelo que as suas propriedades continuam a sofrer alterações após a gelificação. Este processo é conhecido como envelhecimento do gel, e resulta em modificações estruturais ao longo do tempo, em função da temperatura, do solvente e das condições de pH, que podem ser categorizadas em três tipos: polimerização, crescimento de partículas e transformação de fases [2,24].

A *polimerização* deve-se ao prosseguimento das reacções de condensação no gel durante longos períodos após a gelificação, já que os grupos terminais livres (OH e OR) podem entrar em contacto nas zonas de maior densidade polimérica, e resulta num aumento da conectividade da rede devido à promoção de algumas ligações cruzadas adicionais. Como consequência, ocorre retracção de volume da rede polimérica e expulsão de líquido dos poros; este processo é conhecido por *sinérese* ou *macrosinérese*.

O *crescimento de partículas* consiste num processo de maturação por redissolução e precipitação, conduzido por diferenças de solubilidade entre superfícies com diferentes raios de curvatura (Fig. 2.3). Partículas com curvatura positiva dissolvem-se mais prontamente do que superfícies com curvatura negativa; também quanto menor for a partícula, maior é a sua solubilidade. Assim, as partículas pequenas tendem a redissolver-se e a precipitar sobre as partículas maiores. Por outro lado, as fendas e interstícios entre as partículas têm raios negativos e, logo, baixa solubilidade, o que leva à acumulação de material.

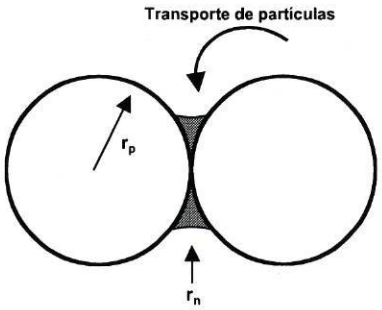


Figura 2.3. Formação de raios de curvatura positivos e negativos. O raio do espaço intersticial, r_n, é negativo porque o centro da curvatura se encontra fora da fase sólida: o raio da partícula, r_p, é positivo. O colo que se forma por deposição das partículas fortalece o gel [2].

Como resultado do processo de redissolução-precipitação, a curvatura da fase sólida é reduzida: as partículas pequenas desaparecem e os poros menores são preenchidos, diminuindo a área interfacial e aumentando o tamanho médio de poro. Formam-se colos entre as partículas e aumenta a resistência e rigidez do gel. Factores que favoreçam a taxa de solubilidade, como o aumento da temperatura e/ou do pH, terão como consequência o aumento do volume dos poros e a perda da microporosidade.

Durante o processo de envelhecimento ocorrem ainda vários tipos de *transformação de fase*, como a separação do gel em zonas de densidade polimérica alta e baixa, a criação de interfaces sólido/líquido e ainda fenómenos de cristalização. A *microsinérese* é um processo de separação de fases em que a fase líquida se separa da sólida numa escala localizada, devido ao facto de os polímeros terem maior afinidade entre si do que para com o líquido presente nos poros.

As mudanças estruturais que ocorrem durante a etapa de envelhecimento do gel têm um efeito muito importante no processo de secagem. A pressão capilar desenvolvida durante a secagem é proporcional à área interfacial do gel; se esta for reduzida por crescimento de partículas, a pressão máxima gerada durante a secagem será inferior. Por outro lado, quanto mais rígido e forte for o gel, melhor suportará a pressão capilar, e portanto um gel envelhecido apresenta menos tendência para a fractura e menor redução de volume durante a secagem [25].

SECAGEM

O processo de secagem envolve a remoção da fase líquida do gel, constituída pelo co-solvente e pelos sub-produtos de baixo peso molecular originados pelas reacções de hidrólise e condensação (água e álcool), e pode ser dividido em quatro etapas sucessivas, esquematizadas na Fig. 2.4.

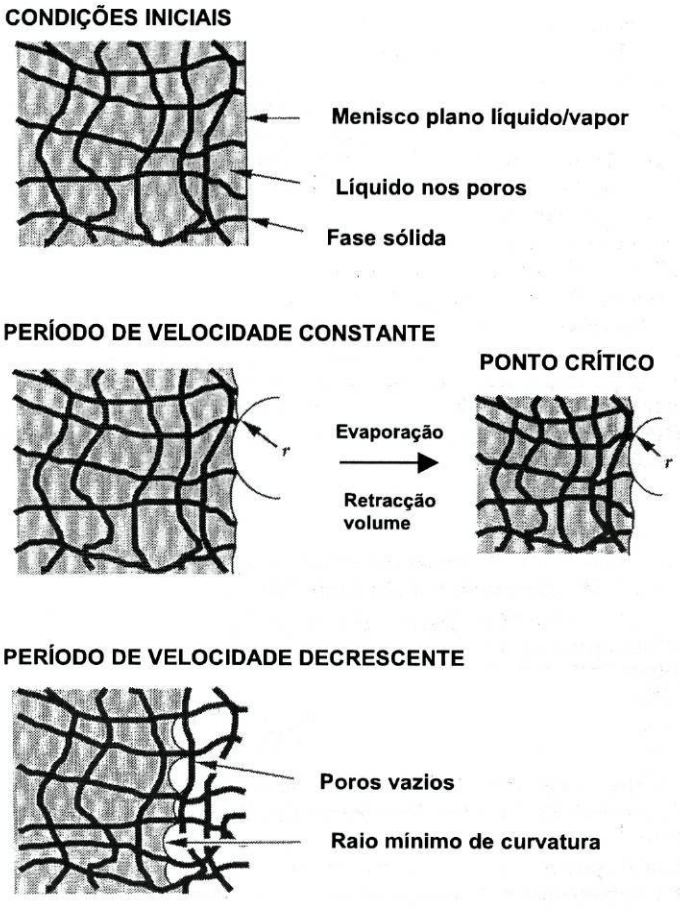


Figura 2.4. Etapas da secagem [2,24].

Na primeira fase, designada por *período de velocidade constante*, dá-se uma redução de volume do gel equivalente ao volume de líquido perdido por evaporação, e a interface líquido-vapor permanece na superfície exterior do material. O volume reduzido de líquido expande-se de forma a cobrir a superfície sólida e evitar a criação de interfaces sólido-vapor de maior energia; esta tensão exercida no líquido é suportada

pela rede do gel, provocando a sua contracção [26]. A compressão da rede promove condensações adicionais, uma vez que os hidroxilos terminais reactivos se aproximam. Eventualmente, a rede em contracção torna-se suficientemente rígida, resistindo à maior compactação. Nesta fase, denominada *ponto crítico*, a redução de volume cessa e a tensão capilar é maximizada (Fig. 2.4). Qualquer evaporação posterior de líquido leva ao retrocesso do menisco em direcção ao interior do gel. Inicia-se assim a terceira etapa, ou *primeiro período de velocidade decrescente*, em que o líquido se move através dos poros parcialmente vazios. À medida que o ar invade os poros, um filme contínuo de líquido suporta o fluxo para o exterior, de modo que a evaporação continua a ocorrer a partir da superfície do gel. Finalmente, o líquido restante fica isolado em cavidades e a secagem dá-se apenas por evaporação do líquido dentro do sólido e difusão do vapor para o exterior; esta é a etapa final da secagem, ou *segundo período de velocidade decrescente.*

A eliminação do solvente no gel à temperatura ambiente resulta na formação de um material vítreo chamado *xerogel*, ou *alcogel* se o líquido contido nos poros for maioritariamente álcool. Na prática, o termo xerogel é aplicado a qualquer gel que sofre secagem durante vários dias, mesmo a baixas temperaturas; contudo, quando a secagem e o envelhecimento são efectuados à temperatura ambiente, os sólidos podem conter percentagens variadas de solvente residual. Os geles obtidos por este processo apresentam uma grande retracção de volume (de 2 a 10 vezes), resultante da formação de ligações ou da contracção induzida pela atracção entre partículas, assim como da evaporação do líquido dos poros; exibem tipicamente uma área de superfície muito elevada (> 400 $m^2 g^{-1}$) e um diâmetro médio dos poros muito pequeno (< 10 nm) [2].

A redução de volume da rede sólida no ponto crítico da secagem determina o volume e o tamanho final dos poros, assim como a área de superfície do xerogel [26,27]. Logo, a porosidade destes materiais pode ser definida mediante o controlo da extensão da contracção durante a secagem; esta depende do balanço entre a magnitude da pressão capilar, responsável pelo colapso do gel, e a rigidez da matriz, que lhe confere resistência ao colapso. Este balanço, por seu turno, depende da duração do processo de secagem. No caso dos geles monolíticos, os longos percursos do fluxo de evaporação e difusão envolvidos requerem secagem lenta (horas ou dias); nos filmes finos a evaporação sobrepõe-se ao processo de deposição, como será discutido adiante, e em poucos segundos o sol é seco e concentrado de modo a formar um filme sólido extremamente delgado. Também a estabilidade dos filmes sol-gel em soluções aquosas é altamente dependente da duração da secagem e da humidade relativa do ambiente em que o filme é seco [28]. Filmes submetidos a períodos adicionais de secagem extensos, em condições de humidade relativa baixa, exibem estabilidade superior.

O controlo do processo de secagem é também vital para evitar a ocorrência de fracturas. À medida que a secagem prossegue, alguns dos poros maiores são completamente esvaziados, enquanto que os poros mais pequenos continuam preenchidos com solvente. Num capilar cilíndrico de raio r, parcialmente preenchido com um líquido de ângulo de molhabilidade θ, a diferença de pressões na interface líquido/ar é expressa pela equação de Young-Laplace:

$$\Delta P = 2\gamma \cos\theta / r$$

em que γ representa a tensão superficial. Assim, aos diferentes raios dos poros estão associadas diferenças de pressão diversas, susceptíveis de criar gradientes de pressão sobre a malha polimérica. Se estes gradientes excederem localmente a força da rede polimérica do gel, dá-se a fractura [29]. Este mecanismo de tensão superficial é também responsável pela ruptura dos vidros sol-gel após imersão em água. Uma vez que a pressão capilar é inversamente proporcional ao tamanho de poro, a preparação de estruturas com poros de maiores dimensões conduz à diminuição da ocorrência de fracturas. O envelhecimento do gel antes da secagem provoca o fortalecimento da rede polimérica, reduzindo também o risco de fractura [24,25]. A incorporação de surfactantes diminui a tensão superficial e a retracção de volume no ponto crítico, tendo assim um efeito benéfico na permeabilidade do gel e contribuindo para a redução dos gradientes de pressão [2,30]. Têm sido usados para este efeito Triton-X e compostos de amónio quaternário, como o brometo de cetiltrimetilamónio ou o brometo de cetilpiridínio. No entanto, estes compostos podem prejudicar a transparência do xerogel, devido às bandas de absorção características dos compostos de amónio, o que constitui uma desvantagem importante quando se objectivam aplicações ópticas. Outra estratégia muito utilizada para tornar a secagem mais rápida e reduzir a tendência para a fractura é a adição dos chamados agentes químicos para controlo da secagem (*Drying Control Chemical Additives*, DCCA), como a formamida, a dimetilformamida e o ácido oxálico [2,31-34]. Estes actuam modificando a tensão superficial dos líquidos intersticiais, reduzindo assim o valor de ΔP da equação acima referida. Finalmente, o tratamento do gel a altas temperaturas para remoção rápida do líquido dos poros representa uma alternativa viável, desde que não comprometa a estabilidade de agentes de reconhecimento imobilizados na matriz sol-gel [2].

O líquido contido nos poros pode ainda ser eliminado através de um processo de secagem supercrítica. Nestas condições obtém-se uma estrutura altamente porosa e de baixa densidade, sem que haja redução de volume nem colapso dos poros, designada por *aerogel* [35]. Um aerogel pode atingir porosidades da ordem dos 98% e densidades de 80 Kg m^{-3}.

TRATAMENTO A ALTAS TEMPERATURAS E DENSIFICAÇÃO

O gel, depois de seco, contém ainda uma concentração razoável de grupos hidroxilo à superfície dos poros. O tratamento a temperaturas no intervalo 500-800ºC promove a remoção desses grupos, reduzindo o ângulo de contacto e a susceptibilidade do gel a processos de re-hidratação, o que se traduz na obtenção de um sólido ultra-poroso quimicamente estabilizado [36].

O gel pode ainda ser submetido a densificação, a temperaturas superiores (1000ºC), adquirindo as propriedades de um vidro; os poros são eliminados e a densidade final obtida é equivalente à do quartzo ou da sílica fundida [2,37]. Este procedimento é adoptado quando se pretende obter materiais com boa conductividade eléctrica ou estrutura cristalográfica determinada, mas não é indicado para a imobilização de moléculas orgânicas, devido à possibilidade de estas sofrerem decomposição a altas temperaturas.

2.2.2. Factores que influenciam o processo sol-gel

O processo sintético sol-gel permite o controlo rigoroso da homogeneidade e das características estruturais dos materiais obtidos mediante a escolha criteriosa das condições da reacção. Factores como o tipo de precursor, o pH, a natureza e concentração dos catalisadores, a razão molar H_2O:Si, o tipo de co-solvente, a temperatura, o método e extensão da secagem, a presença de dopantes e até a natureza química da superfície do recipiente onde se dá a reacção, influenciam de forma marcada características como a porosidade, a área de superfície, o índice de refracção, a espessura e as propriedades mecânicas. Assim, uma completa compreensão de todos os processos químicos envolvidos torna possível alcançar os materiais desejados, pela simples modificação do protocolo de polimerização.

As variáveis envolvidas no processo estão interligadas, pelo que se torna quase impossível discuti-las isoladamente. Ainda assim, nos pontos que se seguem procurou-se esquematizar, de forma o mais lógica e clara possível, os factores considerados mais importantes no processo sol-gel, e é discutida a sua influência nas reacções de hidrólise e condensação e no processo de gelificação.

2.2.2.1. Tipo de precursor

Os precursores mais utilizados no processo sol-gel são os alcóxidos metálicos, que possuem grupos orgânicos ligados a átomos de metais. A sua estrutura pode ser representada por $M(OR)_Z$, em que M é um metal ou semi-metal (como Si, Ti, Vn, Zr, Al ou B), R é um grupo alquilo C_xH_{2x+1} e Z representa a valência do estado de oxidação do metal. Em geral, os alcóxidos metálicos reagem prontamente com a água, sendo rapidamente hidrolisados e originando o hidróxido ou óxido correspondente. Refira-se que a extraordinária reactividade da maioria dos alcóxidos metálicos pode representar uma limitação, já que os torna extremamente sensíveis à humidade e ao oxigénio, exigindo que sejam manuseados em condições rigorosamente controladas. Os alcóxidos de silício e fósforo constituem no entanto duas excepções a esta regra: os trialquilfosfatos são muito difíceis de hidrolisar, o que exclui o seu uso na preparação de materiais sol-gel, e os alcóxidos de silício apresentam velocidade de hidrólise muito lenta, requerendo geralmente um catalisador ácido ou básico [2,6].

A natureza e a reactividade do metal (M) do alcóxido precursor é um dos factores com mais impacto nas reacções envolvidas no processo sol-gel. O mecanismo de reacção na química sol-gel envolve a formação de um complexo penta-coordenado, segundo um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular S_N2 envolvendo 4 grupos ligados a um átomo central [2]. A facilidade com que o complexo penta-coordenado se forma depende das condições reaccionais, mas sobretudo da natureza química do átomo central. Na Tabela 2.1 são listados alguns alcóxidos metálicos usados no processo sol-gel e as respectivas electronegatividades, números de coordenação e graus de insaturação. A sequência de reactividade dos alcóxidos metálicos pode ser expressa como: $Zr(OR)_4$, $Al(OR)_3$ > $Ti(OR)_4$ > $Sn(OR)_4$ >> $Si(OR)_4$ [38].

Tabela 2.1. Electronegatividade (χ), número de coordenação (N) e grau de insaturação (N-Z) de alguns alcóxidos metálicos [39].

Alcóxido	χ	N	N-Z
$Si(OR)_4$	1.90	4	0
$Sn(OR)_4$	1.96	6	2
$Al(OR)_4$	1.61	6	3
$Ti(OR)_4$	1.54	6	2
$Zr(OR)_4$	1.33	7	3

Apesar de os alcóxidos de alumínio, vanádio e titânio serem bastante referidos e de a sua química estar bem caracterizada [40,41], os precursores mais frequentemente utilizados são os alcóxidos de silício [2,6]. Estes são líquidos e monoméricos, em contraste com os alcóxidos baseados noutros metais de número de coordenação superior a 4, que são geralmente oligoméricos e cuja condensação completa origina óxidos particulados e compactos. O silício tem número de coordenação preferencial 4, e é também substancialmente mais electronegativo, o que o torna menos susceptível ao ataque nucleofílico e, logo, mais estável. Estes factores tornam a cinética da hidrólise e condensação consideravelmente mais lenta e, portanto, fácil de controlar. Os exemplos mais comuns de tetralcoxisilanos usados na química sol-gel são o tetrametoxisilano ou TMOS, $Si(OCH_3)_4$, e o tetraetoxisilano ou TEOS, $Si(OC_2H_5)_4$.

A co-polimerização de TEOS ou TMOS com alcoxisilanos alquil(aril)-substituídos e organofuncionalizados resulta em híbridos orgânicos-inorgânicos, designados por silicatos organicamente modificados (ORMOSILs, *ORganically MOdified SILicates*) [12,39,42,43]. Precursores contendo uma ligação Si-C não hidrolisável, de estrutura geral $R'_{4-x}Si(OR)_x$, em que R representa o reagente ou grupo funcional desejado e x=1-4, são frequentemente adicionados para reduzir a funcionalidade do alcóxido precursor (i.e., o número de locais de formação de ligações Si-O-Si), para conferir carácter orgânico ou ainda para alterar as características da rede polimérica. Os substituintes orgânicos mais utilizados incluem CH_3, C_2H_5, C_6H_5, $(CH_2)_nNH_2$ e $(CH_2)_nSH$, que permanecem incorporados no produto final, uma vez que as ligações Si-C nestas moléculas são estáveis nas condições suaves em que se processa a química sol-gel. A escolha do substituinte orgânico (R') permite controlar características como a hidrofobicidade, porosidade, flexibilidade, reactividade e estabilidade da matriz. Estes sistemas admitem um número quase ilimitado de modificações químicas e estruturais, facilitando assim o desenvolvimento de materiais com características melhoradas para inúmeras aplicações [43-47].

A classe mais simples de híbridos orgânicos-inorgânicos é formada a partir de precursores como os diorganodialcoxisilanos ($R'_2Si(OR)_2$) e os organotrialcoxisilanos ($R'Si(OR)_3$), cujos exemplos mais comuns são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Organoalcoxisilanos mais utilizados como precursores no processo sol-gel.

NOME	FÓRMULA
Metiltrietoxisilano (MTES)	$MeSi(OEt)_3$
Metiltrimetoxisilano (MTMS)	$MeSi(OMe)_3$
Etiltrietoxisilano (ETES)	$EtSi(OEt)_3$
Feniltrietoxisilano (PTES)	$FeSi(OEt)_3$
3-aminopropiltrietoxisilano (APTES)	$H_2N(CH_2)_3Si(OEt)_3$

Os trialcoxisilanos alquil-substituídos, como MTES ou ETES, são muito utilizados como modificadores de matriz, para conferirem propriedades específicas à rede inorgânica. A sua polimerização (isolados ou em associação com um tetra-alcóxido) origina materiais estabilizados e com características hidrofóbicas, uma vez que a sua superfície surge coberta de grupos SiR em vez de SiOH [48]. A presença de um número controlável de grupos terminais CH_3 não hidrolisáveis reduz o grau de polimerização e origina estruturas mais porosas, enquanto que a redução do número de grupos silanol livres na parede dos poros minimiza a ocorrência de condensações adicionais e a contracção de volume após a gelificação [49,50]. Se o grupo orgânico for polimerizável, como um epóxido, é possível formar uma rede orgânica juntamente com a inorgânica, podendo obter-se, por exemplo, estruturas opticamente activas. Os grupos orgânicos introduzidos na matriz podem ainda ser utilizados como molde para obtenção de estruturas com porosidade rigorosamente controlada; a eliminação dos grupos por tratamento a temperaturas acima do seu ponto de fusão deixa na matriz do xerogel cavidades com dimensões similares às da molécula-molde [26,51]. Este processo pode ainda ser utilizado para mimetizar o tamanho e forma de uma molécula-alvo específica, conferindo à matriz especificidade de reconhecimento molecular ou função catalítica.

A estrutura tridimensional da molécula precursora e o carácter doador ou aceitador de electrões dos substituintes orgânicos ligados ao átomo de silício, exercem uma influência marcada sobre a cinética das reacções de hidrólise e condensação. O alongamento da cadeia, e particularmente a ramificação dos ligandos do alcóxido, causa uma diminuição drástica na velocidade da reacção (efeito estérico) [2,52]. Assim, TMOS apresenta velocidade de hidrólise superior a TEOS, uma vez que apresenta grupos alcoxi de cadeia mais curta; pela mesma razão, o ponto de gelificação é também atingido consideravelmente mais depressa do que com outros alcóxidos [53]. Os efeitos indutivos estão relacionados com o facto de o mecanismo de reacção em condições acídicas e

básicas envolver estados de transição de carga positiva e negativa, respectivamente, e são evidentes no mecanismo da hidrólise dos metiletoxisilanos [54]. O grupo metil é um dador de electrões fraco, se comparado com os grupos etoxi que são aceitadores de electrões moderados. No caso do MTES, a substituição de um grupo etoxi por um grupo metil diminui a carga positiva no átomo de Si, aumentando a carga negativa no oxigénio, ou seja, há um aumento do grau de protonação dos átomos de oxigénio que rodeiam o átomo de Si [50]. Assim, em condições acídicas a taxa de hidrólise aumenta com o grau de substituição dos grupos alquil, dadores de electrões, enquanto que em condições básicas se observa a tendência inversa [2,11,55].

2.2.2.2. Efeito do pH

A química dos alcóxidos de silício varia com o pH mas, independentemente deste, a hidrólise ocorre por ataque nucleofílico do oxigénio da molécula de água ao átomo de silício. A taxa de hidrólise aumenta de forma linear com a concentração de protão em meio ácido, e com a concentração de OH^- em meio alcalino [56], de acordo com o perfil esquematizado na Fig. 2.5.

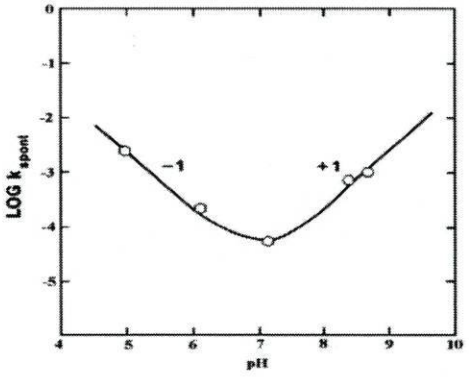


Figura 2.5. Perfil da hidrólise do γ-glicidoxipropiltrialcoxisilano com a variação do pH [2].

Por outro lado, a hidrólise e a condensação não são reacções separadas no tempo, mas ocorrem em simultâneo. A presença de H_3O^+ na solução aumenta a taxa relativa de hidrólise, enquanto que os iões OH^- aumentam a reacção de condensação.

Uma vez que os oligómeros de sílica são ricos em grupos silanol, o pH tem uma grande influência na cinética de aglomeração e na estrutura final do gel. Como já foi

descrito anteriormente, a polimerização com formação de ligações siloxano pode ocorrer por reacção de condensação com produção de álcool ou água. Foi demonstrado que a sequência típica dos produtos da condensação é a seguinte: monómero, dímero, trímero linear, trímero cíclico, tetrâmero cíclico e outros anéis de ordens superiores [2,11]. Esta sequência de condensação requer abertura de anel e disponibilidade dos monómeros que se encontram em solução, em equilíbrio com as espécies oligoméricas. A extensão das polimerizações por abertura de anel e das reacções de adição de monómeros depende do pH e está relacionada com a taxa de dissolução [56], de acordo com a Fig. 2.6. O processo de polimerização pode assim ser dividido em três domínios de pH: pH < 2, pH 2-7 e pH > 7 [2]. O valor de pH 2 surge como limite inferior porque a carga se anula e, devido ao ponto isoeléctrico, a mobilidade das partículas também é reduzida. O valor de pH 7 é referido como limite superior porque a solubilidade é máxima acima deste pH, e também porque as partículas de sílica se apresentam consideravelmente ionizadas, de forma que o crescimento de partículas poderá ocorrer mesmo sem gelificação, para valores de pH muito elevados.

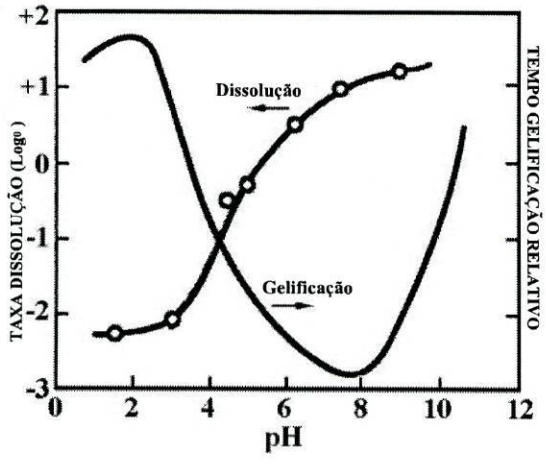


Figura 2.6. Influência do pH na taxa de dissolução e no tempo de gelificação [2].

Abaixo de pH 2, a extensão das reacções de condensação é proporcional à concentração de $[H^+]$. Uma vez que a solubilidade da sílica é bastante reduzida, a agregação de partículas primárias ocorre em simultâneo, de modo indistinto com a polimerização. Pelo mesmo facto, a maturação da rede polimérica contribui muito pouco para o crescimento das partículas acima dos 2 nm de diâmetro [2].

Para valores de pH compreendidos entre 2 e 6, é aceite que a extensão da condensação é proporcional à concentração de OH^-. A condensação ocorre preferencialmente entre espécies mais condensadas, de características mais acídicas. Isto sugere que a dimerização é um processo lento mas, contudo, assim que os dímeros se formam, estes reagem mais rapidamente com os monómeros para formar trímeros, que por sua vez reagem com os monómeros para formar tetrâmeros. A ciclização ocorre devido à substancial depleção da população de monómeros e ao maior afastamento espacial dos locais carregados, devido à desprotonação. O crescimento adicional ocorre por adição de espécies de peso molecular mais baixo a espécies mais altamente condensadas, e por agregação das espécies condensadas para formar cadeias e redes. Dado que a solubilidade da sílica neste intervalo de pH é ainda baixa, o crescimento cessa quando as partículas atingem 2-4 nm de diâmetro.

Acima de pH 7, a polimerização ocorre da mesma forma que no intervalo 2-6. Assim, na fase inicial, de poucos minutos, o crescimento ocorre preferencialmente por adição de monómeros às partículas condensadas. No entanto, devido à maior solubilidade das partículas de sílica que se apresentam carregadas, estas crescem relativamente mais em dimensão e decrescem em número, à medida que as pequenas partículas mais solúveis se redissolvem e se precipitam sobre as partículas maiores, menos solúveis. O crescimento pára quando a diferença de solubilidade entre as partículas maiores e as menores deixa de se distinguir. Este processo é designado *maturação de Ostwald*. O tamanho das partículas é dependente sobretudo da temperatura, sendo que altas temperaturas produzem partículas maiores, e a taxa de crescimento depende da distribuição do tamanho das partículas [2]. Na Fig. 2.7 apresentam-se de modo esquemático as estruturas que se formam em diferentes condições de pH.

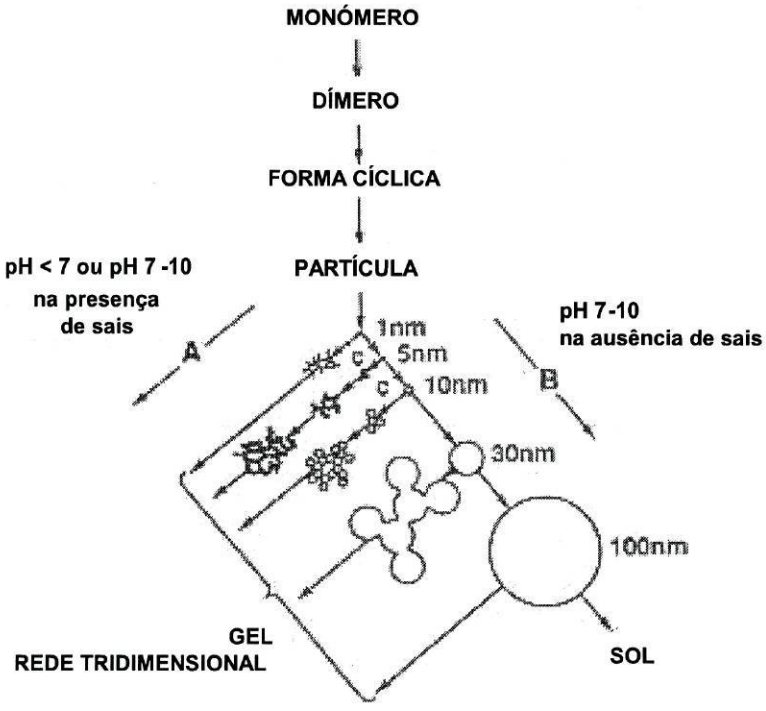


Figura 2.7. Sequência de polimerização da sílica em solução aquosa. Em soluções alcalinas (B) as partículas crescem em tamanho e decrescem em número; em soluções ácidas ou na presença de sais (A) as partículas agregam-se em redes tridimensionais, formando o gel [2].

De uma forma geral, o tempo de gelificação é reduzido por factores que aumentam a taxa de condensação. A influência do pH na gelificação pode ser descrita por um gráfico pH vs. t_{gel} de forma sinusoidal (Fig. 2.6), ou seja, a gelificação pode ser quase instantânea para valores muito acídicos ou próximos da neutralidade. O valor de pH 2 representa uma região metastável, em que os tempos de gelificação são muito elevados. Entre pH 2 e 6, t_{gel} decresce de forma constante, voltando a aumentar a partir de pH 7. Em condições mais alcalinas a condensação prossegue sem que ocorra gelificação; as partículas atingem um tamanho crítico e inibem a gelificação, devido a efeitos de repulsão mútua.

2.2.2.3. Natureza e concentração do catalisador

A hidrólise pode ocorrer sem adição de catalisadores, mas é mais rápida e completa quando estes são utilizados. Os catalisadores minerais, como o HCl, e a amónia são os mais usados, mas também se podem utilizar ácido acético, KOH, aminas, KF e HF. A

extensão da reacção de hidrólise é muito influenciada pela força e concentração do catalisador ácido ou básico [16,57]. De uma forma geral, os ácidos fortes comportam-se de forma similar, enquanto que ácidos fracos requerem tempos de reacção mais longos para se atingir igual extensão da reacção. Esta, cujo mecanismo é apresentado na Fig. 2.8, é de primeira ordem em relação à concentração de ácido.

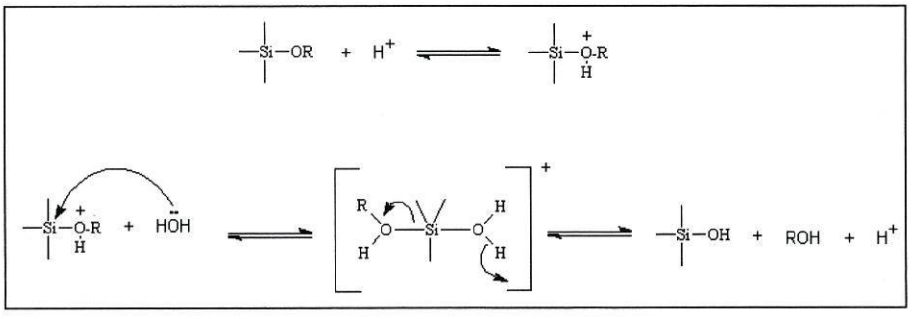


Figura 2.8. Mecanismo da hidrólise catalisada por um ácido.

Em condições acídicas, um grupo alcóxido é protonado numa primeira etapa muito rápida. A densidade electrónica é desviada do átomo de silício, tornando-o mais electrofílico e, logo, mais susceptível ao ataque da água. Isto resulta na formação de um estado de transição penta-coordenado com carácter S_N2 significativo. Com o ataque da molécula de água, que adquire carga parcial positiva, a carga do alcóxido protonado é reduzida de forma correspondente, tornando o álcool um melhor grupo abandonador. O estado de transição decai por deslocação do álcool e inversão do tetraedro de silício [2].

Em condições alcalinas a reacção de hidrólise é também de primeira ordem em relação à concentração de base. No entanto, aumentando a concentração do monómero precursor, a reacção desvia-se para uma reacção de segunda ordem mais complexa. Bases fracas, como hidróxido de amónio ou piridina, originam velocidades de reacção comparáveis às bases fortes em concentrações superiores. Em comparação com a catálise ácida, a cinética da hidrólise é mais fortemente influenciada pela natureza do solvente quando se utiliza um catalisador alcalino. A reacção de hidrólise é também mais lenta do que a catalisada por ácido, para uma concentração equivalente de catalisador [16]. De facto, os oxigénios mais básicos do alcóxido tendem a repelir o nucleófilo, HO^-. Contudo, assim que ocorre a hidrólise inicial, as reacções seguintes dão-se de forma sequencial, sendo que cada grupo alcóxido subsequente é mais facilmente removido do

monómero que o anterior. Assim, os factores estéricos relacionados com a estrutura tridimensional do precursor têm mais influência na reacção do que os factores indutivos.

O mecanismo de reacção na presença de um catalisador alcalino tem início com uma primeira etapa rápida, em que a água se dissocia para produzir aniões hidroxilo, que têm tendência para atacar o átomo de silício. Mais uma vez é proposto um mecanismo do tipo S_N2, em que –OH substitui –OR com inversão do tetraedro de silício (Fig. 2.9).

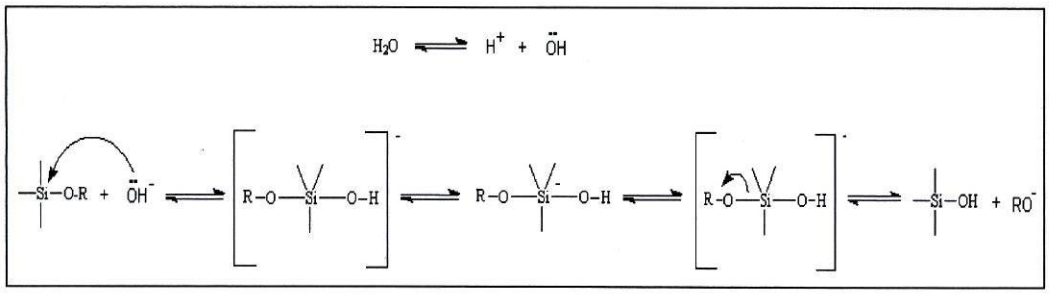


Figura 2.9. Mecanismo da hidrólise catalisada por uma base.

Tal como a hidrólise, a condensação ocorre sem catalisador, mas o seu uso nos organosiloxanos é altamente vantajoso. São utilizados catalisadores do mesmo tipo, geralmente compostos com características ácidas ou básicas. As reacções de condensação são ácido e base específicas. Em condições mais alcalinas o tempo de gelificação aumenta e a reacção de condensação prossegue sem que a gelificação tenha início [16]. Portanto, catalisadores que determinem um valor específico de pH no meio determinam o tipo de partícula de sílica que é produzida, à semelhança do que foi discutido anteriormente a propósito da influência do pH.

Como nos sistemas aquosos de silicatos o tempo de gelificação diminui abaixo do ponto isoeléctrico da sílica, é aceite que o mecanismo de condensação catalisada por ácido envolve espécies silanol protonadas (Fig. 2.10).

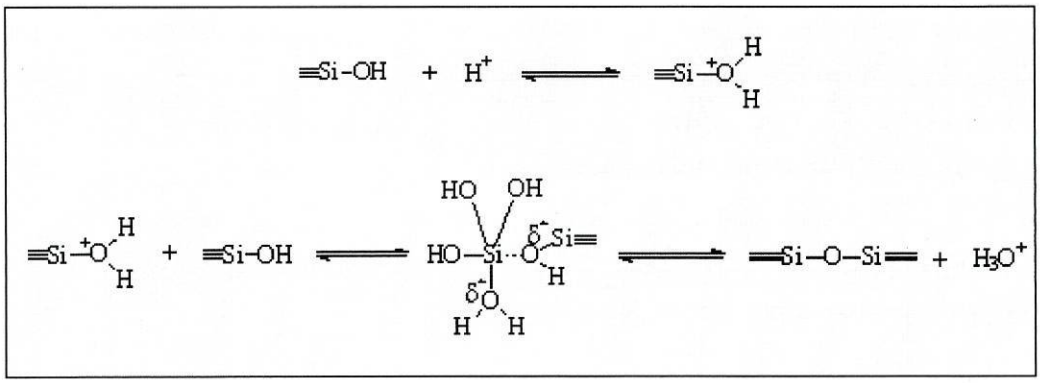


Figura 2.10. Mecanismo da condensação catalisada por um ácido.

A protonação do silanol torna o átomo de silício mais electrofílico e, logo, mais susceptível ao ataque nucleofílico. As espécies silanol mais básicas (contidas em monómeros ou oligómeros pouco ramificados) são mais facilmente protonadas. Portanto, as reacções de condensação ocorrem preferencialmente entre espécies neutras e silanóis protonados localizados em monómeros ou grupos terminais [2,17,58].

A reacção de condensação catalisada por uma base envolve o ataque de um silanol desprotonado nucleofílico a um ácido silícico neutro (Fig. 2.11). Este mecanismo envolve intermediários de silício penta ou hexa coordenados, de forma similar ao mecanismo tipo S_N2 [2,17].

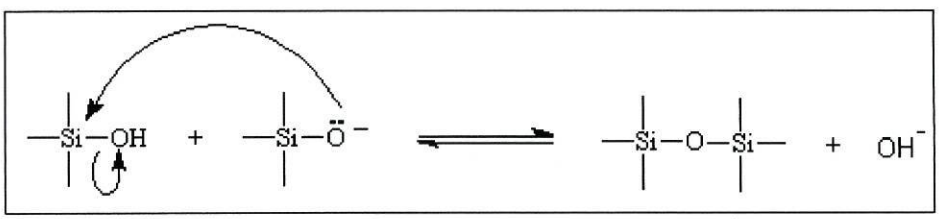


Figura 2.11. Ataque nucleofílico envolvido na condensação catalisada por uma base.

À luz destes mecanismos de reacção, facilmente se compreende que a natureza do catalisador influencia a estrutura final do gel obtido (Fig. 2.12). Utilizando como catalisador um ácido, os grupos terminais Si-OR são os mais reactivos do ponto de vista estérico e indutivo, levando à formação de cadeias longas. Obtêm-se assim soles

poliméricos ramificados que originam geles homogéneos e densos, de grande área de superfície (cerca de 1000 m^2 g^{-1}). Com um catalisador alcalino, devido à elevada velocidade de condensação, resultam soles condensados particulados, que se aglomeram em geles de sílica muito porosos, sendo a velocidade de gelificação muito rápida [2].

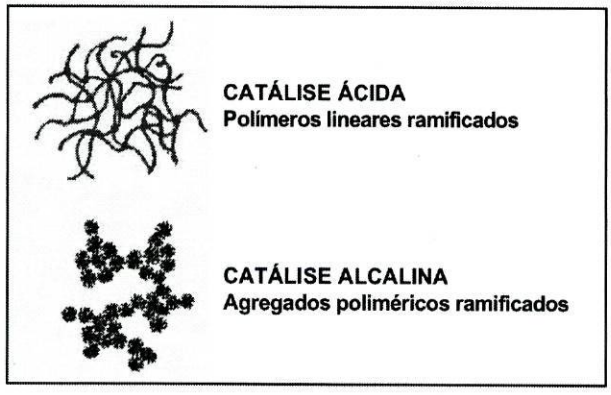


Figura 2.12. Tipo de gel obtido em função do catalisador.

A catálise ácida é utilizada com mais frequência na produção de materiais sol-gel para sensores ópticos, já que os produtos finais apresentam maior homogeneidade, durabilidade e são menos susceptíveis à lixiviação (dada a sua menor porosidade).

2.2.2.4. Razão molar H_2O:Si (R)

Para que as reacções de hidrólise e condensação convertam de forma completa o alcóxido de silício em SiO_2 são necessárias duas moles de água por cada mole de Si, ou seja, um valor de R = 2 é teoricamente suficiente para que a hidrólise e a condensação sejam completas. No entanto, devido à formação de espécies intermediárias, são geralmente necessários valores superiores, e este excesso de água presente tem influência na progressão das reacções e nas estruturas finais obtidas [2]. O aumento do valor de R produz um aumento da taxa de hidrólise, quer se utilize um catalisador ácido ou básico; valores mais altos de R fazem com que a hidrólise dos monómeros seja mais completa antes que ocorra condensação significativa [2,11]. No entanto, quando R aumenta, mantendo-se a razão solvente/silicato constante, a concentração de silicato diminui, o que, por seu turno, reduz as taxas de hidrólise e condensação, traduzindo-se

num aumento do tempo de gelificação (Fig. 2.13). Uma vez que a água é um dos produtos da reacção de condensação, valores muito elevados de R promovem a hidrólise das ligações siloxano formadas, ou seja, revertem a reacção. Em soluções catalisadas por ácidos, o aumento da quantidade de água produz geles com área de superfície e porosidade superiores.

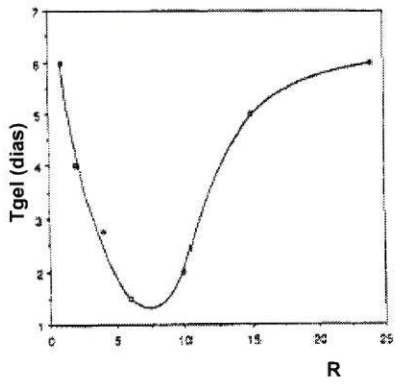


Figura 2.13. Variação do tempo de gelificação em função da razão molar H_2O:Si (R) [11].

Para valores muito baixos de R (<2), um aumento da quantidade de água da hidrólise resulta em tempos de gelificação baixos, apesar do efeito de diluição. Para quantidades de água elevadas, o tempo de gelificação aumenta com a quantidade de água.

2.2.2.5. Efeito do solvente

Como os dois reagentes envolvidos no processo sol-gel, a água e o alcóxido metálico, são imiscíveis, a homogeneização é promovida pela adição de um solvente orgânico comum, na presença do qual a hidrólise é facilitada. Os solventes são adicionados para prevenir a separação de fases durante as etapas iniciais da hidrólise e para controlar as concentrações de silicatos e água, que irão influenciar a cinética da gelificação. Os mais utilizados são o etanol e o metanol, e em menor escala o tetrahidrofurano e o dioxano. A presença de solvente em excesso diminui a tendência para a agregação, aumentando a porosidade do produto final; também a sua natureza pode influenciar as reacções de hidrólise e condensação, exercendo um efeito significativo no tempo de gelificação e nas propriedades finais do gel [2].

Na Tabela 2.3 encontram-se resumidos os tempos de gelificação verificados para TMOS hidrolisado na presença de diferentes solventes.

Tabela 2.3. Tempos de gelificação para TMOS hidrolisado em diferentes co-solventes [2].

SOLVENTE	T_{GEL} (HORAS)
Metanol	8
Formamida	6
Dimetilformamida	28
Acetonitrilo	23
Dioxano	41

A reacção de hidrólise é afectada pela polaridade do solvente, que determina a selectividade relativamente à solvatação das diferentes espécies em solução, e pela presença de átomos de hidrogénio lábeis, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio. Uma vez que a hidrólise dos alcoxisilanos pode ser catalisada quer por iões H_3O^+ quer por OH^-, pontes de hidrogénio entre estas espécies e o solvente traduzem-se numa redução da actividade catalítica e, consequentemente, redução da taxa de hidrólise. Solventes próticos têm um efeito favorável sobre a hidrólise catalisada por ácidos, originando iões H_3O^+ mais electrofílicos, enquanto que os solventes não-próticos aceleram a hidrólise com catálise alcalina, tornando os iões OH^- mais nucleofílicos. A etapa de condensação é também influenciada de forma diferente pelo solvente, dependendo do pH. Os solventes próticos promovem a condensação em condições ácidas, uma vez que estabelecem pontes de hidrogénio com os grupos desprotonados, e o mecanismo catalisado por ácido ocorre entre grupos silanol protonados. Um efeito oposto é observado para os solventes apróticos. Por outro lado, os solventes próticos podem participar na alcoólise de dímeros ou espécies mais altamente condensadas, retardando assim a condensação [2]. A etapa de gelificação é influenciada sobretudo pela estrutura tridimensional da molécula do solvente: quanto maior e mais longa for, maior é o tempo de gelificação [11]. Nos sistemas híbridos orgânicos-inorgânicos desenvolvem-se interacções adicionais com a fase orgânica da matriz, o que faz com que os efeitos do solvente nas propriedades dos híbridos sol-gel possam ser diferentes dos observados nos sistemas inorgânicos puros [59].

Juntamente com o solvente homogeneizador, podem adicionar-se os agentes químicos para controlo da secagem (DCCA), usados para facilitar a secagem rápida de monolitos sem fracturas. Estes têm também uma influência significativa na cinética das reacções e no tempo de gelificação. Por exemplo, a adição de formamida reduz a taxa de hidrólise mas aumenta ligeiramente a condensação, o que pode ser atribuído à sua constante dieléctrica elevada e à capacidade de formar ligações de hidrogénio com hidroxilos e protões em condições básicas ou acídicas, respectivamente, reduzindo a actividade catalítica efectiva [31]. Além disso, possui viscosidade elevada, o que pode comprometer a capacidade de reorientação dos ligandos à volta do núcleo e reduzir os coeficientes de difusão das espécies reactivas na solução [2]. O tempo de gelificação é reduzido devido à estabilização dos oligómeros; na presença deste agente a propagação da rede polimérica não se faz de forma aleatória, mas sim de uma forma organizada, originando assim ligações mais fortes e geles menos sensíveis às pressões envolvidas na secagem [60,61]. A policondensação continua a ocorrer após a gelificação, originando razões tempo de reacção/ t_{gel} relativo reduzidas [62].

Como alternativa à utilização de um co-solvente, o processo sol-gel pode ser conduzido por exposição da mistura alcóxido-água a irradiação ultrasónica intensa, obtendo-se um produto final designado por *sonogel* [63]. A ausência de solvente adicional no sistema de reacção e, sobretudo, os efeitos da cavitação ultrasónica, geram um ambiente particular para as reacções do processo sol-gel, originando materiais com propriedades específicas: elevada densidade, textura refinada, estrutura homogénea, distribuição de tamanho de poro muito estreita e razão superfície/volume duas a três vezes superior aos geles preparados em soluções alcoólicas. As ondas ultrasónicas promovem o início das reacções através da mistura rápida e eficaz do sistema, e geram a cavitação, que por sua vez aumenta a taxa de hidrólise, pelo aumento da área de contacto entre o alcóxido e a água. Os produtos da hidrólise (álcool e silanol) ajudam a dissolução mútua, causando um aumento adicional da taxa de hidrólise, até esta atingir um valor máximo e decrescer depois em função do consumo de reagentes [64]. O tempo de gelificação, t_{gel}, sofre uma redução drástica em comparação com as técnicas clássicas que utilizam um álcool como co-solvente; a temperatura constante, o tempo necessário para a gelificação ocorrer diminui com o aumento da dose de estimulação ultrasónica [63].

2.2.3. Preparação de filmes pelo processo sol-gel

Um dos aspectos mais interessantes do processo sol-gel é o facto de o sol fluido, antes de sofrer gelificação, permitir a preparação de filmes finos de uma forma simples e económica, sendo possível o controlo preciso da microestrutura do filme depositado, nomeadamente do volume e tamanho de poro, da espessura e da área superficial. Os filmes finos (de espessura geralmente < 1 μm) são a configuração tecnologicamente mais importante, constituindo uma área chave nas aplicações do processo sol-gel pelas suas inúmeras utilizações na óptica, na electrónica e no desenvolvimento de sensores [65-68]. Podem ser processados rapidamente, a partir de quantidades reduzidas de matérias-primas, e apresentam forte adesão, resistência mecânica e menor susceptibilidade de quebrar devido a pressões internas do que os monólitos (particularmente quando expostos a líquidos), ultrapassando assim as principais desvantagens do processo sol-gel. No que diz respeito ao desenvolvimento de sensores ópticos, os filmes finos apresentam várias vantagens importantes sobre outras configurações: possibilitam maior transparência e exibem tempos de resposta mais curtos, já que a difusão dos analitos é também mais rápida. Podem ser facilmente combinados com fibras ópticas ou guias de onda planas, produzindo sensores intrínsecos de onda evanescente [69]; são também mais fáceis de miniaturizar e permitem a preparação de sensores com várias camadas sobrepostas [66].

A preparação de filmes sol-gel é afectada por diversos parâmetros independentes, relacionados com a química da solução, as características do suporte físico e o processo de deposição [70]. A estrutura e as características químicas dos substratos poliméricos sobre os quais é depositado o filme determinam a reactividade da superfície e devem portanto ser considerados aquando da definição da composição do sol. No processo sol-gel tradicional, o principal mecanismo de adesão entre o filme e o substrato é a condensação entre grupos hidroxilo (presentes, por exemplo, no vidro); quando se utilizam substratos que não possuam estes grupos, a adesão terá que ocorrer por outros mecanismos, determinados em larga escala pela composição do sol. A utilização de precursores com grupos orgânicos pode possibilitar mecanismos adicionais de ligação. O pH e o tempo de envelhecimento do sol antes da deposição influenciam igualmente o número de grupos hidroxilo disponíveis para condensação com o substrato. O co-solvente deve também ser escolhido de forma a permitir uma boa molhabilidade do suporte; o etanol cumpre esse requisito e é por isso um dos solventes mais frequentemente usados para a obtenção de filmes.

As técnicas mais utilizadas para deposição de filmes sol-gel são a *imersão*, ou *dip-coating*, e a *rotação controlada*, ou *spin-coating*. Em ambos os casos, a microestrutura do filme depende da dimensão e da extensão da ramificação das espécies em solução antes da deposição, e das velocidades relativas de condensação e evaporação durante a deposição do filme. Portanto, o controlo destes factores permite o controlo da porosidade da matriz polimérica obtida.

A técnica de imersão (*dip-coating*) é um processo em que o substrato é removido verticalmente do sol, a uma velocidade definida e constante [65,71,72]. Este processo pode ser dividido em 5 etapas: imersão, ascensão do substrato, deposição, drenagem e evaporação (Fig. 2.14).

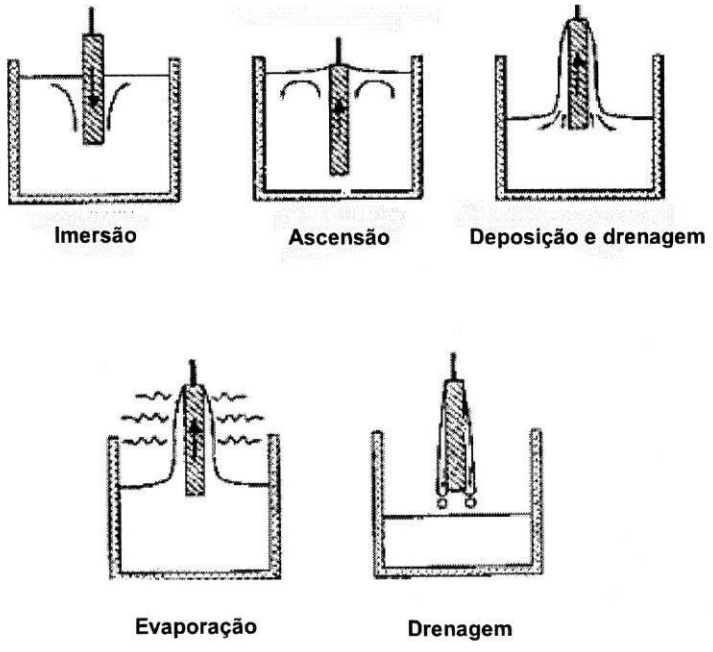


Figura 2.14. Etapas do processo de imersão ou *dip-coating* [2].

Quando o substrato é removido lentamente do sol, que contém espécies poliméricas ou coloidais em suspensão, um filme de líquido fica agarrado à superfície (Fig. 2.15). O filme torna-se mais fino por drenagem gravitacional, capilaridade e, sobretudo, evaporação, culminando numa linha de secagem bem definida, atrás da qual vai ficando um filme quase seco. A evaporação preferencial do álcool causa o enriquecimento do

filme em água, que seca posteriormente. Entretanto, as partículas dispersas no filme sofrem concentração rápida [71,73].

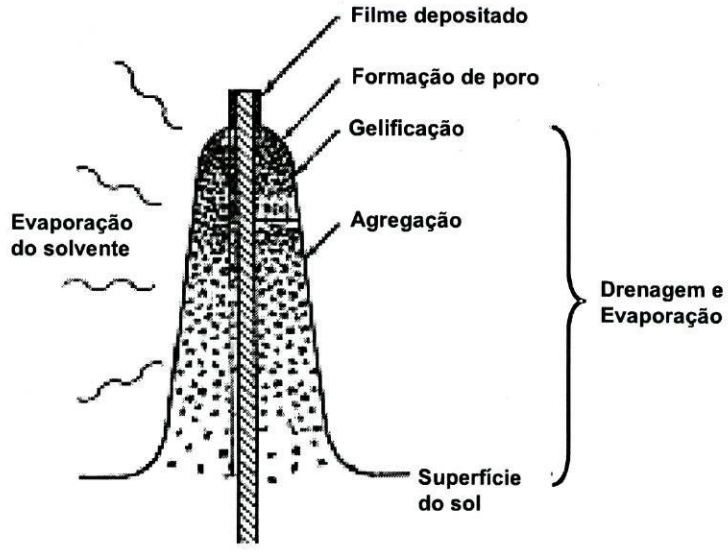


Figura 2.15. Processo de deposição por imersão no estado estacionário [2,72].

A espessura do filme obtido depende da competição entre seis forças diferentes: 1) a força que arrasta a solução, devido ao movimento do substrato; 2) a força da gravidade; 3) a força resultante da tensão superficial no menisco de curvatura côncava; 4) a inércia da camada de líquido que chega à região de deposição; 5) o gradiente de tensão superficial; 6) a pressão de separação (ou de junção), importante para filmes de espessura inferior a 1 μm [2,72]. A espessura final do filme depende ainda da concentração e da viscosidade do líquido, da velocidade de evaporação e da velocidade de extracção do substrato, factores que têm que ser cuidadosamente controlados para se obterem filmes homogéneos e reprodutíveis em termos de espessura, estrutura e propriedades. Quanto mais lento for o movimento do substrato, mais finos serão os filmes obtidos, e as etapas de deposição e drenagem sobrepõem-se. Uma vez que a condensação continua durante a formação do filme sol-gel, as velocidades de condensação e de evaporação ditam o grau de interligação da rede durante as etapas de deposição e drenagem, e logo a porosidade.

As maiores vantagens desta técnica são o elevado grau de uniformidade obtido e a forma simples como permite o controlo da espessura. É também adaptável a substratos

de dimensões e formas variadas. Permite ainda a preparação de revestimentos com várias camadas.

Na técnica de rotação controlada (*spin-coating*) o filme é depositado por drenagem centrífuga e evaporação; para tal, o substrato roda à volta de um eixo perpendicular à área de revestimento. Este processo pode dividir-se em quatro etapas: deposição, rotação, centrifugação e evaporação (Fig. 2.16), sendo que esta última se sobrepõe às restantes [2,72].

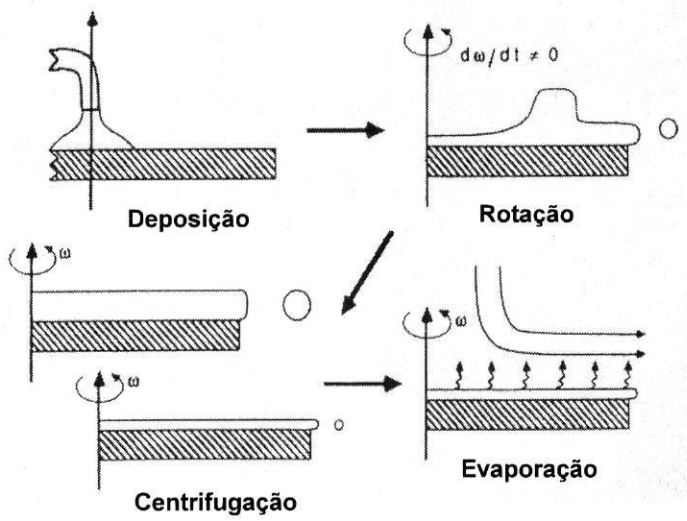


Figura 2.16. Etapas do processo de rotação controlada ou *spin-coating* [2].

Na primeira etapa é depositado um excesso de líquido sobre o substrato que, quando a rotação tem início, é conduzido de forma radial pela força centrífuga. Durante o período de centrifugação, o excesso de líquido flui até ao perímetro e é eliminado sob a forma de gotículas. À medida que o filme se vai tornando mais fino, a velocidade de perda do líquido por centrifugação vai diminuindo, uma vez que a resistência ao fluxo se torna maior, e também porque a concentração dos componentes não voláteis (e, logo, a viscosidade) aumenta. Durante a última etapa a evaporação torna-se o principal mecanismo pelo qual o filme se torna mais fino.

A principal vantagem desta técnica é o facto de o filme líquido ter tendência a tornar-se uniforme, em espessura, durante a centrifugação, e posteriormente tender também a manter-se, desde que a viscosidade não varie ao longo do suporte. Este comportamento

deve-se ao balanço entre duas forças: a força centrífuga, que conduz o fluxo radialmente para fora, e a fricção, que actua radialmente para dentro. A espessura e a qualidade do filme obtido dependem dos parâmetros reológicos do líquido depositado e da velocidade de rotação.

Além das técnicas de imersão e de rotação controlada, outras têm sido referidas, embora sejam menos utilizadas, como por exemplo a aplicação da solução no substrato sob a forma de um aerosol (*spray coating*) [74], que é usada a nível industrial para revestimento de suportes físicos com formas irregulares. O *dip-coating* pode também sofrer variações, como nos casos em que o substrato é mergulhado no sol num determinado ângulo, diferente de 90° (cuja amplitude determina a espessura do filme), ou nos processos em que o substrato permanece fixo e o nível da solução baixa a velocidade constante [2].

A escala temporal limitada do processo de deposição de filmes faz com que haja algumas alterações em relação ao processo sol-gel clássico descrito anteriormente. A sobreposição da deposição e da evaporação estabelece uma "competição" entre as reacções de condensação (que endurecem a estrutura, aumentando a resistência à compactação) e a evaporação (que compacta a estrutura). Enquanto que um sistema em solução pode demorar meses a gelificar, a transição de sol para gel completa-se em cerca de 30 segundos durante a deposição por rotação. A gelificação pode mesmo ocorrer mediante um processo físico, por concentração dependente da viscosidade, em vez de se dar por processos químicos. Para um sol constituído por partículas repulsivas há também pouco tempo disponível para a sua organização à medida que sofrem concentração no filme. Uma vez que os filmes são menos condensados do que os geles monolíticos, são mais facilmente compactados, inicialmente por evaporação e posteriormente por pressão capilar exercida na etapa final do processo de deposição [72]. A curta duração da deposição e da secagem faz com que os filmes sofram um envelhecimento consideravelmente inferior, o que geralmente resulta em estruturas mais compactas. Por vezes o sol é submetido a envelhecimento antes da deposição, o que resulta num aumento da viscosidade antes do revestimento [2]; a evaporação de solvente durante o envelhecimento, aliada à fortes interacções entre a fase inorgânica e o polímero, originam perdas menores durante a centrifugação e, logo, aumento da espessura do filme. Uma vez que a extensão da polimerização antes da deposição é determinada pelo envelhecimento, este determina também a textura porosa do filme obtido (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Efeito do envelhecimento de um sol antes da deposição na textura porosa dos filmes resultantes [77].

Envelhecimento (t/t_g)	Porosidade (%)	Diâmetro médio de poro (nm)	Área de superfície (m^2/g)
0-0.15	-	<0.4	1-2
0.15	16	3.0	146
0.33	24	3.2	220
0.66	33	3.8	263
1	52	6.0	245

À medida que o filme seca, sofre uma redução de volume, à semelhança do que foi descrito para os geles monolíticos. Como o filme se encontra ligado ao substrato e é incapaz de se contrair nessa direcção, a redução de volume é totalmente suportada por uma redução em espessura. Apesar dos gradientes de pressão gerados nesta fase, os filmes não sofrem fractura desde que a sua espessura se encontre abaixo de um valor crítico, compreendido entre 0.5 e 1 μm [2]. Quando este valor é excedido surgem fracturas, cujas formas e distâncias relativas podem relacionar-se com a espessura [29,75]. Assim, a preparação de filmes com espessuras consideráveis requer geralmente sobreposição de múltiplas camadas ou a obtenção de estruturas com menor grau de interligação, por exemplo incorporando monómeros com substituintes orgânicos. As estratégias para evitar a ruptura dos filmes durante a secagem envolvem, além da redução da espessura dos filmes, a adição de tensioactivos e a redução da fracção de volume de solvente no ponto de solidificação [72].

Além dos parâmetros relacionados com a técnica de deposição, a química da solução tem também grande influência nos filmes obtidos. A microestrutura final dos filmes depende da estrutura das espécies inorgânicas contidas no sol e da respectiva reactividade. As proporções entre o alcóxido precursor, o solvente e a água têm uma grande influência na viscosidade e nas propriedades físicas do sol, e também na qualidade dos filmes obtidos [76,77]. Um conteúdo reduzido em precursor produz soluções com baixa viscosidade, originando filmes muito finos e influenciando também a concentração final de possíveis reagentes imobilizados no filme. Aumentando a quantidade de precursor produzem-se soluções muito viscosas, que originam filmes espessos e com maior concentração de dopante, mas com resposta mais lenta e maior susceptibilidade à fractura.

Em contraste com os geles de grande volume, para os filmes sol-gel o aumento da quantidade de água resulta em menor porosidade, redução da espessura e maior densidade; a redução de volume dos filmes submetidos a tratamento térmico é também diminuída [78]. Esta diferença de comportamento pode ser atribuída ao facto de a polimerização dos filmes ocorrer em grande parte na ausência de uma fase líquida, e à curta duração das etapas de gelificação, envelhecimento e secagem. O aumento do valor de R, que resulta numa reacção de hidrólise mais completa, é portanto desejável, uma vez que conduz à obtenção de filmes com maior qualidade, homogeneidade e uniformidade de superfície, e melhora substancialmente a sua facilidade de processamento, excepto quando se deseja obter porosidade considerável [79].

Filmes sol-gel preparados por reacções catalisadas por ácido ou por base exibem superfícies com morfologias distintas. Os filmes obtidos a partir de soluções catalisadas por uma base mostram uma rede de partículas empacotadas, sugerindo que a polimerização se processa por formação inicial de glóbulos de sílica seguida da sua agregação. Os filmes em que o catalisador é um ácido apresentam uma superfície muito mais regular. Também a susceptibilidade à degradação e à saída de moléculas imobilizadas fisicamente varia com o catalisador, sendo superior quando este é uma base.

2.2.3. Vantagens e aplicações da tecnologia sol-gel

Os materiais sol-gel apresentam características altamente favoráveis para aplicações analíticas, combinando rigidez física, resistência à abrasão, estabilidade e versatilidade. Os parâmetros estruturais, a polaridade ou a capacidade de troca iónica são facilmente controlados pela simples modificação do protocolo de polimerização, e é possível obter materiais com formas e configurações variadas, como filmes finos, fibras, monólitos, discos, esferas ou pós. Além de matrizes inorgânicas, o processo sol-gel permite a produção de materiais híbridos orgânicos-inorgânicos. Em comparação com outras matrizes poliméricas, o vidro sol-gel apresenta vantagens interessantes para o desenvolvimento de membranas para aplicações ópticas [2,80,81], das quais se destacam as seguintes:

i) A matriz sol-gel é transparente para comprimentos de onda acima de 250 nm, permitindo a maioria das aplicações ópticas; além disso, possui fluorescência intrínseca muito baixa.
ii) O vidro sol-gel possui estabilidade química, fotoquímica, térmica e mecânica, sendo apropriado para utilização em condições hostis.

iii) O vidro é quimicamente inerte, não-alergénico e biocompatível.
iv) Os materiais sol-gel são formados em condições quimicamente suaves e a baixa temperatura, podendo assim ser usados para a imobilização de inúmeros agentes de reconhecimento químico e biológico, incluindo moléculas relativamente frágeis.
v) O processo sol-gel permite a produção de filmes finos de forma simples e reprodutível.

Apesar destas vantagens, os vidros sol-gel apresentam algumas limitações, como a relativa fragilidade, o facto de sofrerem hidrólise em condições de pH muito elevado e a grande capacidade de troca iónica devido à presença de grupos silanol na superfície. Outra desvantagem é a sensibilidade em relação à humidade, o que resulta em variações de viscosidade e espessura dos filmes com as condições ambientais. No entanto, a maioria destes problemas são ultrapassados pela própria flexibilidade do processo, que permite o controlo da policondensação e a alteração da química das soluções. Da aparentemente desfavorável complexidade do processo sol-gel, que envolve várias etapas, estados intermediários e variáveis, surge o seu maior potencial: produzir um leque alargado de novos tipos de materiais, com propriedades específicas, difíceis ou mesmo impossíveis de obter por outras vias.

Esta tecnologia abrange vários domínios das necessidades modernas, sendo numerosas as aplicações dos materiais obtidos pelo processo sol-gel [2,3,10,14,43-46]. Os filmes e revestimentos representam a aplicação comercial mais antiga, sendo usados em componentes electrónicos, ópticos e opto-electrónicos [2,3,15]. Os revestimentos anti-reflexo são também usados na indústria automóvel e na construção de edifícios. Monólitos e filmes são utilizados como lentes, espelhos, filtros ópticos, *lasers* e sensores químicos [80-84]. Pós de dimensões submicrométricas são produzidos para aplicações estruturais, electrónicas, biomédicas e em medicina dentária; pós compostos têm sido patenteados para uso como materiais agro-químicos e herbicidas. Membranas para processos de separação e filtração, materiais cromatográficos e catalisadores constituem outro exemplo de aplicações comuns. Pela sua biocompatibilidade, os materiais sol-gel são ainda usados como materiais de substituição óssea e como revestimentos de implantes [85,86]. Mais recentemente, têm sido estudadas aplicações em biotecnologia, em que biomoléculas incorporadas em matrizes sol-gel encontram potenciais aplicações na monitorização de processos, testes ambientais, processamento alimentar e na modulação da libertação de fármacos [87].

2.3
SENSORES ÓPTICOS BASEADOS EM FILMES SOL-GEL

Pelas características anteriormente enumeradas, a matriz sol-gel pode ser considerada como um suporte próximo do ideal para o desenvolvimento de sensores e biosensores optoquímicos. A sílica pode ser preparada pelo processo sol-gel de forma a ter transparência para uma vasta gama do espectro UV-visível e porosidade controlada, permitindo que os reagentes imobilizados se mantenham firmemente retidos na matriz mas, contudo, expostos à interacção com as moléculas da amostra que se possam difundir para o interior dos poros. A fácil manipulação das propriedades físico-químicas dos materiais sol-gel permite, por variação do precursor ou das condições da reacção, optimizar de forma racional os sensores obtidos, tendo em conta os parâmetros críticos para o seu desempenho: estabilidade, reversibilidade, tempo de resposta e selectividade [88].

Neste contexto, é fundamental garantir-se a completa estabilização da microestrutura da matriz antes da utilização do sensor, caso contrário qualquer alteração que ocorra afectará a sua estabilidade e reversibilidade. Por exemplo, alterações da espessura dos filmes ou da porosidade da matriz ao longo do tempo reflectem-se necessariamente na resposta do sensor, e podem ser facilmente evitadas através de modificações no tipo de precursor ou na quantidade de água [89]. Por outro lado, a estabilidade de um sensor, e consequentemente o seu tempo de vida útil, são determinados em grande escala pela ocorrência de lixiviação dos reagentes imobilizados. A perda progressiva de quantidades consideráveis da molécula sensora origina irreprodutibilidade de resposta, e a fracção restante (que não se difunde para a solução) pode não ser suficiente para produzir uma resposta mensurável ou para fornecer um intervalo de resposta suficientemente dinâmico. Várias estratégias têm sido propostas para reduzir a lixiviação: adoptar métodos de imobilização que envolvam a ligação covalente das moléculas sensoras à matriz [90], estabelecer períodos de acondicionamento prévio, de forma a estabilizar a lixiviação antes da aplicação analítica dos sensores [91], ou ainda ajustar as condições da reacção de forma a reduzir o tamanho dos poros [92], podendo neste caso penalizar o tempo de resposta devido à redução da permeabilidade. Outras alternativas envolvem o aumento do tamanho da molécula através da sua ligação a um transportador macromolecular inerte [93,94] ou, no caso de reagentes fluorescentes, efectuar medidas baseadas no tempo de atenuação da fluorescência em vez da intensidade [95].

O tempo de resposta do sensor é associado ao tempo de difusão do analito através da matriz sol-gel e às interacções electrostáticas entre a matriz e analitos carregados ou polares. Assim, a espessura dos filmes, a porosidade e a concentração de grupos silanol à superfície (definida pelo tipo de precursor utilizado) devem ser consideradas e optimizadas de forma a obter tempos de resposta convenientes [96]. A modificação da porosidade e da hidrofobicidade da matriz podem influenciar também o grau de susceptibilidade do sensor a espécies interferentes, se este se relacionar com discriminação de tamanho das moléculas ou com interacções de carga [88].

2.3.1. Imobilização de elementos de reconhecimento (bio)-químico

As condições suaves em que se processa a química sol-gel e a natureza quimicamente inerte dos materiais obtidos tornam estas matrizes ideais para a imobilização de numerosas moléculas orgânicas, organometálicas e biológicas. As propriedades do material resultante são determinadas pela natureza da molécula imobilizada. De uma forma geral, um método de imobilização adequado deve preencher alguns requisitos importantes: além de simples e rápido, deve ser não-específico, ou seja, deve poder ser utilizado para vários tipos de agentes de reconhecimento; deve ainda produzir reagentes imobilizados estáveis e que não lixiviem do substrato e, sobretudo, que retenham a sua reactividade química ou bioquímica [81]. O processo sol-gel permite a imobilização de reagentes no interior ou à superfície das matrizes sólidas através de vários processos, em diferentes etapas da formação do gel [80,81,97,98]. Além das técnicas de imobilização física por adsorção, da imobilização covalente (que tira partido da grande reactividade dos grupos silanol presentes à superfície) e da co-polimerização de reagentes modificados, o processo sol-gel tornou possível a generalização da encapsulação física de agentes de reconhecimento.

As técnicas de *impregnação* incluem a ligação electrostática e a adsorção física ou química dos reagentes ao suporte poroso. Para tal, este é exposto a uma solução concentrada do reagente num solvente orgânico, que é posteriormente eliminado por evaporação. Este processo é muito versátil e económico, já que o mesmo protocolo, envolvendo instrumentação e solventes comuns, pode ser aplicado à imobilização de reagentes diferentes em matrizes de composição variada. No entanto, a adesão do reagente ao suporte é fraca, originando sensores com tempos de semi-vida baixos, o que exclui aplicações *in vivo* e limita a sua utilização prática. As moléculas adsorvidas

são facilmente removidas por lixiviação e as moléculas ancoradas à superfície são susceptíveis de sofrer quebra da ligação, o que faz com que estes métodos só se apliquem a dispositivos descartáveis ou renováveis, ou a situações em que a tendência para ocorrer lixiviação é muito baixa, como nos sensores de gases ou para uso em ambientes não-aquosos.

A *imobilização covalente* baseia-se no estabelecimento de uma ligação química directa dos agentes sensores ao suporte de sílica e foi inicialmente aplicada em materiais para cromatografia. Os grupos silanol na superfície do xerogel constituem os locais para ligação covalente de moléculas orgânicas ou proteínas, podendo também proceder-se à activação prévia da superfície com agentes silanizadores ou utilizando glutaraldeído como agente de ligação. As moléculas imobilizadas por ligação covalente apresentam tempos de vida superiores em relação às que são apenas adsorvidas à superfície, mas por vezes esta técnica resulta numa diminuição da resposta, devido à formação das ligações com o suporte e ao reduzido grau de liberdade dos reagentes imobilizados [90]. Este tipo de imobilização, muitas vezes moroso e complexo, é altamente específico, de modo que as condições da reacção e os precursores têm que ser definidos para cada caso, tornando-se por isso mais dispendioso e de utilização em massa limitada.

A *co-polimerização de reagentes modificados* envolve a síntese de alcoxisilanos monoméricos contendo o reagente de interesse ligado covalentemente, e o seu uso subsequente como precursor no processo sol-gel. Este método é menos aplicado que os restantes, já que é mais caro e requer a síntese prévia do precursor, mas permite obter sensores modificados e sem lixiviação.

A técnica de *encapsulação* é um método simples e o mais utilizado, de tal forma que é referido como *imobilização sol-gel* de forma generalizada. As moléculas orgânicas, inorgânicas ou biológicas a imobilizar são misturadas com os precursores e, à medida que a rede polimérica se forma e ocorre a retracção de volume, o reagente é firmemente aprisionado no seio da matriz sol-gel, mantendo-se porém estericamente acessível a moléculas e iões suficientemente pequenos para se difundirem na estrutura porosa. Uma vez que a polimerização pode ser conduzida à temperatura ambiente, em condições neutras e usando um processo que não envolve a formação de radicais livres, este método é conveniente para incorporar compostos orgânicos delicados e até proteínas activas ou entidades biológicas sensíveis. Para estas últimas, o protocolo de encapsulação é geralmente levado a cabo em duas fases, de modo a assegurar condições de pH, força iónica e temperatura biocompatíveis, e também minimizar solventes e espécies orgânicas reactivas ou tóxicas [97,99-101]. Numa primeira etapa o percursor é parcialmente hidrolisado, na presença de um catalisador ácido ou básico.

Nesta fase, o uso de co-solventes polares deve ser muito reduzido, ou mesmo eliminado (substituindo-os por agitação ultrasónica, por exemplo), uma vez que podem levar à desnaturação e precipitação irreversível das proteínas, com perda da actividade biológica. Posteriormente, os elementos biológicos a imobilizar são adicionados ao oligómero líquido, sob a forma de soluções ou suspensões tamponadas de forma adequada. A condensação ocorre de forma rápida e a rede de sílica forma-se à volta das biomoléculas, que ficam encapsuladas no gel poroso, originando um material bioactivo. Assim, a encapsulação é um método compatível com vários tipos de reagentes; o mesmo procedimento, apenas com ligeiras modificações, pode ser aplicado a uma vasta gama de agentes de reconhecimento químico ou bioquímico, que mantêm a respectiva reactividade e especificidade depois de imobilizados.

A encapsulação ultrapassa a maioria das limitações dos outros processos e reúne um conjunto de características vantajosas:

i) Cada molécula é aprisionada num poro, não apresentando liberdade translacional; evita-se assim a desactivação das moléculas por colisão.
ii) A encapsulação contribui para o aumento da pureza do reagente e exerce sobre este um efeito protector: as moléculas aprisionadas na matriz sol-gel não ficam em contacto directo com o meio externo, sendo isoladas de impurezas iniciais que possam intervir em processos fotodestrutivos, e de produtos de fotodecomposição que possam promover decomposições adicionais.
iii) A lixiviação é muito reduzida, em comparação com a imobilização à superfície, e pode mesmo ser eliminada através da manipulação da porosidade da matriz.
iv) A natureza rígida da matriz sol-gel limita em grande escala as rotações internas das moléculas, evitando perdas de energia não-radiante.
v) O isolamento das moléculas entre si permite atingir elevadas concentrações de reagente imobilizado sem que haja alterações do microambiente local em termos de características químicas ou de processos de desactivação (por exemplo, por agregação ou colisão entre as moléculas).

Estas vantagens únicas foram inicialmente demonstradas para a rodamina 6G [102], e desde então inúmeras moléculas orgânicas foram imobilizadas, não só com o objectivo de obter materiais com propriedades ópticas e aplicações específicas, como também para estudar os processos envolvidos na química sol-gel [103-110]. Desta forma, sabe-se hoje que, apesar de a química clássica das soluções poder ser transposta para o ambiente heterogéneo do vidro poroso sol-gel, muitas vezes as interacções físicas e/ou químicas estabelecidas entre as moléculas imobilizadas e a matriz resultam em alterações em relação ao seu comportamento em solução. Nalguns casos, esta

interacção pode trazer vantagens em termos de sensibilidade/selectividade, fotoestabilidade a longo prazo e redução de dimerização molecular, e ser utilizada para influenciar as propriedades das moléculas sensoras [111-113]. Dois aspectos distintos devem ser considerados: a química dos poros preenchidos com solvente e as interacções entre a molécula imobilizada e a própria matriz. De uma forma geral, a natureza, pH, polaridade e viscosidade do solvente no interior dos poros poderão influenciar a molécula; interacções com a parede dos poros (geralmente contendo grupos reactivos SiOH) devem também ser consideradas, e podem incluir colisões, efeitos de estreitamento, estabelecimento de ligações electrostáticas ou covalentes e pontes de hidrogénio. Quando a molécula permanece incorporada em regiões intersticiais muito estreitas, rodeada por uma estrutura rígida, as interacções a considerar serão forçosamente diferentes das anteriores [114,115].

A imobilização de reagentes orgânicos em matrizes sol-gel conduz frequentemente a um aumento de fotoestabilidade, que pode ser atribuída a dois factores: a diminuição de mobilidade intramolecular e intermolecular, causada pelo aprisionamento da molécula em poros de pequenas dimensões, e a reduzida foto-oxidação. Uma molécula com liberdade de movimentos limitada participa em menor número de interacções favoráveis à fotodegradação; por outro lado, a rigidez do gel depois de seco limita a permeabilidade ao oxigénio, o que diminui a ocorrência de foto-oxidação [110]. A matriz porosa pode ainda influenciar as interacções químicas envolvidas na reacção da molécula imobilizada com o analito. As limitações físicas impostas às moléculas, devido às reduzidas dimensões dos poros, podem alterar a sua estrutura electrónica; as interacções dos ligandos e do próprio analito com as paredes dos poros podem afectar a entalpia de complexação; a estrutura dos solventes pode ser alterada, causando efeitos termodinâmicos nas constantes de ligação; o isolamento de ligandos em poros de pequenas dimensões pode causar alterações de estequeometria [116]. Estes factores, associados à distribuição não-homogénea da porosidade, conduzem, por exemplo, a alterações do pK_a e alargamento da zona de viragem de indicadores de pH imobilizados [107,117], ou a diferenças de selectividade, estequeometria e constantes de complexação para indicadores de metais [112,116]. Mais uma vez, a simples modificação do protocolo de polimerização e das variáveis físico-químicas envolvidas possibilita manipular a extensão e a natureza das interacções com as moléculas imobilizadas, permitindo assim obter sensores com características controladas e até melhoradas.

As enzimas e outros elementos biológicos encapsulados em materiais sol-gel mantêm a sua actividade e selectividade nativas, permitindo assim a obtenção de biosensores. No entanto, o microambiente local da matriz influencia a função e a

conformação das proteínas imobilizadas [118,119]. De um modo geral, as enzimas imobilizadas exibem maior estabilidade, sendo necessárias temperaturas superiores ou condições químicas mais agressivas para que ocorra desnaturação, e mantêm-se activas durante períodos superiores em relação ao verificado em solução. Por exemplo, foi demonstrado um aumento de actividade após exposição a temperaturas elevadas para a enzima creatina cinase imobilizada [120], e a encapsulação em materiais sol-gel da enzima catalase provoca um efeito estabilizador face à presença de metanol [121]. À semelhança do que se verifica para os reagentes orgânicos, o aumento de estabilidade das biomoléculas é explicado pelo efeito protector da matriz porosa e pela limitada mobilidade das proteínas dentro dos poros. Apesar de a difusão do substrato através dos poros implicar cinéticas de reacção mais lentas do que se verifica quando as enzimas estão em solução, a estrutura porosa limita também o contacto da enzima com substâncias externas passíveis de causar desnaturação, ao mesmo tempo que fornece um microambiente similar ao do meio biológico. Por outro lado, a restrição de movimentos causada pelo aprisionamento das proteínas em poros aproximadamente do seu tamanho pode prevenir deformações estruturais irreversíveis. Ainda que mantendo a capacidade de sofrer as mudanças conformacionais necessárias para a ligação ao substrato, a cinética de desdobramento das cadeias proteicas é retardada pela matriz sol-gel, limitando em grande escala as conformações possíveis; os movimentos translacionais são geralmente eliminados mas a mobilidade rotacional é mantida [122,123]. O efeito estabilizador da encapsulação pode assim resultar da capacidade da matriz de sílica em restringir a flexibilidade conformacional da proteína e em promover rigidez estrutural no meio interno.

Os efeitos acima descritos podem por vezes ser anulados pelo estabelecimento de interacções electrostáticas entre locais da superfície da sílica e locais críticos de carga contrária da superfície da enzima, podendo mesmo causar desactivação enzimática. Como as paredes dos poros de sílica (cujo ponto isoeléctrico é 2.1) se encontram carregadas negativamente no intervalo de pH requerido pela maioria das enzimas, a matriz é atraída para a superfície da enzima imobilizada. Para a glucose oxidase, por exemplo, esta interacção não é prejudicial, uma vez que o seu centro activo é neutro: as cargas positivas do canal activo são contrabalançadas internamente pela presença de resíduos de carga negativa próximos. Pelo contrário, a lactato e a glicolato oxidases, cujos centros activos são positivos, vêem a sua estrutura desestabilizada, a menos que sejam pré-complexadas com polímeros protectores de carga contrária [124,125]. Também o envelhecimento da matriz sol-gel pode induzir desnaturação lenta das proteínas e perda da integridade conformacional. Estudos efectuados com a albumina sérica humana [126] mostram desdobramento parcial de fracções da proteína

imobilizada devido a alterações da composição do solvente interno (por perda de água) e às subsequentes interacções entre as proteínas e a sílica. No entanto, a presença de aditivos como o polietilenoglicol (PEG), que revestem a sílica, reduzindo a adsorção das proteínas e analitos às paredes dos poros, pode reduzir este efeito. Estes polímeros podem ainda diminuir a retracção de volume da matriz sol-gel, uma vez que funcionam como um material de preenchimento dos poros, prevenindo estericamente o seu colapso [118,127].

2.3.2. Aplicações analíticas

SENSORES DE PH

A maioria dos sensores ópticos baseados em filmes sol-gel desenvolvidos até à data são sensores de pH. Este são obtidos de forma simples pela incorporação de indicadores ácido-base na matriz porosa [30]. São fáceis de caracterizar e apresentam tempos de resposta curtos, devido à rápida difusão dos protões na matriz sol-gel. Vários indicadores de pH clássicos têm sido imobilizados em filmes sol-gel para obtenção de sensores de radiação não-confinada, baseados em medidas de fluorescência ou absorvância (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Indicadores ácido-base imobilizados em filmes sol-gel para desenvolvimento de sensores de pH de radiação não-confinada.

INDICADOR	COMPOSIÇÃO DO FILME	INTERVALO RESPOSTA (PH)	REF.
Amarelo de dimetilo	TEOS + MTES	2.9 – 4.0	[128]
Aminofluoresceína	TMOS + PTMS	4.0 – 9.0	[90]
Cianina eriocormo	TMOS	6.0 – 8.0; 10.0 –12.0	[129]
Verde de bromocresol	TEOS + MTES [a]	7.0 – 10.0	[130]
Verde de bromocresol	TEOS + MTMS / BTMS / PTMS	5.0 – 8.0	[131]
Vermelho de cresol	TEOS + MTMS / BTMS / PTMS	7.0 – 11.0	[131]
Vermelho de fenol	TEOS + PTES	6.0 – 12.0	[132]
Vermelho de metilo	TMOS	6.7 – 10.0	[133]
Vermelho de metilo [b]	TEOS	8.0 – 14.0	[134]

(a) Tratamento posterior da superfície com solução alcalina.
(b) Aplicado à monitorização da acidez ambiental, em meio líquido e gasoso.

Além dos indicadores ácido-base de uso comum, outras abordagens permitiram obter sensores com características melhoradas. A determinação do pH através da transferência de energia de ressonância foi demonstrada por Bambot *et al.* [95]. O sensor desenvolvido baseava-se na transferência de energia de um dador não-sensível ao pH (hidrazida de vermelho do Texas) para um aceitador sensível ao pH (azul de bromotimol), sendo a medida dos tempos de fluorescência do dador relacionada com o pH. Nguyen *et al.* [135] imobilizaram em filmes sol-gel um indicador fluorescente (carboxifluoresceína) pré-encapsulado em lipossomas. Desta forma obtiveram um sensor com excelente estabilidade em termos de lixiviação, elevada reprodutibilidade e sensibilidade a aproximadamente 0.01 unidades de pH, com resposta linear para valores de pH situados no intervalo 6.0-7.5. O tempo de resposta obtido, da ordem dos sub-segundos, indicou que a difusão de protões através da bicamada lipídica não retardava a resposta do sensor, que se mantinha dependente apenas da espessura do filme sol-gel. Malins e colaboradores [136] demonstraram a utilização de complexos protonáveis de polipiridil ruténio(II), imobilizados em filmes sol-gel, como sensores de fluorescência para monitorização do pH. Obtiveram sensores com resposta linear no intervalo de pH 3.0-9.0, capazes de detectar alterações de pH abaixo de 0.1 unidades e com interferência mínima por parte do oxigénio. Lobnik *et al.* [137] desenvolveram um sensor de pH com características interessantes, baseado na co-imobilização de azul de bromotimol e complexos luminescentes de európio em filmes sol-gel. O sensor apresentou resposta ao pH no intervalo 5.0–9.0, sem lixiviação e com excelente fotoestabilidade. A utilização de complexos luminescentes de európio e térbio, incorporando um cromóforo aromático, para obtenção de sensores de pH foi demonstrada por Blair *et al.* [138]. A imobilização dos complexos em filmes sol-gel resultou em sensores estáveis, robustos, com tempo de resposta de 100 segundos e apropriados para utilização no intervalo de pH 6.0–8.0. Num trabalho recente, Ertekin *et al.* [139] estudaram as propriedades de um derivado da azlactona, a 4-(*p*-N,N-dimetilaminofenilmetileno)-2-fenil-5-oxazolona (DPO), como indicador fluorescente de pH imobilizado em materiais sol-gel. Verificaram um aumento da sensibilidade após imobilização, com resposta linear no intervalo de pH 3.0–7.0 e pK_a de 5.1.

A facilidade de acoplamento dos filmes sol-gel a fibras ópticas ou guias de onda planas conduziu ao desenvolvimento de sensores de pH intrínsecos, apresentados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Sensores de pH baseados em filmes sol-gel associados a fibras ópticas.

INDICADOR	COMPOSIÇÃO DO FILME	INTERVALO DE RESPOSTA (PH)	REF.
Azul de bromofenol	TEOS + Triton X-100	2.0 – 12.0	[140]
Azul de bromofenol	TEOS	5.0 – 7.0	[141]
Azul de bromofenol	TEOS + MTES	3.0 – 8.0	[66,92]
Azul de bromofenol	TEOS	3.0 –6.0	[142]
Azul de bromofenol	TEOS	4.0 – 7.5	[143]
Azul de timol	TEOS	8.0 – 12.0	[144]
SNARF-1C	TMOS	6.8 – 8.0	[145]
Fluoresceína	TEOS	4.0 – 8.0	[146]
Fluoresceína	TEOS	3.0 - 10.0	[147]
Fluoresceína	Não indicado	7.0 - 11.0	[148]
Fluoresceína (FITC)	TEOS + APTES + PDMS Catálise alcalina	4.5 – 8.0	[149]
HPTS	TEOS + APTES + PDMS Catálise alcalina	6.0 – 8.5	[150]
α-naftolftaleína	TMOS + CTAB	4.0 –11.0	[151]
Púrpura de bromocresol	MTES	4.5 – 8.2	[91]
Vermelho de cresol	TEOS	6.5 – 11.0	[143]
Vermelho de fenol	TEOS	7.5 – 11.5	[143]

CTAB: brometo de cetiltrimetilamónio; FITC: isotiocianato de fluoresceína; HPTS: ácido hidroxipirenetrisulfónico; PDMS: polidimetilsiloxano; SNARF-1C: carboxilato de 1-seminaftor-odamina

Estes sensores apresentam resposta a intervalos de pH alargados e tempos de resposta reduzidos, em relação aos que não utilizam fibras ópticas. O sensor descrito por Suah *et al.* [140], baseado na imobilização de azul de bromofenol em filmes sol-gel e na utilização de redes neuronais para processamento do sinal, apresenta intervalo dinâmico de resposta ampliado (2.0-12.0 unidades de pH, em vez de 3.0-5.5 para o mesmo indicador em solução) e tempos de resposta compreendidos entre 15 e 150 segundos, dependendo do valor do pH e da quantidade de indicador imobilizado. O mesmo reagente, imobilizado em membranas sol-gel depositadas sobre fibras ópticas de plástico por Alvarado-Méndez e colaboradores [141], apresentou tempo de resposta de aproximadamente 10 segundos, sendo necessário utilizar apenas 2 cm da fibra dopada para medir o pH de um fluído em tempo real. A associação a fibras ópticas facilita ainda

a realização de determinações *in situ* e *in vivo*. Por exemplo, o sensor de SNARF-1C referido por Grant e Glass [145] foi desenvolvido especificamente para avaliação do pH no sangue e posterior integração num cateter, para monitorização de pacientes vítimas de enfarte. O sensor miniaturizado desenvolvido por McCulloch e Uttamchandani [147], baseado na imobilização de fluoresceína na ponta de uma fibra óptica submicrométrica, foi aplicado à monitorização do pH em meios biológicos.

A utilização de misturas de indicadores ácido-base imobilizados no mesmo filme sol-gel levou à obtenção de sensores com resposta linear em intervalos de pH alargados, de calibração simples e com sensibilidade e precisão constantes em todo o intervalo. Ding *et al.* [152] co-imobilizaram púrpura de bromocresol e verde de bromocresol num filme sol-gel depositado numa fibra óptica. Obtiveram um sensor com resposta linear para valores de pH compreendidos entre 3.0 e 9.0 e tempo de resposta de poucos segundos. Gupta e Sharma [153] desenvolveram um sensor de pH de onda evanescente com resposta alargada (4.5 a 13.0 unidades de pH), mediante a imobilização de uma mistura de três indicadores de pH (vermelho de cresol, azul de bromofenol e vermelho de clorofenol) na superfície do núcleo de uma fibra óptica, utilizando a tecnologia sol-gel. Lin e Liu [154] utilizaram uma estratégia similar, desenvolvendo adicionalmente um método para calcular as razões óptimas entre as concentrações dos indicadores co-imobilizados, tendo em conta a sua cor e os valores de ΔpK_a. Um sensor preparado desta forma pela mistura de quatro indicadores (verde de bromocresol, púrpura de bromocresol, vermelho de fenol e azul de timol) produziu resposta linear num intervalo de 4.5 unidades de pH (de 4.3 a 8.8), enquanto que com uma mistura de três indicadores (verde de bromocresol, púrpura de bromocresol e vermelho de fenol) se obteve resposta linear entre 6.3 e 9.8, ou seja, 3.5 unidades de pH. Lee e colaboradores [155] associaram fibras ópticas a revestimentos sol-gel contendo uma mistura de púrpura de bromocresol, verde de bromocresol e vermelho de cresol, obtendo um sensor de pH com resposta alargada, de 3.0 a 11.0 unidades de pH. Os mesmos autores demonstraram uma estratégia alternativa para obter sensores de pH mais robustos e com sensibilidade superior [156]: depositando sobre o núcleo de fibras ópticas várias camadas sobrepostas de filme sol-gel contendo o indicador de pH imobilizado, conseguiram sensores de onda evanescente com sensibilidade aumentada em 70%. Esta configuração foi testada para os indicadores púrpura de bromocresol e verde de bromocresol, tendo-se obtido intervalos de resposta a pH entre 7.5–10.5 e 6.5–9.5, respectivamente. Nos dois casos verificou-se um aumento do tempo de resposta proporcional ao número de camadas sol-gel, desde 5 segundos para sensores monocamada até 30 segundos para três camadas.

A imobilização de indicadores ácido-base em filmes sol-gel tem sido também utilizada para desenvolvimento de sensores ópticos destinados especificamente à determinação de valores elevados de acidez. Estes sensores encontram aplicação em processos industriais que envolvem elevadas concentrações de ácidos fortes, de grande poder poluente e corrosivo, constituindo uma alternativa rápida e económica às titulações clássicas. Allain *et al.* [157] imobilizaram púrpura de bromocresol em filmes sol-gel depositados sobre lâminas de vidro *Pyrex*, que foram utilizados para determinação de concentrações de HCl entre 1 e 11 M, com tempo de resposta de 1 segundo. Noiré *et al.* [158,159] desenvolveram um sensor óptico de onda evanescente para monitorização de HNO_3 (1-10 M) em sistemas de reprocessamento de combustível nuclear, baseado na imobilização de cianina cromoxano R em membranas sol-gel depositadas sobre fibras ópticas. Shamsipur e Azimi [160] utilizaram os indicadores rodamina B e safranina T, imobilizados em filmes sol-gel porosos, para implementação de sensores ópticos sensíveis a HCl e HNO_3, entre 1 e 9 M. Um sensor construído pela imobilização de vermelho de fenol em filmes sol-gel híbridos (TEOS co-polimerizado com PTES), depositados por *spin-coating* em suportes de vidro, foi proposto por Wang *et al.* [161] para monitorização de HCl em solução e/ou em fase gasosa, com limite de detecção inferior a 12 ppm, resposta linear no intervalo 0.01-6 M, tempo de resposta de 40 segundos e tempo de vida superior a um ano.

Recentemente, Carmona e colaboradores [162] demonstraram a aplicação deste tipo de sensores na monitorização da acidez ambiental, como uma ferramenta na conservação de objectos históricos e na prevenção da sua deterioração e degradação. Sensores ópticos baseados na imobilização de vermelho de clorofenol em filmes sol-gel foram aplicados à detecção de variações atmosféricas do pH e da concentração de SO_2 até 10 ppm. Garcia-Heras e colaboradores [163] desenvolveram também sensores optoquímicos para monitorização da acidez do ar. O indicador, ácido 2-[4-(dimetilamino)fenilazo]benzóico, foi imobilizado em filmes sol-gel, que foram posteriormente testados em vários locais da cidade de Cracóvia, na Polónia, tendo-se estabelecido uma relação entre a concentração de SO_2 atmosférico e a resposta dos sensores.

Outros sensores de pH têm sido optimizados especificamente para monitorização de amónia em fase gasosa, ou dissolvida em fluidos vários. Lobnik e Wolfbeis [164] imobilizaram aminofluoresceína em filmes sol-gel híbridos, preparados a partir da co-polimerização de TMOS com difenildimetilsiloxano, e aplicaram o sensor obtido à determinação contínua de amónia dissolvida, no intervalo 1-20 ppm. Malins *et al.* [165] desenvolveram um sensor de onda evanescente a partir da imobilização do indicador

púrpura de bromocresol em filmes de TEOS e MTES depositados sobre o núcleo de fibras ópticas; este sensor destinava-se à monitorização de amónia gasosa.

SENSORES DE OXIGÉNIO E OUTROS GASES

O desenvolvimento de sensores ópticos para oxigénio e outros analitos gasosos com base na tecnologia sol-gel tem atraído atenção considerável, uma vez que estes sensores são tipicamente rápidos, baratos e dificilmente sofrem contaminação [166]. A maioria dos sensores de oxigénio existentes baseiam-se na atenuação da fluorescência de espécies químicas apropriadas, como os complexos luminescentes dos metais de transição. Os complexos de ruténio são extensivamente utilizados, devido às suas características favoráveis: os seus estados de transferência de carga metal-ligando são caracterizados por emissões elevadas, possuem semi-vida de fluorescência alta e exibem forte absorção na região azul-verde do espectro. Neste âmbito destaca-se o trabalho pioneiro de McDonagh, McEvoy e MacCraith que, em colaboração com outros autores, desenvolveram um sensor baseado no complexo Ru(II)-tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina), ou $Ru(dpp)_3$ (cuja fluorescência é atenuada na presença do oxigénio) imobilizado em filmes sol-gel associados a fibras ópticas [66,96,167-172]. O sensor foi aplicado à determinação do oxigénio dissolvido (DO) e em fase gasosa. O longo período de fotoluminescência (aproximadamente 6μs) do complexo de ruténio, aliado à optimização da microestrutura do sol-gel (nomeadamente da hidrofobicidade e da porosidade da matriz) traduziu-se num sensor de elevada sensibilidade, com limite de detecção de 6 ppb, e tempo de resposta inferior a 5 segundos. A associação do sensor a componentes microelectrónicos de baixo custo resultou num dispositivo portátil com potencial comercial e passível de ser aplicado em situações várias, desde o controlo atmosférico até à monitorização da poluição de rios, por exemplo. Posteriormente, outros autores exploraram este e outros complexos de ruténio, nomeadamente o tris(bipiridil)ruténio(II) ou $Ru(bpy)_3$, assim como outros compostos orgânicos luminescentes para desenvolvimento de sensores sensíveis a oxigénio.

A tecnologia sol-gel tem sido também aplicada ao desenvolvimento de sensores ópticos para outras espécies em fase gasosa, como CO_2, CO e NO_2. Na Tabela 2.7 encontram-se resumidos os sensores para gases produzidos até à data com base em filmes sol-gel.

Tabela 2.7. Sensores ópticos para detecção de gases baseados na tecnologia sol-gel.

ANALITO	REAGENTE	OBS.	REF.
CO	Nanocristais NiO	Redução da abs. Vis-NIR das nanopartículas na presença de CO	[173]
CO_2	Piranina	-	[174]
CO_2	HPTS	Filme sol-gel recoberto por outro filme não-dopado, hidrofóbico	[150]
CO_2	HPTS	Aplicável à monitorização da embalagem de alimentos	[175]
CO_2	Azul de timol	-	[176]
H_2S	Tionina	-	[177]
I_2	-	Complexos de transferência de carga entre I_2 e grupos fenil do sol-gel modificado, depositado em guia de onda plana	[178]
NO	Cobalto-tetrakis(5-sulfotienil)porfina	-	[179]
NO_2	Azobenzeno	-	[180]
NO_2	$Ru(bpy)_3$	Interferência do O_2	[181]
NO_2	Acridina + reag. Saltzman	Irreversível	[181]
O_2	$Ru(dpp)_3$	-	[66]
O_2	Pireno	-	[182]
O_2	Platina octaetilporfirina	Tempo de resposta 5s; estabilidade 5 meses	[183,184]
O_2	Complexo ciclometalado de Pt(II)	-	[185]
O_2	$Al(ferron)_3$	FIA + fibras ópticas; dispositivo portátil para DO em rios, águas residuais e de torneira	[186]
O_2	$Ru(bpy)_3$	Regeneração com N_2 gasoso	[187]
O_2	$Ru(dpp)_3$	Tempo de resposta < 10 s	[188]
O_2	$Ru(dpp)_3$	-	[189]
O_2	Eritrosina B	Resposta linear para DO até 9.1 mg l^{-1}	[190]
O_2	Eritrosina B	-	[191]
O_2	$Ru(bpy)_3$	Aplicação *in vivo* em RMN	[192]
O_2	$Ru(bpy)_3$	FIA; determinação de O_2 em solventes orgânicos	[193]

$Al(ferron)_3$: quelato de alumínio e ácido tris(8-hidroxi-7-iodo-5-quinoleinosulfónico)

SENSORES PARA ESPÉCIES IÓNICAS

Os filmes sol-gel têm sido utilizados para desenvolvimento de sensores ópticos que respondem a iões metálicos, baseados na formação de complexos corados com diversos ligandos imobilizados (Tabela 2.8). A matriz sol-gel permite geralmente realizar estas determinações com sensibilidades muito elevadas, devido à sua natureza dupla: actua simultaneamente como elemento pré-concentrador, pela sua grande área de superfície, e realiza as reacções de detecção. O sucesso destes sensores implica que os ligandos imobilizados possuam um grau relativamente elevado de liberdade para se moverem ou reorientarem nos poros da matriz de modo a formarem complexos.

Tabela 2.8. Sensores ópticos para determinação de metais, baseados em indicadores imobilizados em filmes sol-gel.

METAL	REAGENTE	ZONA DE LINEARIDADE	LIMITE DETECÇÃO	REF.
Al^{3+}	Morina	4.0 – 2.0 ppm	-	[194]
Cd^{2+}	Ácido 8-hidroxiquinolina-5-sulfónico	-	< ppm	[195]
Cd^{2+}	TMPyP	$10^{-4} – 10^{-1}$ mol l^{-1}	-	[196]
Cu^{2+}	Eriocromo cianina R	-	0.1 ppm	[194]
Hg^{2+}	TPPS	-	2 μg l^{-1}	[197]
Hg^{2+}	TMPyP	$10^{-5} – 10^{-1}$ mol l^{-1}	10^{-6} mol l^{-1}	[196]
Pb^{2+}	Laranja de xilenol	50 nM – 50 mM	5.0 nM	[91]
Pb^{2+}	TMPyP	$10^{-5} – 10^{-3}$ mol l^{-1}	-	[196]

TMPyP: 5,10,15,20-tetra(4-*N*-metildipiridil)porfirina; TPPS: 5,10,15,20-tetra(*p*-sulfonatofenil)porfirina

Ertekin e colaboradores [198] propuseram a imobilização de compostos do grupo das esquaraínas em filmes sol-gel para desenvolvimento de sensores sensíveis a potássio. O composto escolhido foi o fluoroionóforo bis[4-*N*-(1-aza-4,7,10,13,16-pentaoxacilclo-octadecil)-3,5-diidroxifenil]esquaraína, e o sensor obtido revelou intervalo dinâmico de resposta para concentrações de K^+ entre 10^{-9} e 10^{-6} M, reversibilidade e tempo de resposta de 2 minutos.

Se bem que em menor escala, o processo sol-gel tem sido também aplicado ao desenvolvimento de sensores ópticos para determinação de espécies aniónicas. Um

sensor de cianeto foi desenvolvido por Dunuwila *et al.* [199] através da encapsulação de ferro(III)porfirina num filme de carboxilato de titânio obtido pelo processo sol-gel. O reagente difenilcarbazida foi aplicado, imobilizado em filmes sol-gel, à determinação de cromato, com limite de detecção de 1 ppb [200]. No entanto, este sensor apresentou tempo de resposta muito longo (vários minutos), uma vez que a reacção envolvida requeria a pré-extracção do cromato pelo brometo de cetilmetilamónio incorporado no filme sol-gel, redução de Cr(VI) a Cr(III) pela difenilcarbazida, e só depois a formação de um complexo de cor púrpura. Jiwan e Soumillion [201] desenvolveram um sensor para halogenetos (Cl^-, Br^- e I^-) baseado na encapsulação de um fluoróforo hidrofóbico, *N*-dodecil-6-metoxiquinolinio, num filme sol-gel depositado num substrato de vidro. A hidrofobicidade do reagente permitiu obter um sensor com lixiviação muito reduzida, capaz de medir concentrações de Cl^- nos níveis fisiológicos (100 mM), com tempo de resposta inferior a 1 segundo.

SENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE SOLVENTES

A tecnologia sol-gel tem sido utilizada para o desenvolvimento de sensores que permitem a monitorização contínua de solventes vários, com potenciais aplicações na indústria química, no controlo ambiental e na indústria alimentar.

Sensores ópticos para solventes miscíveis com a água têm sido referidos na literatura como alternativa aos métodos de espectrometria de massa. Simon *et al.* [202] investigaram a utilização de indicadores solvatocrómicos (amino-*N*-metilftalimida e verde de malaquite) imobilizados em filmes sol-gel para desenvolvimento de sensores ópticos para determinação de etanol em água. A interacção reversível com o etanol causava alteração das propriedades fluorescentes dos indicadores, com resposta linear entre 0-50% (vol.) de etanol, limite de detecção de 0.6% (vol.) de etanol em água e tempo de resposta de 5 minutos. Skrdla *et al.* [203] propuseram em 2002 um sensor integrado para determinação de álcool isopropílico em meio aquoso, baseado em guias de onda planas revestidas com um filme sol-gel contendo vermelho de metilo encapsulado. Este dispositivo revelou potencial para monitorização em linha, uma vez que apresentava tempos de resposta e de regeneração inferiores a 1 minuto e boa sensibilidade, com limite de detecção de 0.7% (v/v) e resposta linear de 1 a 100% (v/v) de álcool isopropílico em água.

Os materiais obtidos pelo processo sol-gel têm sido também aplicados no desenvolvimento de sensores ópticos para solventes orgânicos não-polares, em solução e em fase gasosa. Lu *et al.* [204] propuseram um sensor para detectar baixas

concentrações de benzeno em água, baseado na reflectância total atenuada e na espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR). Para tal depositaram sobre uma guia de onda um filme sol-gel hidrofóbico e mesoporoso, que extraia o analito da solução aquosa e o concentrava no seu interior, possibilitando grande sensibilidade e eliminando a interferência das bandas espectrais da água. Wallington *et al.* [194,205] imobilizaram β-ciclodextrina marcada com um fluoróforo em suportes sol-gel porosos. A ciclodextrina actua como um receptor molecular, contendo o fluoróforo na sua cavidade lipofílica; na presença de moléculas dos solventes não-polares, como o ciclo-hexano ou o tolueno, o grupo fluoróforo é deslocado, verificando-se uma redução da intensidade de fluorescência proporcional à concentração dos vapores do solvente, no intervalo 40-100 ppm. O sensor respondeu de forma irreversível e não-selectiva a diferentes solventes não-polares, permitindo contudo discriminá-los dos solventes polares, como a acetona, que não produziram resposta. Abdelghani e colaboradores [206] desenvolveram um sensor para detecção de vapores de tricloroetileno, tetracloreto de carbono, clorofórmio, diclorometano, propano, butano e hexano, com limites de detecção de 0.6, 1.5, 1.7, 4, 25, 10 e 5%, respectivamente. O sensor baseava-se na deposição de filmes sol-gel porosos em secções de fibras ópticas com o revestimento previamente removido; para um ângulo de incidência fixo, verificava-se variação da intensidade da luz transmitida através da fibra devido a adsorção à superfície da camada sol-gel das moléculas do vapor a detectar. Filmes sol-gel modificados com grupos fenil e associados a fibras ópticas foram utilizados por Abdelmalek e colaboradores [207] para detecção de vapores de compostos aromáticos e alcanos. O sensor desenvolvido mostrou-se eficaz na monitorização de xileno, benzeno, tolueno e hexano.

BIOSENSORES

A tecnologia sol-gel permite imobilizar de forma estável vários tipos de elementos de reconhecimento biológico (proteínas, enzimas, anticorpos, células), pelo que tem sido bastante utilizada para desenvolvimento de biosensores, com aplicações potenciais em áreas como o diagnóstico, a monitorização de parâmetros *in vivo*, a indústria alimentar, o controlo ambiental e a biotecnologia [101,208,209]. Na Tabela 2.9 são apresentados exemplos significativos de biosensores ópticos desenvolvidos por bioencapsulação de moléculas biológicas em filmes sol-gel.

Tabela 2.9. Biosensores ópticos baseados em elementos de reconhecimento biológico imobilizados em filmes sol-gel.

ELEMENTO BIOLÓGICO	ANALITO	REF.
Acetilcolinesterase e Organofosfato hidrolase	Organofosfatos	[210]
Acetilcolinesterase + FITC-dextrano	Acetilcolina e neurotoxinas organofosforadas	[211]
Citocromo c	NO e CO	[212]
Citocromo c	NO	[213]
Citocromo cd_1 nitrito reductase	Nitrito	[214]
Colesterol oxidase + Peroxidase	Colesterol	[215]
Colinesterase + Púrpura de bromocresol	Carbaril e dichlorvos	[216]
Concavalina-A marcada com FITC	Endotoxinas bacterianas	[217]
E. coli recombinante	DDT, aldicarb e malatião	[218]
Glucose oxidase	Glucose	[219]
Glucose oxidase marcada com derivado da fluoresceína	Glucose	[220]
Glucose oxidase + Ru(dpp)	Glucose	[221]
Glucose oxidase + DPO	Glucose	[222]
Glutationa *S*-transferase + Verde de bromocresol	Atrazina	[223]
Hemoglobina	NO e CO	[212]
Lactato desidrogenase	*L*-lactato	[224]
Lactato desidrogenase	Piruvato	[225]
Mioglobina	NO e CO	[212]
Nitrato reductase	Nitrato	[226]
Peroxidase	H_2O_2	[227]

FITC: isotiocianato de fluoresceína; DPO: 4-[*p*-*N*,*N*-dimetilamino)benzillideno]-2-feniloxazol-5-ona

Os materiais sol-gel, pela sua biocompatibilidade e inércia, constituem matrizes úteis para a concepção de sensores destinados à monitorização de entidades biológicas. Por exemplo, Kishen e colaboradores [228] desenvolveram um biosensor óptico destinado à monitorização de *streptococci mutans* na saliva humana. O sensor utilizava um indicador de pH, azul de bromofenol, imobilizado num filme sol-gel poroso depositado sobre o

núcleo de uma fibra óptica, que permitia acompanhar em tempo real a alteração do pH resultante da reacção com a sacarose mediada pelas bactérias.

OUTROS SENSORES

Além dos grupos mais representativos apresentados, o processo sol-gel tem servido de base ao desenvolvimento de sensores ópticos com potenciais aplicações em áreas diversas. Por exemplo, Lobnik e Cajlakovic [229] desenvolveram um sensor óptico sensível a peróxido de hidrogénio, com possível aplicação em processos industriais. O sensor baseava-se na imobilização do indicador azul de meldola em filmes sol-gel e exibiu boa selectividade, reversibilidade, tempo de resposta de 120 segundos e resposta linear para concentrações de peróxido de hidrogénio compreendidas entre 10^{-8} e 10^{-1} M. Wen-xu e Jian [230] propuseram a monitorização contínua do antibiótico adriamicina *in vivo*, utilizando um sensor de fibras ópticas. O indicador fluorescente 4-(N,N-dioctil)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol, cuja fluorescência é atenuada pelo antibiótico, foi imobilizado num filme sol-gel depositado na ponta de uma fibra óptica de 100 μm. Esta foi inserida por meio de um cateter na artéria carótida de coelhos, permitindo a determinação contínua de adriamicina no sangue, com limite de detecção de 0.057 μg ml^{-1}. Recentemente, Janotta *et al.* [231,232] demostraram a aplicação de filmes sol-gel organicamente modificados no desenvolvimento de sensores de onda evanescente na zona do infravermelho médio, para detecção de compostos aromáticos aminados em meio aquoso. Os dispositivos obtidos foram aplicados com sucesso à determinação dos pesticidas paratião, fenitroína, paraoxão e nitrobenzeno em águas de rios, em concentrações inferiores a ppm e com boa selectividade. Pela estabilidade e reprodutibilidade demonstradas, estes sensores são propostos pelos autores como uma alternativa viável aos biosensores para detecção de organofosfatos em análise ambiental.

O grande número de aplicações analíticas aqui referidas, muitas delas bastante recentes, ilustra bem o crescente interesse na tecnologia sol-gel para o desenvolvimento de sensores ópticos. A investigação nesta área coloca um ênfase cada vez maior nos parâmetros críticos para o desempenho dos sensores, como a estabilidade, a reversibilidade, o tempo de resposta e a selectividade, não se limitando à simples demonstração do potencial sensor. Para a grande maioria dos sensores referidos é

descrita a optimização em termos de estabilidade microestrutural, difusão, lixiviação e influência da humidade ambiental, entre outros parâmetros. Novas configurações, como dispositivos miniaturizados e sensores integrados baseados em guias de onda planas, são cada vez mais utilizadas e permitem alargar o leque de aplicações destes sensores. O uso de biosensores ópticos baseados no processo sol-gel é também cada vez mais relevante, com vantagens claras em relação a outros suportes poliméricos, que se reflectem no crescente número de aplicações referidas na literatura.

No entanto, alguns problemas críticos têm ainda que ser resolvidos, de forma a tornar viáveis a produção em massa e a comercialização dos sensores ópticos sol-gel. Grande parte dos dispositivos que aqui foram referidos apresentam uma ou mais limitações que inviabilizam o seu uso de modo contínuo, e a maioria deles, salvo os casos em que tal foi especificado, não foi aplicado a amostras reais ou a situações práticas. Muitos apresentam dados escassos sobre o desempenho analítico, apresentando apenas informação sobre a optimização e resultados preliminares. Portanto, parece haver ainda um longo caminho a percorrer. Após décadas de estudos fundamentalmente teóricos, dedicados à compreensão do processo sol-gel, a investigação nesta área terá agora que se direccionar para aplicações específicas, de modo a explorar devidamente todo o seu potencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J.D. Mackenzie, *J. Non-Cryst. Solids* 48 (1982) 1-10.
2. C.J. Brinker, G.W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*, Academic Press, San Diego, 1990.
3. A.C. Pierre, *Introduction to Sol-Gel Processing*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1998.
4. W. Geffcken, E. Bergen, Patente Alemã 736411, 6 Maio 1939.
5. H. Dislich, P. Hinz, *J. Non-Cryst. Solids* 48 (1982) 11-16.
6. I.M. Thomas, *Multicomponet Glasses from the Sol-gel Process*, in *Sol-gel Technology for Thin Films, Fibers, Preforms, Electronics, and Specialty Shapes*, ed. L.C. Klein, Noyes Publications, Park Ridge, 1988, pp. 2-15.
7. H. Dislich, *Ang. Chemie* 10 (1971) 363-370.
8. L. Levene, I.M. Thomas, U.S. Patent 3,640,093, 8 Fevereiro 1972.
9. J. Zarzycki, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 17-22.
10. D.R. Uhlmann, G. Teowee, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 153-162.
11. L.L. Hench, J.K. West, *Chem. Rev.* 90 (1990) 33-72.
12. U. Schubert, N. Hüsing, A. Lorenz, *Chem. Mater.* 7 (1995) 2010-2027.
13. J. Livage, *Curr. Opin. in Solid State & Mat. Sci.* 2 (1997) 132-138.
14. K. Maruszewski, W. Strek, M. Jasiorski, A. Ucyk, *Radiation Effects & Defects in Solids* 158 (2003) 439-450.
15. *Sol-gel Technology for Thin Films, Fibers, Preforms, Electronics, and Specialty Shapes*, ed. L.C. Klein, Noyes Publications, Park Ridge, 1988.
16. R. Aelion, A. Loebel, F. Eirich, *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 5705-5712.
17. W.T. Grubb, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 3408-3414.
18. H. Schmidt, H. Scholze, A. Kaiser, *J. Non-Cryst. Solids* 63 (1984) 1-11.
19. P.J. Flory, *J. Am. Chem. Soc.* 63 (1941) 3083-3090.
20. W.H. Stockmayer, *J. Chem. Phys.* 11 (1943) 45-55.
21. O. Kinouchi Filho, M.A. Aegerter, *J. Non-Cryst. Solids* 105 (1988) 191-197.
22. A.I. Olemskoi, I. Krakovský, *Physica A* 291 (2001) 79-88.
23. E. Anglaret, A. Hasmy, R. Jullien, *Physical Rev. Lett.* 75 (1995) 4059-4062.
24. G.W. Scherer, *J. Non-Cryst. Solids* 100 (1988) 77-92.
25. J. Kim, H. Kim, H. Park, S. Hyun, *Appl. Surface Sci.* 169-170 (2001) 452-456.
26. C.J. Brinker, R. Sehgal, S.L. Hietala, R. Deshpande, D.M. Smith, D. Loy, C.S. Ashley, *J. Membrane Sci.* 94 (1994) 85-102.
27. W.L. Huang, S.H. Cui, K.M. Liang, S. R. Gu, Z.F. Yuan, *J. Colloid Interf. Sci.* 246 (2002) 129-134.

28. M.M. Collinson, *J. Electroanal. Chem.* 519 (2002) 65-71.
29. W.P. Lee, A.F. Routh, *Langmuir* 23 (2004) 9885-9888.
30. C. Rottman, M. Ottolenghi, R. Zusman, O. Lev, M. Smith, G. Cong, M.L. Kagan, D. Avnir, *Mater. Lett.* 13 (1992) 293-298.
31. G. Orcel, L. Hench, *J. Non-Cryst. Solids* 79 (1986) 177-194.
32. T. Adachi, S. Sakka, *J. Non-Cryst. Solids* 99 (1988) 118-128.
33. H. Shiomi, C. Kakimoto, A. Nakahira, S. Takeda, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 19 (2000) 759-763.
34. R.F.S. Lenza, W.L. Vasconcelos, *J. Non-Cryst. Solids* 330 (2003) 216-225.
35. A.C. Pierre, G.M. Pajonk, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4243-4265.
36. A. Matsuda, Y. Matsuno, M. Tatsumisago, T. Minami, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 20 (2001) 129-134.
37. G.W. Scherer, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 353-363.
38. F. Ribot, P. Toledano, C. Sanchez, *Chem. Mater.* 3 (1991) 759.
39. J. Wen, G.L. Wilkes, *Chem. Mater.* 8 (1996) 1667-1681.
40. G. Guzman, R. Morineau, J. Livage, *Mat. Res. Bull.* 29 (1994) 509-515.
41. I.A. Montoya, T. Viveros, J.M. Dominguez, L.A. Canales, I. Schifter, *Catalysis Lett.* 15 (1992) 201-217.
42. H.K. Schmidt in *Better Ceramics Through Chemistry*, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 180, eds. B.J.J. Zelinski, C.J. Brinker, D.E. Clark, D.R. Ulrich, Materials Research Society, Pittsburgh, 1990, pp. 961-973.
43. J.D. Mackenzie, E.P. Bescher, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 371-377.
44. M.M. Collinson, *Mikrochim. Acta* 129 (1998) 149-165.
45. G. Schottner, *Chem. Mater.* 13 (2001) 3422-3435.
46. M.M. Collinson, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 30-38.
47. P.C. Pandey, S. Upadhyay, B.C. Upadhyay, V.S. Tripathi, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 33 (2005) 25-32.
48. A.V. Rao, M.M. Kulkarni, *Mat. Res. Bull.* 2028 (2002) 1-11.
49. P. Innocenzi, M.O. Abdirashid, M. Guglielmi, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 3 (1994) 47-55.
50. A. Jitianu, A. Britchi, C. Deleanu, V. Badescu, M. Zaharescu, *J. Non-Cryst. Solids* 319 (2003) 263-279.
51. J.S. Beck, J.C. Vartuli, G.J. Kennedy, C.T. Kresge, W.J. Roth, S.E. Schramm, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1816-1821.
52. A. Vainrub, F. Devreux, J.P. Boilot, F. Chaput, M. Sarkar, *Mat. Sci. Eng. B* 37 (1996) 197-200.
53. V.R. Kaufman, D. Avnir, *Langmuir* 2 (1986) 717-722.
54. S.E. Rankin, C.W. Macosko, A.V. McCormick, *AIChE Journal* 44 (1998) 1141-1156.
55. R.J. Hook, *J. Non-Cryst. Solids* 195 (1996) 1-15.
56. C.J. Brinker, *J. Non-Cryst. Solids* 100 (1988) 31-50.
57. M.A. Fardad, *J. Mat. Sci.* 35 (2000) 1835-1841.
58. J.C.G. Pereira, C.R.A. Catlow, G.D. Price, *Chem. Commun.* (1998) 1387-1388.

59. A. Fidalgo, L.M. Ilharco, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 26 (2003) 357-362.
60. L.L. Hench, G. Orcel, *J. Non-Cryst. Solids* 82 (1986) 1-10.
61. D. Niznansky, J.L. Rehspringer, *J. Non-Cryst. Solids* 180 (1995) 191-196.
62. G. Orcel, L.L. Hench, I. Artaki, J. Jonas, T.W. Zerda, *J. Non-Cryst. Solids* 105 (1988) 223-231.
63. E. Blanco, L. Esquivias, R. Litrán, M. Piñero, M. Ramírez-del-Solar, N. de la Rosa-Fox, *Appl. Organometal. Chem.* 13 (1999) 399-418.
64. D. Donatti, A.I. Ruiz, D.R. Vollet, *Ultrasonics Sonochem.* 9 (2002) 133-138.
65. H. Dislich, *Thin Films from the Sol-Gel Process*, in *Sol-Gel Technology for Thin Films, Fibers, Preforms, Electronics and Specialty Shapes*, ed. L.C. Klein, Noyes Publications, Park Ridge, 1988, pp. 50-77.
66. B.D. MacCraith, C.M. McDonagh, G. O'Keeffe, A.K. McEvoy, T. Butler, F.R. Sheridan, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 51-57.
67. D.R. Uhlman, T. Suratwala, K. Davidson, J.M. Boulton, G. Teowee, *J. Non-Cryst. Solids* 218 (1997) 113-122.
68. D.B. Mitzi, *Chem. Mater.* 13 (2001) 3283-3298.
69. L. Yang, S.S. Saavedra, N.R. Armstrong, J. Hayes, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1254-1263.
70. J.D. Mackenzie, E. Bescher, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 27 (2001) 7-14.
71. A.J. Hurd, C.J. Brinker in *Better Ceramics Through Chemistry*, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 180, eds. B.J.J. Zelinski, C.J. Brinker, D.E. Clark, D.R. Ulrich, Materials Research Society, Pittsburgh, 1990, pp. 575-581.
72. C.J. Brinker, A.J. Hurd, P.R. Schunk. G.C. Frye, C.S. Ashley, *J. Non-Cryst. Solids* 147-148 (1992) 424-436.
73. M.H. Huang, H.M. Soyez, B.S. Dunn, J.I. Zink, *Chem. Mater.* 12 (2000) 231-235.
74. J.D. Jordan, R.A. Dunbar, D.J. Hook, H. Zhuang, J.A. Gardella Jr., L.A. Colón, F.V. Bright, *Chem. Mater.* 10 (1998) 1041-1051.
75. T.J. Garino in *Better Ceramics Through Chemistry*, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 180, eds. B.J.J. Zelinski, C.J. Brinker, D.E. Clark, D.R. Ulrich, Materials Research Society, Pittsburgh, 1990, pp. 497-502.
76. M. Guglielmi, S. Zenezini, *J. Non-Cryst. Solids* 121 (1990) 303-309.
77. M. Klotz, A. Ayral, C. Guizard, L. Cot, *Bull. Korean. Chem. Soc.* 20 (1999) 879-884.
78. P.M. Glaser, C.G. Pantano, *J. Non-Cryst. Solids* 63 (1984) 209-221.
79. M.A. Fardad, E.M. Yeatman, E.J.C. Dawnay, M. Green, F. Horowitz, *J. Non-Cryst. Solids* 183 (1995) 260-267.
80. O. Lev, *Analusis* 20 (1992) 543-553.
81. J. Lin, C.W. Brown, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 200-211.
82. L.L. Hench, J. Wilson in *Better Ceramics Through Chemistry*, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 180, eds. B.J.J. Zelinski, C.J. Brinker, D.E. Clark, D.R. Ulrich, Materials Research Society, Pittsburgh, 1990, pp. 1061-1071.

83. M.M. Collinson, *Critical Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 289-311.
84. R. Reisfeld, *Optical Mat.* 16 (2001) 1-7.
85. L.L. Hench, *Curr. Op. Solid State Mat. Sci.* 2 (1997) 604-610.
86. S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *J. Membr. Sci.* 202 (2002) 73-80.
87. H. Böttcher, *J. Prakt. Chem.* 342 (2000) 427-436.
88. B.D. MacCraith, C. McDonagh, A.K. McEvoy, T. Butler, G. O'Keeffe, V. Murphy, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 1053-1061.
89. P. Lavin, C.M. McDonagh, B.D. MacCraith, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 641-645.
90. A. Lobnik, I. Oehme, I. Murkovic, O.S. Wolfbeis, *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 159-165.
91. L. Yang, S.S. Saavedra, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1307-1314.
92. T.M. Butler, B.D. MacCraith, C. McDonagh, *J. Non-Cryst. Solids* 224 (1998) 249-258.
93. P.S. Skrdla, S.S. Saavedra, N.R. Armstrong, *Appl. Spectrosc.* 53 (1999) 785-791.
94. M.D. Senarath-Yapa, S.S. Saavedra, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 89-94.
95. S.B. Bambot, J. Sipior, J.R. Lakowicz, G. Rao, *Sens. Actuators B* 22 (1994) 181-188.
96. C. McDonagh, P. Bowe, K. Mongey, B.D. MacCraith, *J. Non-Cryst. Solids* 306 (2002) 138-148.
97. B.C. Dave, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1120A-1127A.
98. O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, J. Gun, *Anal. Chem.* 67 (1995) 22A-30A.
99. B.C. Dave, J.M. Miller, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 629-634.
100. B. Dunn, J.M. Miller, B.C. Dave, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Acta Mater.* 46 (1998) 737-741.
101. I. Gill, A. Ballesteros, *TIBTECH* 18 (2000) 282-296.
102. D. Avnir, D. Levy, R. Reisfeld, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 5956-5959.
103. B. Dunn, J.I. Zink, *J. Mater. Chem.* 1 (1991) 903-913.
104. G.E. Badini, K.T.V. Grattan, A.C. Tseung, A.W. Palmer, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 6 (1996) 269-272.
105. C. Rottman, A. Turniansky, D. Avnir, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 17-25.
106. A. Lobnik, O.S. Wolfbeis, *Analyst* 123 (1998) 2247-2250.
107. M.A. Villegas, L. Pascual, *J. Mater. Sci.* 35 (2000) 4615-4619.
108. T. Keeling-Tucker, J.D. Brennan, *Chem. Mater.* 13 (2001) 3331-3350.
109. A. Lobnick, O.S. Wolfbeis, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 20 (2001) 303-311.
110. C.R. Viteri, J.W. Gilliland, W.T. Yip, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1980-1987.
111. M. Casalboni, R. Senesi, P. Prosposito, F. De Matteis, R. Pizzoferrato, *Appl. Phys. Lett.* 70 (1997) 2969-2971.
112. N.A.J.M. Sommerdijk, J.D. Wright, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 565-568.
113. A.M. Bardo, M.M. Collinson, D.A. Higgins, *Chem. Mater.* 13 (2001) 2713-2721.
114. B. Dunn, J.I. Zink, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2280-2291.
115. G. Puccetti, R.M. Leblanc, *J. Non-Cryst. Solids* 258 (1999) 57-69.

116. J.D. Wright, N.A.C. Higginson, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 201-208.
117. H. Wang, A.M. Bardo, M.M. Collinson, D.A. Higgins, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 7231-7237.
118. W. Jin, J.D. Brennan, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 1-36.
119. J. Livage, T. Coradin, C. Roux, *J. Phys.: Condens. Matter* 13 (2001) R673-R691.
120. D.T. Nguyen, M. Smith, B. Dunn, J.I. Zink, *Chem. Mater.* 14 (2002) 4300-4306.
121. J.M. Miller, B. Dunn, J.S. Valentine. J.I. Zink, *J. Non-Cryst. Solids* 202 (1996) 279-289.
122. B.C. Dave, H. Soyez, J.M. Miller, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Chem. Mater.* 7 (1995) 1431-1434.
123. D.S. Gottfried, A. Kagan, B.M. Hoffman, J. M. Friedman, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 2803-2807.
124. Q. Chen, G.L. Kenausis, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 4582-4584.
125. J. Heller, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 4586-4590.
126. K.K. Flora, J.D. Brennan, *Chem. Mater.* 13 (2001) 4170-4179.
127. G.A. Baker, J.D. Jordan, F.V. Bright, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 11 (1998) 43-54.
128. M.A. Villegas, M.A. García, S.E. Paje, J. Llopis, *J. Eur. Ceramic Soc.* 22 (2002) 1475-1482.
129. M.A. Villegas, L. Pascual, S.E. Paje, M.A. García, J. Llopis, *J. Eur. Ceramic Soc.* 20 (2000) 1621-1628.
130. F. Ismail, C. Malins, N.J. Goddard, *Analyst* 127 (2002) 253-257.
131. R. Makote, M.M. Collinson, *Anal. Chim. Acta* 394 (1999) 195-200.
132. E. Wang, K. Chow, V. Kwan, T. Chin, C. Wong, A. Bocarsly, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 45-50.
133. M.A. Villegas, L. Pascual, *Thin Solid Films* 351 (1999) 103-108.
134. M. García-Heras, C. Gil, N. Carmona, J. Faber, K. Kromka, M.A. Villegas, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 147-152.
135. T. Nguyen, K.P. McNamara, Z. Rosenzweig, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 45-54.
136. C. Malins, H.G. Glever, T.E. Keyes, J.G. Vos, W.J. Dressick, B.D. MacCraith, *Sens. Actuators B* 67 (2000) 89-95.
137. A. Lobnik, N. Majcen, K. Niederreiter, G. Uray, *Sens. Actuators B* 74 (2001) 200-206.
138. S. Blair, M.P. Lowe, C.E. Mathieu, D. Parker, P.K. Senanayake, R. Kataky, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 5860-5867.
139. K. Ertekin, C. Karapire, S. Alp, B, Yenigül, S. Içli, *Dyes and Pigments* 56 (2003) 125-133.
140. F.B.M. Suah, M. Ahmad, M.N. Taib, *Sens. Actuators B* 90 (2003) 182-188.
141. E. Alvarado-Méndez, R. Rojas-Laguna, J.A. Andrade-Lucio, D. Hernández-Cruz, R.A. Lessard, J.G. Aviña-Cervantes, *Sens. Actuators B* 106 (2005) 518-522.
142. J.E. Lee, S.S. Saavedra, *Anal. Chim. Acta* 285 (1994) 265-269.
143. B.D. Gupta, D.K. Sharma, *Optics Commun.* 140 (1997) 32-35.
144. O.B. Miled, H.B. Ouada, J. Livage, *Mat. Sci. Eng. C* 21 (2002) 183-188.
145. S.A. Grant, R.S. Glass, *Sens. Actuators B* 45 (1997) 35-42.

146. C.A. Browne, D.H. Tarrant, M.S. Olteanu, J.W. Mullens, E.C. Chronister, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2289-2295.

147. S. McCulloch, D. Uttamchandani, *IEEE Proc.-Sci. Meas. Technol.* 144 (1997) 241-246.

148. P.A. Wallace, M. Campbell, Y. Yang, A.S. Holmes-Smith, M. Uttamalal, *J. Luminescence* 72-74 (1997) 1017-1019.

149. D.A. Nivens, Y. Zhang, S. Michael Angel, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 235-245.

150. D.A. Nivens, M.V. Schiza, S. Michael Angel, *Talanta* 58 (2002) 543-550.

151. O. Ben-David, E. Shafir, I. Gilath, Y. Prior, D. Avnir, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2255-2257.

152. J.Y. Ding, M.R. Shahriari, G.H. Sigel, *Electron. Lett.* 27 (1991) 1560-1562.

153. B.D. Gupta, S. Sharma, *Optics Commun.* 154 (1998) 282-284.

154. J. Lin, D. Liu, *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 49-55.

155. S.T. Lee, B. Aneeshkumar, P. Radhakrishnan, C.P.G. Vallabhan, V.P.N. Nampoori, *Optics Commun.* 205 (2002) 253-256.

156. S.T. Lee, J. Gin, V.P.N. Nampoori, C.P.G. Vallabhan, N.V. Unnikrishnan, P. Radhakrishnan, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* 3 (2001) 355-359.

157. L.R. Allain, K. Sorasaenee, Z. Xue, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3076-3080.

158. M.H. Noiré, C. Bouzon, L. Couston, J. Gontier, P. Marty, D. Pouyat, *Sens. Actuators B* 51 (1998) 214-219.

159. M.H. Noiré, L. Couston, E. Douarre, D. Pouyat, C. Bouzon, P. Marty, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 17 (2000) 131-136.

160. M. Shamsipur, G. Azimi, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1603-1616.

161. E. Wang, K. Chow, W. Wang, C. Wong, C. Yee, A. Persad, J. Mann, A. Bocarsly, *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 301-306.

162. N. Carmona, M.A. Villegas, J.M.F. Navarro, *Sens. Actuators A* 116 (2004) 398-404.

163. M. Garcia-Heras, K. Kromka, J. Faber, P. Karaszkiewicz, M.A. Villegas, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3743-3747.

164. A. Lobnik, O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* 51 (1998) 203-201.

165. C. Malins, T.M. Butler, B.D. MacCraith, *Thin Solid Films* 368 (2000) 105-110.

166. A. Wilson, J.D. Wright, J.J. Murphy, M.A.M. Stroud, S.C. Thorpe, *Sens. Actuators B* 19 (1994) 506-510.

167. B.D. MacCraith, C.M. McDonagh, G. O'Keefe, E.T. Keyes, J.G. Vos, B. O'Kelly, J.F. McGilp, *Analyst* 118 (1993) 385-388.

168. G. O'Keefe, B.D. MacCraith, A.K. McEvoy, C.M. McDonagh, J.F. McGilp, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 226-230.

169. A.K. McEvoy, C.M. McDonagh, B.D. MacCraith, *Analyst* 121 (1996) 785-788.

170. A.K. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 1121-1125.

171. C. McDonagh, B.D. MacCraith, A.K. McEvoy, *Anal. Chem.* 70 (1998) 45-50.

172. C.M. McDonagh, A.M. Shields, A.K. McEvoy, B.D. MacCraith, J.F. Gouin, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13 (1998) 207-211.

173. A. Martucci, N. Bassiri, M. Guglielmi, L. Armelao, S. Gross, J.C. Pivin, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 26 (2003) 993-996.

174. C. Malins, B.D. MacCraith, *Analyst* 123 (1998) 2373-2376.

175. C. von Bültzingslöwen, A.K. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, I. Klimant, C. Krause, O.S. Wolfbeis, *Analyst* 127 (2002) 1478-1483.

176. H. Segawa, E. Ohnishi, Y. Arai, K. Yoshida, *Sens. Actuators B* 94 (2003) 276-281.

177. U.M. Noor, D. Uttamchadani, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 11 (1998) 177-183.

178. L. Yang, S.S. Saavedra, N.R. Armstrong, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1834-1841.

179. K. Eguchi, T. Hashiguchi, K. Sumiyoshi, H. Arai, *Sens. Actuators B* 1 (1990) 154-157.

180. O. Worsfold, C. Malins, M.G. Forkan, I.R. Peterson, B.D. MacCraith, D.J. Walton, *Sens. Actuators B* 56 (1999) 15-21.

181. S.A. Grant, J.H. Satcher Jr., K. Bettencourt, *Sens. Actuators B* 69 (2000) 132-137.

182. R.A. Dunbar, J.D. Jordan, F.V. Bright, *Anal. Chem.* 68 (1998) 604-610.

183. S.K. Lee, I. Okura, *Analyst* 122 (1997) 81-84.

184. S.K. Lee, I. Okura, *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 181-188.

185. Y. Ma, T. Cheung, C. Che, J. Shen, *This Solid Films* 333 (1998) 224-227.

186. J.M. Costa-Fernandéz, N. Bordel, J.C. Campo, F.J. Ferrero, M.A. Pérez, A. Sanz-Medel, *Mikrochim. Acta* 134 (2000) 145-152.

187. M. Ahmad, N. Mohammad, J. Abdullah, *J. Non-Cryst. Solids* 290 (2001) 86-91.

188. S.K. Lee, Y.B. Shin, H.B. Pyo, S.H. Park, *Chem. Lett.* 4 (2001) 310-311.

189. Y. Tang, E.C. Tehan, Z. Tao, F.V. Bright, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2407-2413.

190. R.T. Bailey, F.R. Cruickshank, G. Deans, R.N. Gillanders, M.C. Tedford, *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 101-108.

191. R.N. Gillanders, M.C. Tedford, P.J. Crilly, R.T. Bailey, *J. Photochem. Photobiol. A* 163 (2004) 193-199.

192. P.A.S. Jorge, P. Caldas, C.C. Rosa, A.G. Oliva, J.L. Santos, *Sens. Actuators B* 103 (2004) 290-299.

193. E.A. García, R.G. Fernández, M.E. Díaz-García, *Microp. Mesop. Mat.* 77 (2005) 235-239.

194. S. Wallington, T. Labayen, A. Poppe, N.A.J.M. Sommerdijk, J.D. Wright, *Sens. Actuators B* 38-39 (1997) 48-52.

195. R. Reisfeld, D. Shamrakov, *Sens. Mater.* 8 (1996) 439-443.

196. D. Delmarre, R. Méallet, C. Bied-Charreton, R.B. Pansu, *J. Photochem. Photobiol. A* 124 (1999) 23-28.

197. M. Plaschke, R. Czolk, H.J. Ache, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 107-113.

198. K. Ertekin, B. Yenigul, E.U. Akkaya, *J. Fluorescence* 12 (2002) 263-268.

199. D.D. Dunuwila, B.A. Torgerson, C.K. Chang, K.A. Berglund, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2739-2799.

200. M. Zevin, R. Reisfeld, I. Oehme, O.S. Wolfbeis, *Sens. Actuators B* 38-39 (1997) 235-238.

201. J.L.H. Jiwan, J.P. Soumillion, *J. Non-Cryst. Solids* 220 (1997) 316-322.

202. D.N. Simon, R. Czolk, H.J. Ache, *Thin Solid Films* 260 (1995) 107-110.
203. P.J. Skrdla, S.B. Mendes, N.R. Armstrong, S.S. Saavedra, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 24 (2002) 167-173.
204. Y. Lu, L. Han, C.J. Brinker, T.M. Niemczyk, G.P. Lopez, *Sens. Actuators B* 35-36 (1996) 517-521.
205. S. Wallington, C. Pilon, J.D. Wright, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 1127-1132.
206. A. Abdelghani, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, M. Lacroix, H. Gagnaire, C. Veillas, B. Berkova, M. Chomat, V. Matejec, *Sens. Actuators B* 44 (1997) 495-498.
207. F. Abdelmalek, J.M. Chovelon, M. Lacroix, N. Jaffrezic-Renault, V. Matejec, *Sens. Actuators B* 56 (1999) 234-242.
208. D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, *Chem. Mater.* 6 (1994) 1605-1614.
209. I. Gill, *Chem. Mater.* 13 (2001) 3404-3421.
210. A.K. Singh, A.W. Flounders, J.V. Volponi, C.S. Ashley, K. Wally, J.S. Schoeniger, *Biosens. Bioelectron.* 14 (1999) 703-713.
211. R. Doong, H. Tsai, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 239-246.
212. D.J. Blyth, J.W. Aylott, D.J. Richardson, D.A. Russell, *Analyst* 120 (1995) 2725-2730.
213. J.W. Aylott, D.J. Richardson, D.A. Russell, *Chem. Mater.* 9 (1997) 2261-2263.
214. S. Ferretti, S.K. Lee, B.D. MacCraith, A.J. Oliva, D.J. Richardson, D.A. Russell, K.E. Sapsford, M. Vidal, *Analyst* 125 (2000) 1993-1999.
215. A. Kumar, R. Malhotra, B.D. Malhotra, S.K. Grover, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 43-50.
216. V.G. Andreou, Y.D. Clonis, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 61-69.
217. A. Hreniak, K. Maruszewski, J. Rybka, A. Gamian, J. Czyzewski, *Optical Mat.* 26 (2004) 141-144.
218. J.R. Premkumar, R. Rosen, S. Belkin, O. Lev, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 11-23.
219. U. Narang, P.N. Prasad, F.V. Bright, K. Ramanathan, N.D. Kumar, B.D. Malhotra, M.N. Kamalasanan, S. Chandra, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3139-3244.
220. S. de Marcos, J. Galindo, J.F. Sierra, J. Galbán, J.R. Castillo, *Sens. Actuators B* 57 (1999) 227-232.
221. O.S. Wolfbeis, I. Oheme, N. Papkovskaya, I. Klimant, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 69-76.
222. K. Ertekin, S. Cinar, T. Aydemir, S. Alp, *Dyes and Pigments* 67 (2005) 133-138.
223. V.G. Andreou, Y.D. Clonis, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 151-161.
224. C. Li, Y. Lin, C. Shih, J. Tsaur, L. Chau, *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 323-330.
225. K. Ramanathan, M.N. Kamalasanan, B.D. Malhotra, D.R. Pradhan, S. Chandra, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 10 (1997) 309-316.
226. J.W. Aylott, D.J. Richardson, D.A. Russell, *Analyst* 122 (1997) 77-80.
227. K. Wang, J. Li, X. Yang, F. Shen, X. Wang, *Sens. Actuators B* 65 (2000) 239-240.
228. A. Kishen, M.S. John, C.S. Lim, A. Asundi, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 1371-1378.
229. A. Lobnik, M. Cajlakovic, *Sens. Actuators B* 74 (2001) 194-199.
230. L. Wen-xu, C. Jian, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1458-1462.

231. M. Janotta, M. Karlowatz, F. Vogt, B. Mizaikoff, *Anal. Chim. Acta* 496 (2003) 339-348.

232. M. Janotta, A. Katzir, B. Mizaikoff, *Appl. Spectrosc.* 57 (2003) 823-828.

Capítulo III

ASPECTOS GLOBAIS DA PARTE EXPERIMENTAL

3.1 OBJECTIVOS

O desenvolvimento de sensores ópticos sofreu uma grande expansão nas últimas décadas, explorando novas configurações e materiais inovadores. No entanto, a generalização da sua utilização prática e a obtenção de dispositivos comercialmente viáveis é ainda limitada pela necessidade de melhoramentos ao nível da fiabilidade, robustez, estabilidade, dimensão, custos e facilidade de miniaturização. Neste contexto, o recurso aos materiais sol-gel como matrizes de suporte, particularmente sob a forma de filmes finos, tem revelado vantagens únicas, discutidas no capítulo anterior. Adicionalmente, a associação a sistemas automáticos que permitam simplificar de modo significativo os procedimentos analíticos pode potenciar o desempenho destes sensores.

O trabalho de investigação que integra esta dissertação, e que é descrito em pormenor nos capítulos seguintes, consistiu no desenvolvimento de novos sensores ópticos e sua aplicação no controlo farmacêutico e em química clínica. Tendo em conta estes objectivos, o trabalho realizado pode ser dividido em três etapas complementares:

1. Imobilização de agentes de reconhecimento (bio)químico em filmes sol-gel;
2. Estudo da morfologia dos filmes obtidos e respectiva optimização, com vista ao desenvolvimento de sensores com características óptimas;
3. Incorporação dos sensores desenvolvidos em sistemas de fluxo contínuo e implementação de procedimentos analíticos para análise de amostras farmacêuticas e biológicas.

Neste capítulo são abordados todos os procedimentos laboratoriais gerais utilizados na preparação de sensores ópticos, bem como as linhas de orientação seguidas na sua optimização e as metodologias de avaliação da qualidade dos sensores obtidos. É ainda descrita a montagem base utilizada para implementação de sistemas automáticos de fluxo contínuo integrando os sensores, e são referidos os estudos conducentes à avaliação do desempenho das metodologias propostas.

3.2

DESENVOLVIMENTO E OPTIMIZAÇÃO DE SENSORES ÓPTICOS BASEADOS EM FILMES SOL-GEL

O desenvolvimento dos sensores ópticos propostos nesta dissertação envolveu a imobilização de agentes de reconhecimento (bio)químico em filmes sol-gel, tendo-se procedido ao estudo sistemático das variáveis que influenciam esta tecnologia, de forma a adquirir a compreensão necessária dos processos químicos e assim produzir sensores com características melhoradas. Os protocolos gerais propostos e estudados para a preparação das membranas sensoras encontram-se esquematizados na Fig. 3.1 e são descritos em detalhe nos pontos seguintes.

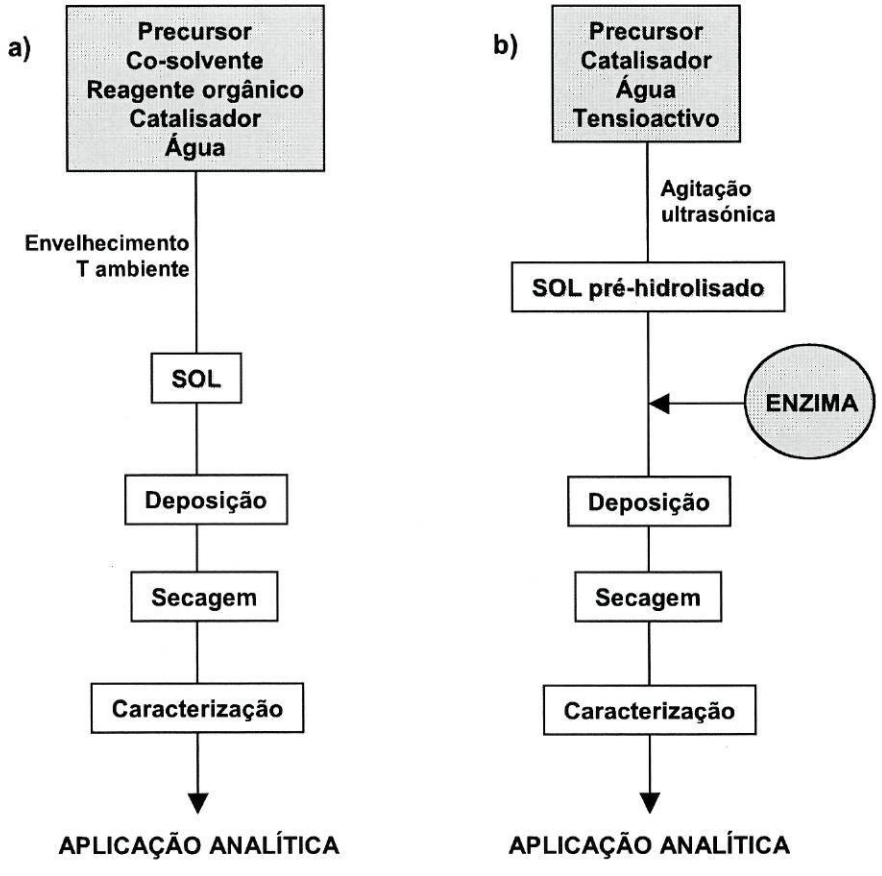


Figura 3.1. Protocolos de preparação de filmes sol-gel para aplicação como sensores ópticos, baseados em: a) imobilização de um reagente orgânico; b) imobilização de uma enzima.

3.2.1. Preparação de soluções sol-gel

No decurso de todo o trabalho conducente à preparação dos filmes sol-gel foram utilizados reagentes de qualidade analítica ou equivalente, sem qualquer tratamento de purificação adicional. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água bi-desionizada, de resistividade igual ou superior a 18 MΩ.cm, obtida a partir de um sistema da marca Millipore, modelo MilliQ-RG. Na medição rigorosa de volumes até 5 ml foram utilizadas pipetas automáticas da marca Gilson, modelos P20, P100, P1000 e P5000. As pesagens de reagentes sólidos foram realizadas numa balança analítica Mettler Toledo, modelo AG285, com sensibilidade de 0,00001 g. Para agitação ultrasónica foi utilizado um banho de ultrasons J.P. Selecta, modelo Ultrasons-H. Todo o material empregue no processo de preparação dos filmes sol-gel foi alvo de tratamento prévio de descontaminação por imersão em solução de ácido nítrico 10% (v/v), seguido de lavagem adequada com água desionizada. Para preparação de soluções de concentração rigorosa foi utilizado material de vidro de classe A ou similar, enquanto que as reacções de hidrólise e condensação dos monómeros foram levadas a cabo em recipientes de *teflon*, de modo a evitar a reacção entre o sol-gel e a superfície de vidro.

IMOBILIZAÇÃO DE REAGENTES ORGÂNICOS

Nos Capítulos IV e V são apresentados sensores para determinação de espécies catiónicas em amostras farmacêuticas e biológicas, desenvolvidos com base na imobilização de agentes susceptíveis de formar complexos corados com metais. No Capítulo VI é descrito um biosensor que utiliza como transdutor óptico um filme sol-gel dopado com um indicador de pH. Para imobilização destes indicadores orgânicos foi adoptado um protocolo geral, que consistiu na mistura de um precursor (alcóxido de silício) com um catalisador em solução aquosa e um co-solvente, contendo dissolvido o indicador a imobilizar. Este sol inicial foi submetido a um período de envelhecimento, à temperatura ambiente e com agitação mecânica constante, após o que foi efectuada a deposição dos filmes num suporte físico inerte.

Durante o desenvolvimento dos sensores propostos foram utilizados diferentes alcóxidos precursores, quer isolados quer em combinação, como se indica na Tabela 3.1.

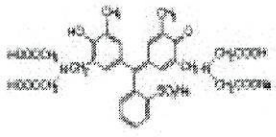
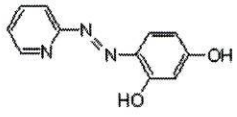
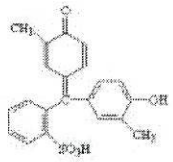
Tabela 3.1. Precursores utilizados para a preparação de filmes sol-gel, e respectivas propriedades físicas: peso molecular (PM), densidade (d), ponto de ebulição (PE) e índice de refracção (n_D).

PRECURSOR	FÓRMULA	PM	d (g cm^{-3})	PE (°C)	n_D
TEOS	$C_8H_{20}O_4Si$	208.33	0.933	163 - 167	1.381
TMOS	$C_4H_{12}O_4Si$	152.22	1.032	120 - 122	1.368
MTES	$C_7H_{18}O_3Si$	178.31	0.895	141	1.383
APTES	$C_9H_{23}NO_3Si$	221.40	0.946	217	1.423

As reacções de hidrólise e condensação destes alcoxisilanos foram promovidas pela adição de um catalisador apropriado, em solução aquosa. Para avaliar a influência do tipo de catalisador na microestrutura e no desempenho analítico dos sensores desenvolvidos, foram testadas soluções diluídas dos ácidos mais frequentemente referidos na preparação de materiais sol-gel: HCl, HNO_3 e H_2SO_4. Foi também utilizado um catalisador alcalino, hidróxido de tetrametilamónio (TMAOH), em solução aquosa a 25% (v/v). Foram preparadas soluções cuja razão molar H_2O:Si variou entre 2 e 4, de forma a obter diferentes graus de porosidade e assim optimizar as membranas em termos de lixiviação. Como co-solvente utilizou-se etanol, numa razão molar Si:solvente de 1:12, que permitiu reduzir a viscosidade do sol, aumentar o tempo de gelificação e obter boa molhabilidade do substrato para deposição dos filmes.

Para imobilização por encapsulação nos filmes sol-gel foram seleccionados reagentes orgânicos de elevada absortividade molar e com viragem de cor evidente (Tabela 3.2). Estes foram adicionados ao sol inicial dissolvidos no co-solvente, e a respectiva concentração final foi optimizada de forma a se obterem sensores com sensibilidade máxima, sem prejudicar contudo a qualidade óptica.

Tabela 3.2. Indicadores orgânicos imobilizados em filmes sol-gel [1].

NOME	ESTRUTURA	CARACTERÍSTICAS
Laranja de xilenol		Indicador para titulações com EDTA em meio ácido. Em condições acídicas forma quelatos com vários iões metálicos, e pode ser usado para determinar Ca, Cd, Pb e Zn em condições alcalinas.
PAR 4(2-piridilazo)resorcinol		Forma complexos solúveis de cor vermelho-violeta com iões metálicos. Em H_2SO_4 0.5-0.05 M é sensível a Cu, Bi, Ti, Zr, Pd e Ti(III); em meio acetato (pH 3-6): Zn, Cd, Co, Ni, Hg, U, Pb, Ga.
Vermelho de cresol		Indicador de pH. Zona de viragem: pH 7.2 – 8.8; abaixo de 7.2 é amarelo, acima de 8.8 vermelho.

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA ANIDRASE CARBÓNICA

O desenvolvimento de um biosensor, descrito em pormenor no Capítulo VI, envolveu a imobilização da enzima anidrase carbónica num filme sol-gel, que foi por sua vez depositado sobre outro filme contendo um indicador de pH (vermelho de cresol). Dado que o protocolo de imobilização anteriormente descrito para os indicadores orgânicos se processava em condições passíveis de causar a desnaturação da enzima, nomeadamente elevadas quantidades de etanol e valores de pH extremos, foi adoptado um procedimento diferente, em duas etapas, para a imobilização da anidrase carbónica.

Numa primeira fase o precursor (TMOS) sofreu hidrólise prévia na presença de um catalisador ácido (HCl 0.05 M); foi ainda adicionado polietilenoglicol 6000 (PEG, solução aquosa 2.0 g l^{-1}) ao sol para aumentar a homogeneidade da matriz e reduzir as interacções desta com a proteína a imobilizar [2]. Para conseguir homogeneização do sistema de duas fases alcóxido-água, recorreu-se à agitação ultrasónica em substituição do etanol; para retardar a ocorrência de gelificação e garantir transparência óptica, o sol foi sonicado em banho de gelo, durante 30 minutos (o período necessário para se formar uma solução límpida e homogénea). Na segunda etapa, o sol pré-hidrolisado foi misturado com uma solução tamponada contendo a enzima, numa razão 1:1 (v/v), procedendo-se de imediato à deposição dos filmes. As soluções referidas foram mantidas em banho de gelo durante todo o processo.

3.2.2. Protocolo de deposição dos filmes sol-gel

Como suportes físicos para deposição dos filmes sol-gel foram utilizadas lamelas de vidro de dimensões 18 X 18 mm. Antes da deposição, as lamelas foram tratadas com ácido nítrico concentrado e etanol, e posteriormente lavadas com água bi-desionisada e secas em estufa a 100ºC. Este tratamento prévio teve como objectivo a remoção de poeiras e outras impurezas e ainda assegurar uma boa adesão do filme sol-gel ao suporte; a activação da superfície do vidro, por exposição dos grupos silanol à superfície, favorece a formação de ligações Si-O-Si com os grupos silanol dos precursores hidrolisados do sol-gel.

A deposição dos filmes foi feita pelos dois métodos mais comuns, descritos no capítulo anterior: imersão directa, ou *dip-coating*, e rotação controlada, ou *spin-coating*. Para a realização do *dip-coating* recorreu-se a um dispositivo simples, que viabilizou o controlo da velocidade de imersão e emersão do suporte na solução sol-gel (Fig. 3.2). Utilizou-se uma bomba peristáltica convencional, modelo Minipuls 3 da marca Gilson, à qual foi adaptado um fio de *teflon* com um gancho na extremidade para fixação do suporte de vidro a mergulhar. Para cada velocidade da bomba peristáltica, a correspondência com a respectiva velocidade de emersão foi estabelecida pela medida da distância percorrida pelo substrato, na vertical, em função do tempo.

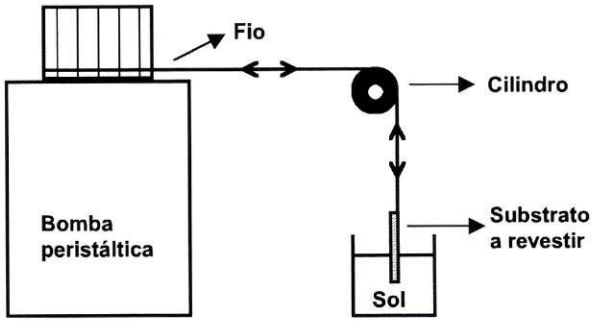


Figura 3.2. Diagrama esquemático do dispositivo utilizado para deposição por imersão directa.

A deposição por *spin-coating* foi inicialmente levada a cabo colocando os substratos de vidro no centro do rotor de uma centrífuga Centromix S-549, da marca J.P. Selecta. Posteriormente, utilizou-se um dispositivo construído para o efeito [3], baseado numa ventoinha de computador convencional, de velocidade regulável, fixada num suporte horizontal, sobre a qual eram colocados os substratos para deposição.

Nas duas técnicas, a microestrutura do filme obtido depende da dimensão e da extensão da ramificação das espécies em solução antes da deposição (determinadas não só pela composição inicial do sol mas também pelo tempo de envelhecimento), e ainda das velocidades relativas de condensação e evaporação durante a deposição do filme. Assim, quer o tempo de envelhecimento quer as condições de deposição foram optimizadas de forma a se obterem filmes de reduzida espessura, aspecto homogéneo e sem fracturas. Procedeu-se então à avaliação de diferentes velocidades de emersão do substrato na técnica de *dip-coating*, e no caso da rotação controlada foram testados vários volumes de sol depositado, bem como diferentes tempos e velocidades de rotação.

Após a deposição, os filmes foram submetidos a secagem à temperatura ambiente durante vários dias.

3.2.3. Metodologias de caracterização dos filmes sol-gel

No decurso do desenvolvimento dos sensores apresentados na presente dissertação foram utilizadas diferentes metodologias de caracterização e avaliação dos filmes sol-gel obtidos. Inicialmente, procedeu-se à caracterização espectrofotométrica dos sensores, à avaliação da actividade catalítica do biosensor (Capítulo VI) e ainda à determinação da extensão da lixiviação dos agentes imobilizados. Avaliou-se a espessura dos sensores sensíveis a bismuto descritos no Capítulo IV (4.1), e efectuou-se a análise da porosidade, área de superfície específica e volume total de poros dos sensores descritos nos Capítulos IV (4.2) e V. Fez-se ainda a caracterização microestrutural dos mesmos, através da análise de imagens topográficas dos filmes, obtidas a grande ampliação.

Caracterização Espectroscópica e Avaliação da Lixiviação

As restrições de mobilidade impostas às moléculas imobilizadas e as interacções estabelecidas com a matriz podem causar alterações das propriedades físicas e químicas dos reagentes, tal como foi discutido no capítulo anterior. Estas traduzem-se em modificações das características espectroscópicas, pelo que a caracterização fotoquímica do reagente, depois de imobilizado, permite avaliar a sua estabilidade e eventuais alterações de reactividade.

Para caracterização espectroscópica dos filmes sol-gel utilizou-se um espectrofotómetro UV/Vis Lambda 45, da marca Perkin-Elmer. Para os sensores

baseados na imobilização de laranja de xilenol e PAR (Capítulos IV e V) foram obtidos espectros de absorvância dos filmes num determinado intervalo de comprimentos de onda da zona UV/Vis, na presença e na ausência do analito, e em várias condições além das descritas como ideais para estes reagentes em solução: no caso do laranja de xilenol em concentrações crescentes de ácido, e a diferentes valores de pH para o PAR. A análise destes espectros e a comparação com os obtidos para os mesmos reagentes em solução permitiu:

i) Avaliar se o reagente manteve a sua reactividade característica depois de imobilizado;

ii) Controlar os diferentes equilíbrios produzidos na membrana, seguindo a diminuição ou aumento dos picos de máxima intensidade e o aparecimento de novos picos a diferentes comprimentos de onda;

iii) Determinar as condições óptimas de reacção para o reagente imobilizado; a distribuição não-homogénea da porosidade e a redução da mobilidade intramolecular e intermolecular conduzem frequentemente a diferenças de selectividade e estequeometria dos indicadores de metais, que podem também ser previstas nesta fase.

Para os filmes obtidos por imobilização de vermelho de cresol (Capítulo VI) foram obtidos espectros a diferentes valores de pH, e comparados com os do mesmo indicador em solução. Tal como foi descrito no capítulo anterior, a imobilização de indicadores de pH em matrizes sol-gel resulta frequentemente em deslocações da zona de viragem e alterações de pK_a, que podem ser determinadas por análise espectroscópica. O traçado de curvas pH *vs.* absorvância possibilitou assim a definição do intervalo dinâmico de resposta do sensor. Tal como nos casos anteriores, procedeu-se ainda à análise qualitativa dos espectros. Estes apresentam geralmente dois picos intensos, que correspondem às formas protonada e desprotonada do reagente; a obtenção destes picos característicos demonstra a estabilidade da molécula na matriz sol-gel. Uma outra característica é a existência de um determinado ponto isosbéstico, em que a absorvância não depende do pH. Este surge claramente definido nos casos ideais, em que apenas é produzido um equilíbrio ácido-base, e demonstra que as alterações no espectro são produzidas por esta reacção e não por outros processos, como a agregação ou a exsudação do corante para a solução.

A espectrofotometria foi também a técnica utilizada para avaliação da actividade da enzima, imobilizada no biosensor, cuja apresentação se faz no Capítulo VI. Seleccionou-se uma reacção enzimática facilmente monitorizável, pela formação de um substrato corado, cuja absorvância foi registada ao longo do tempo, obtendo-se uma curva cinética que indicou se a enzima manteve a sua actividade característica após imobilização.

A ocorrência de lixiviação do indicador imobilizado constitui um problema a considerar no fabrico de sensores ópticos, uma vez que limita o seu tempo de vida e, logo, a sua aplicabilidade analítica. Considerando que num vidro sol-gel, não densificado e dopado com uma molécula de dimensões físicas comparáveis ao diâmetro dos poros, uma fracção do dopante pode difundir-se para a solução, a extensão da lixiviação dos filmes obtidos foi avaliada de modo a prever em que medida esta poderia comprometer a utilização contínua dos sensores. O ensaio de avaliação da lixiviação foi conduzido em condições similares às adoptadas na aplicação analítica dos sensores, de acordo com as conclusões retiradas da análise prévia dos espectros de absorvância. Os filmes sol-gel foram mergulhados repetidamente, em intervalos sucessivos de 2 minutos, numa solução aquosa correspondente ao meio reaccional óptimo, e após cada intervalo o sensor foi removido da solução e foi registada a absorvância no comprimento de onda de máxima absorvância para a molécula em questão. Este ensaio foi conduzido ao longo de 2 horas, e permitiu obter um perfil de lixiviação *vs.* tempo. Segundo este método foi ainda possível acompanhar a fotodegradação dos reagentes e fazer uma avaliação qualitativa prévia da porosidade dos filmes.

Análise Superficial: Porosidade, Área superficial e Espessura

A porosidade e a área superficial são aspectos directamente dependentes das condições de preparação dos filmes. A sua caracterização reveste-se de extrema importância, uma vez que determinam não só diferenças na acessibilidade dos analitos ao elemento de reconhecimento (velocidade de resposta), como também o tempo de vida útil do sensor (já que condicionam a facilidade de exsudação do reagente imobilizado).

Para avaliação destes parâmetros podem utilizar-se diferentes técnicas, sendo as mais usadas as que se baseiam na variação do índice de refracção e as que envolvem a adsorção de um gás inerte. Estas últimas fornecem apenas uma medida da porosidade acessível ao gás [4], enquanto que as técnicas que utilizam a variação do índice de refracção permitem estimar a porosidade total. Deste ponto de vista, a informação fornecida pelos métodos baseados na adsorção de gás parece ser mais objectiva, já que não considera os poros em que o elemento de reconhecimento imobilizado se encontra inacessível ao analito; por seu turno, a determinação da porosidade total implica a densificação do material, afectando todos os poros, o que em termos práticos resulta numa sobre-avaliação da porosidade [5]. Assim, por viabilizar uma medida da porosidade "útil", considerou-se a técnica de adsorção de gás como a mais conveniente

para caracterização dos filmes desenvolvido, tendo-se recorrido a um laboratório especializado para a realização das medidas.

O método convencional baseia-se na medida volumétrica ou gravimétrica da quantidade de gás (geralmente azoto) adsorvido pela superfície sólida [4]. Quantidades determinadas de azoto são sucessivamente introduzidas num compartimento contendo a amostra, seca e desgaseificada, a pressão controlada. Após cada etapa, a pressão de equilíbrio é medida, e a quantidade de azoto adsorvida (ou desorvida) é calculada, obtendo-se uma isotérmica de adsorção que representa a quantidade de gás adsorvido em função da pressão relativa. No presente trabalho foi utilizado um analisador de área superficial ASAP 2000, da marca Micromeritics. A área de superfície e o volume total de poros foram calculados directamente com base na massa de adsorvente *vs.* pressão. O diâmetro médio de poro foi calculado como sendo {4 X volume / área específica}. Além dos valores numéricos concretos para estes três parâmetros (apresentados nos respectivos capítulos), verificou-se que aos filmes obtidos por catálise ácida correspondiam isotérmicas compostas, geralmente associadas a materiais microporosos-mesoporosos mistos (Fig. 3.3). No caso dos filmes menos porosos, a curva de dessorção cruzou a de adsorção e foram registados volumes adsorvidos negativos a baixa pressão.

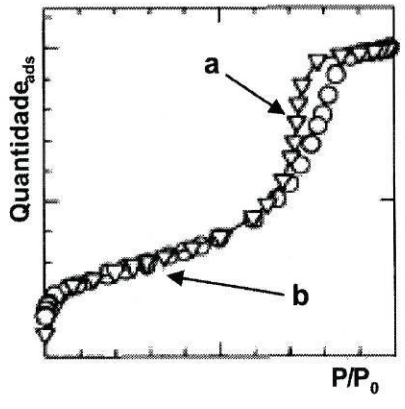


Figura 3.3. Isotérmica de adsorção típica de sólidos microporosos-mesoporosos mistos [4]: a) nos sólidos mesoporosos (poros de 2 a 50 nm) há adsorção de várias camadas, ou mesmo a sua condensação sobre a monocamada; b) nos materiais microporosos (poros < 2 nm) dá-se a formação de uma monocamada de gás adsorvido.

A espessura dos filmes sol-gel é um dos factores que influenciam o tempo de resposta dos sensores obtidos, implicando uma difusão mais ou menos rápida do analito para o interior da matriz, e pode ser relacionada com as condições de deposição e com a

viscosidade do sol antes da mesma ser executada, nomeadamente com o tempo de envelhecimento. Para avaliação deste parâmetro recorreu-se à técnica de perfilometria, tendo sido utilizado para o efeito um perfilómetro Alpha-Step 200, Tencor Instruments. O dispositivo dispõe de uma micro-agulha que se desloca sobre os sensores, realizando um perfil da superfície e a medida do "degrau" entre o filme e o suporte de vidro.

CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL

A caracterização microestrutural permitiu a recolha de informação qualitativa sobre a homogeneidade e porosidade dos filmes produzidos, e ainda relacionar estas características com o protocolo de síntese adoptado, nomeadamente com o tipo de catalisador. Para o efeito foram utilizadas duas técnicas que permitem obter imagens com elevada resolução espacial, a microscopia electrónica de varrimento e a microscopia de força atómica.

A utilização de radiação de pequeno comprimento de onda, como a radiação associada a um feixe de electrões, permite obter imagens mais detalhadas do que as alcançadas com um microscópio óptico. Na microscopia electrónica de varrimento (*Scanning Electron Microscopy,* SEM) [6] faz-se incidir um feixe de electrões sobre a amostra a analisar. A energia comunicada à amostra por esses electrões é suficiente para que esta, por sua vez, emita electrões secundários. As características dos electrões emitidos pela amostra traduzem um conjunto de características da zona de incidência dos electrões do feixe primário, tais como a estrutura e os detalhes topográficos. Fazendo deslocar o feixe de electrões ao longo da amostra ("varrimento") e, simultaneamente, registando num computador a informação recolhida, com o auxílio de um detector de electrões secundários ou de um detector de electrões retrodifundidos, é possível construir uma imagem da amostra (Fig. 3.4).

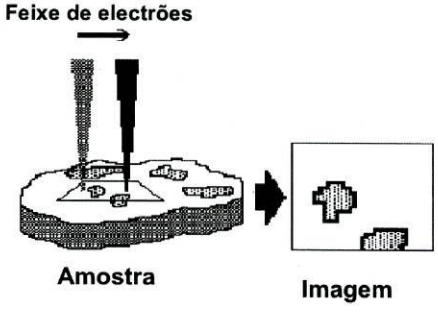


Figura 3.4. Representação do modo de funcionamento do microscópio electrónico de varrimento.

Na caracterização dos filmes sol-gel obtidos utilizou-se um microscópio electrónico de varrimento JEOL JSM-6360. Antes da observação, os filmes foram devidamente limpos com ar comprimido e cobertos, sob vácuo, por uma película finíssima de carbono. Este procedimento conferiu às membranas sol-gel propriedades condutoras, o que é necessário para eliminar ou reduzir as cargas eléctricas que surgem rapidamente num espécimen não-condutor quando varrido por um feixe de electrões de alta energia.

Na Fig. 3.5 são apresentados alguns exemplos do tipo de imagens obtidas utilizando esta técnica.

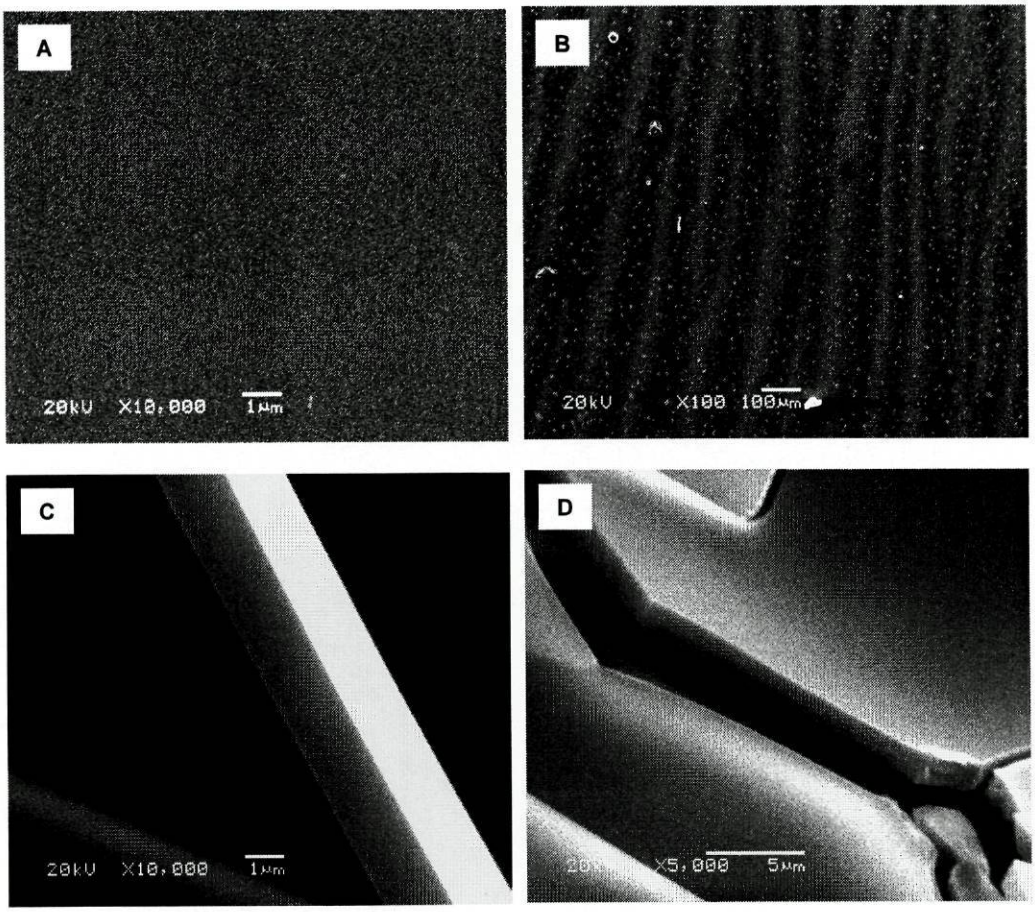


Figura 3.5. Fotografias de filmes sol-gel obtidas por SEM. A) Filme dopado com laranja de xilenol, catálise ácida; B) Filme dopado com PAR, catálise alcalina; C) Vista transversal de um filme contendo laranja de xilenol imobilizado, catálise ácida; D) Pormenor de uma fractura do filme anterior.

A microscopia de força atómica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) permite estudar a topografia e as propriedades mecânicas de superfícies, tais como atrito, rugosidade, dureza, rigidez, elasticidade e resistência [7]. O seu princípio de funcionamento é muito simples e baseia-se na medida de forças atractivas ou repulsivas entre uma ponta de prova e a amostra, de acordo com o esquema da Fig. 3.6.

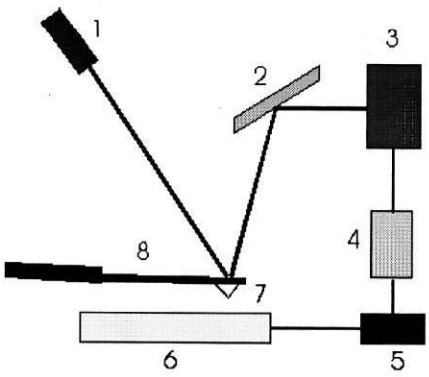


Figura 3.6. Componentes de um microscópio de força atómica. 1) *laser*; 2) espelho; 3) fotodetector; 4) amplificador; 5) registador; 6) amostra; 7) ponta de prova; 8) haste.

A ponta de prova é montada numa haste que pode girar livremente. Na parte superior da haste é colocado um espelho que reflecte a luz de um feixe de *laser*. Após a reflexão, a luz do *laser* passa por uma lente e incide sobre um fotodetector, provocando o aparecimento de uma diferença de potencial nas suas extremidades. Esta depende da área iluminada pelo feixe, que por sua vez depende da altura da ponta de prova. A posição da ponta de prova varia conforme o relevo da superfície em estudo, e assim a diferença de potencial gerada pelo fotodetector traduz os deslocamentos durante o varrimento. Desta forma, é possível fazer o mapeamento de uma superfície em escala atómica, obtendo-se uma imagem topográfica tridimensional de áreas muito reduzidas.

Na análise dos filmes sol-gel utilizou-se um microscópio de força atómica Topometrix Discover TMX2010 AF, e o tipo de imagens obtidas é ilustrado pela Fig. 3.7.

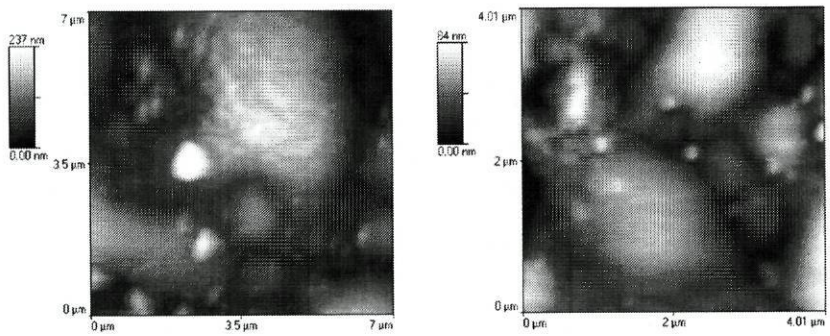


Figura 3.7. Imagens obtidas por AFM; filme sol-gel dopado com PAR, catálise alcalina.

3.2.4. Características dos sensores desenvolvidos: parâmetros de qualidade

No Capítulo I apresentou-se a definição de sensor químico como "um dispositivo analítico que responde de forma directa, reversível e contínua à variação da concentração de uma espécie química ou bioquímica presente numa amostra". A partir deste conceito podem definir-se as propriedades genéricas de um sensor [8]. Algumas coincidem com características comuns a qualquer instrumento analítico (exactidão, precisão, sensibilidade e selectividade), enquanto que outras se relacionam directamente com o seu desempenho (reversibilidade, possibilidade de regeneração, tempo de resposta e tempo de vida). Características relacionadas com a fiabilidade, nomeadamente a simplicidade de construção e de utilização, a robustez, o custo ou a facilidade de miniaturização, devem também ser tidas em conta. Dependendo do tipo de sensor e da aplicação pretendida, algumas destas características podem ser consideradas indispensáveis, enquanto que outras serão apenas desejáveis.

Para avaliação da qualidade dos sensores ópticos desenvolvidos no presente trabalho foram consideradas como parâmetros chave as seguintes características: selectividade, sensibilidade, reversibilidade/possibilidade de regeneração, tempo de resposta, tempo de vida e reprodutibilidade.

A *selectividade* refere-se à extensão com que um procedimento pode ser utilizado para determinar um analito particular numa mistura ou matriz complexa, sem sofrer interferência de outros componentes de comportamento similar [9]. É geralmente expressa como uma medida que compara a concentração da substância interferente respectiva com a concentração de analito que produz o mesmo sinal. Este factor é obtido dividindo a sensibilidade do sensor para a substância interferente pela sensibilidade para

o analito. Para avaliação da selectividade dos sensores desenvolvidos, foram considerados como prováveis interferentes outras espécies, além do analito de interesse, capazes de reagir com o elemento de reconhecimento imobilizado, assim como substâncias presentes em concentração considerável na amostra, tais como os excipientes nas formulações farmacêuticas. Foram realizadas determinações do analito na presença de cada um dos possíveis interferentes, adicionados em quantidade 50 vezes superior, e verificou-se a variação de sinal (em percentagem) em relação ao registado para o analito isolado. Neste cálculo utilizou-se a média de 5 medidas para cada interferente estudado. Considerou-se que uma dada espécie não constituía fonte de interferência sempre que a variação de sinal obtida fosse inferior a 5%, tendo em conta ainda a probabilidade de esta se encontrar na amostra a analisar, na concentração utilizada neste estudo.

A *sensibilidade* de um sensor é definida como o sinal que este gera, expresso em unidades de concentração da substância medida. Corresponde ao declive da curva de calibração, quando a substância em causa é o analito, ou à chamada curva de resposta para os interferentes [8,10]. Tendo como objectivo maximizar a sensibilidade dos sensores ópticos desenvolvidos neste trabalho, foram seleccionados para imobilização reagentes com elevada absortividade molar, e o efeito da respectiva concentração foi avaliado durante a preparação dos filmes. Para estimar a sensibilidade obtida para os diferentes sensores, fez-se a determinação do analito em soluções de concentração crescente, preparadas num intervalo alargado (de modo a abarcar as zonas de resposta linear e não-linear). Para cada solução foi considerada a média de 5 sinais obtidos pelo sensor, e traçada a respectiva curva de calibração, correspondendo o declive obtido à sensibilidade do sensor.

A *reversibilidade* é a característica que determina se um sensor pode ou não ser utilizado de forma contínua, sendo definida pelo tipo de interacção entre o analito e fase reactiva. No presente trabalho, foram imobilizados reagentes orgânicos que formavam complexos extremamente estáveis com os analitos, o que implicou a necessidade de proceder à regeneração dos sensores desenvolvidos. Para cada sensor foram seleccionados diversos agentes com afinidade para a espécie a determinar, que pudessem remover o analito da ligação estabelecida com o reagente imobilizando, promovendo assim a regeneração da unidade sensora. Para avaliar cada um destes agentes, começou-se por registar o sinal analítico na ausência de analito (linha de base), após o que o sensor foi colocado sucessivamente em contacto com o analito e com a espécie em estudo. Este ensaio foi conduzido para 3 concentrações de analito, abrangendo todo o intervalo de resposta linear do sensor, e foi considerada a média de 10 determinações para cada estudo realizado. Cada potencial agente regenerador foi

testado em concentrações e valores de pH crescentes, de modo a encontrar as condições óptimas de regeneração. Para cada sensor desenvolvido, a substância que possibilitou a regeneração completa e rápida, com linha de base estável ao longo do tempo, e sem prejudicar o tempo de vida útil ou o tempo de resposta do sensor, foi seleccionada como agente de regeneração.

O *tempo de resposta* de um sensor é quantificado pela medida do tempo necessário para se atingir 66% ou 90% (dependendo do critério) do sinal máximo obtido [8], e é determinado pela transferência de matéria da solução para a fase sólida e pela cinética de reacção com o elemento de reconhecimento. Para avaliação do tempo de resposta dos sensores desenvolvidos, mediu-se o intervalo de tempo compreendido entre a colocação do sensor em contacto com a solução de analito, a diferentes concentrações, e a obtenção de um sinal estável, considerando-se o valor médio do ensaio de 5 filmes e a média de 5 ensaios para cada um deles.

O *tempo de vida* de vida de um sensor está directamente relacionado com a estabilidade da fase reactiva [8]. Enquanto que alguns sensores podem ser regenerados quando as suas características de funcionamento se começam a deteriorar, apresentando tempos de vida de anos, outros, como é o caso dos biosensores, apresentam tempos tradicionalmente mais curtos. O tempo de vida útil dos sensores desenvolvidos neste trabalho foi avaliado em termos de número de determinações possibilitadas pelo sensor sem ocorrer redução significativa do sinal analítico; para o efeito, registou-se o sinal obtido em 500 determinações sucessivas de uma solução contendo o analito, numa dada concentração. Além do tempo de vida em utilização, foi avaliada a estabilidade dos sensores em condições de armazenamento. Ao longo de vários meses foram realizadas calibrações periódicas dos filmes, armazenados à temperatura ambiente, utilizando-se soluções de calibração idênticas em todos os ensaios e considerando-se a média de 5 sinais analíticos para cada solução de calibração. O declive das respectivas curvas, assim como o tempo de resposta e o valor absoluto dos sinais analíticos obtidos nos vários estudos periódicos, foram comparados entre si, permitindo assim avaliar também a adequação das condições de armazenamento. Acrescente-se ainda que os resultados obtidos na avaliação do tempo de vida útil dos sensores desenvolvidos foram correlacionados com os dados provenientes da avaliação da lixiviação (descrita anteriormente), confirmando que esta constitui o principal factor limitante do tempo de vida. Assim sendo, as condições do processo sol-gel, nomeadamente a quantidade de água e o catalisador, foram ajustadas no sentido de diminuir a porosidade, e dessa forma controlar a lixiviação. Tendo em conta que uma redução drástica da porosidade pode traduzir-se num aumento do tempo

de resposta e até numa diminuição da sensibilidade, as condições finais adoptadas resultaram de uma solução de compromisso entre todos estes parâmetros.

A *reprodutibilidade* dos sensores foi estimada em termos de repetibilidade; o mesmo sensor foi aplicado a 20 determinações consecutivas de uma dada concentração de analito e foi determinado o desvio padrão relativo dos resultados. A reprodutibilidade do processo de construção, ou seja, a variação de resposta entre sensores, não foi mensurada, uma vez que em todos os trabalhos descritos foram sempre utilizados vários sensores, tendo-se verificado não haver diferenças significativas de comportamento.

3.3

ACOPLAMENTO DE SENSORES ÓPTICOS A SISTEMAS DE FLUXO CONTÍNUO

A integração de sensores ópticos em sistemas de fluxo contínuo foi inicialmente proposta por Ruzicka e colaboradores [11] como um meio automático e reprodutível de testar o seu desempenho analítico. O reconhecimento de que a combinação destas duas tecnologias permitia ultrapassar algumas limitações importantes dos sensores ópticos conduziu à sua aplicação na realização de análises químicas convencionais [12-14].

Os sensores optoquímicos podem ser facilmente acoplados a sistemas de fluxo, tirando partido das várias configurações que podem assumir. Por exemplo, o material sensor pode ser colocado na própria célula de fluxo ou na extremidade de uma fibra óptica ligada ao detector, reconhecendo de forma específica uma espécie (bio)química introduzida directamente no percurso analítico. Desta forma, são detectadas as propriedades ópticas do sensor, e não as do analito ou de um produto de uma reacção química com um reagente, sendo os processos de detecção e/ou separação integrados no sistema de detecção. Para que possa ser associado a um sistema de fluxo contínuo com o desempenho esperado, um sensor deve ser reversível (ou facilmente regenerável) e deve possuir um tempo de resposta curto. O reagente imobilizado deve ser estável no meio reaccional e quer o suporte sólido quer a fase reactiva deverão ser compatíveis com o sistema de detecção.

Esta abordagem oferece um conjunto interessante de vantagens mútuas [14,15]. A possibilidade de efectuar determinações contínuas da amostra sem adição de reagente traduz-se em procedimentos analíticos mais económicos, simples e limpos. Os sistemas de fluxo são simplificados e a manipulação de soluções é reduzida, com consequente diminuição dos erros inerentes. Entre as vantagens do acoplamento sobressaem o aumento da sensibilidade, pois o transporte conveccional do analito promove a sua difusão no interior do filme, diminuindo igualmente o tempo de resposta. Este transporte está ausente quando o sensor é simplesmente mergulhado na solução, onde apenas ocorre difusão por gradiente de concentração. Por outro lado, a programação flexível e reprodutível do fluxo das soluções traduz-se noutras melhorias das características analíticas dos sensores, nomeadamente em termos de reprodutibilidade de resposta e estabilidade. Sensores irreversíveis mas reutilizáveis podem ser facilmente regenerados de forma automática, por inserção dos reagentes apropriados, e a calibração é simplificada; factores como a força iónica, a capacidade tampão, o pH ou a pressão

parcial de oxigénio podem facilmente ser mantidos constantes. Por último, saliente-se que os sistemas analíticos resultantes podem ser facilmente adaptáveis à monitorização de processos em linha.

3.3.1. Multicomutação e Amostragem Binária

Tal como a análise por injecção sequencial (SIA), a multicomutação associada à amostragem binária [16] foi introduzida como técnica de automatização onde se colmatam as limitações de versatilidade, decorrentes da ausência de controlo por microprocessador, dos sistemas baseados na análise por injecção em fluxo [17]. A utilização de dispositivos de comutação individuais, as válvulas solenóides de três vias, controlados por *software* adequado, permite a inserção sequencial, e programada para cada procedimento analítico, de pequenos segmentos de amostra e reagente directamente no percurso analítico, formando sequências binárias. A introdução da amostra e do reagente pode ser efectuada por aspiração através de um canal único, que inclui o detector, e por activação das respectivas válvulas (Fig. 3.8); o volume de cada alíquota é determinado pelo tempo de funcionamento das válvulas e pelo caudal de aspiração.

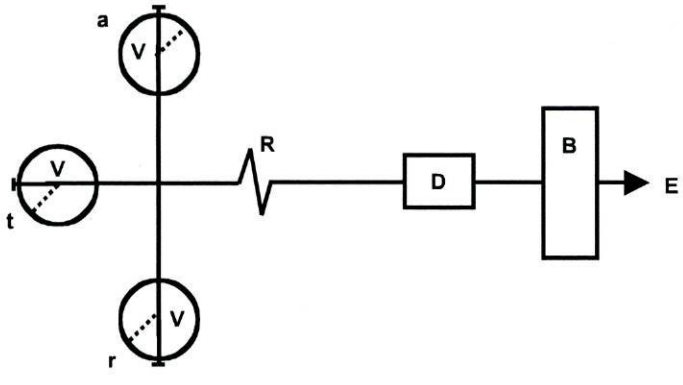


Figura 3.8. Representação esquemática do sistema de fluxo multicomutado utilizado nos trabalhos realizados. V) válvulas solenóides, responsáveis pela inserção de amostra (a), solução transportadora (t) e reagente (r); (-) corresponde à posição fechada e (---) à posição aberta. R) reactor; D) detector; B) sistema de propulsão; E) esgoto.

Durante o transporte até ao detector, os pequenos segmentos interdispersam-se, quer como resultado do transporte convectivo em regime de fluxo laminar, quer por dispersão radial e axial promovida por gradientes de concentração (Fig. 3.9). A adopção de um caudal de aspiração e de tempos constantes de activação de cada válvula garante a reprodutibilidade da extensão da dispersão que ocorre até à realização da medida.

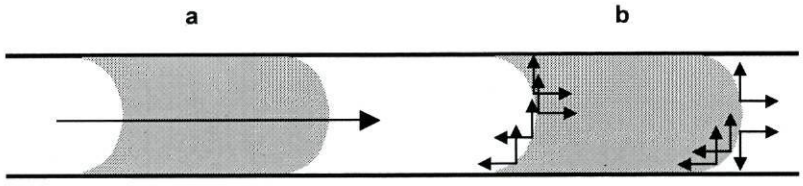


Figura 3.9. Processos de dispersão interfacial que ocorrem no interior de um sistema baseado na multicomutação: a) por convecção; b) por gradiente de concentração. Para simplificação do esquema separaram-se os processos de dispersão em duas zonas de amostra, embora eles ocorram simultaneamente, para cada segmento inserido, independentemente da sua natureza – amostra, reagente ou fluido transportador.

A multicomutação apresenta uma série de vantagens que contribuíram para a expansão do potencial analítico dos métodos de fluxo contínuo nos últimos anos [18,19]. A possibilidade de controlar individualmente as válvulas solenóides torna possível a manipulação de diferentes soluções, ou a modificação das variáveis que influenciam os perfis de dispersão, sem necessidade de alterar a montagem analítica. As válvulas são baratas e apresentam grande rapidez de comutação, permitindo a inserção de amostra e reagentes sem interrupção do escoamento. A multicomutação caracteriza-se também por uma redução drástica do consumo de amostras e reagentes em relação a outros métodos, uma vez que permite a introdução precisa de volumes da ordem dos microlitros, correspondentes a tempos de inserção de fracções de segundo. Por outro lado, o tamanho reduzido das válvulas e das interfaces electrónicas favorece o desenvolvimento de sistemas miniaturizados e de dispositivos portáteis para análises *in situ*.

3.3.2. Componentes e optimização das montagens de fluxo multicomutado

Os sistemas de fluxo apresentados no presente trabalho foram utilizados como ferramentas para diluição e manipulação das amostras, e também para regeneração dos sensores. Nas montagens propostas, caracterizadas por grande simplicidade (já que foi eliminada a inserção de reagente), as válvulas solenóides foram dispostas em configuração de estrela, de forma similar ao esquema apresentado na Fig. 3.8. Este arranjo implica habitualmente a inclusão de um ponto de confluência, mas apresenta maior versatilidade e temporização mais simples do que os sistemas com configuração em linha. Embora apresentando algumas características de funcionamento particulares, remetidas aos respectivos capítulos, as diferentes montagens desenvolvidas apresentam componentes e recursos básicos comuns, ilustrados na fotografia da Fig. 3.10, e cuja descrição se apresenta de seguida.

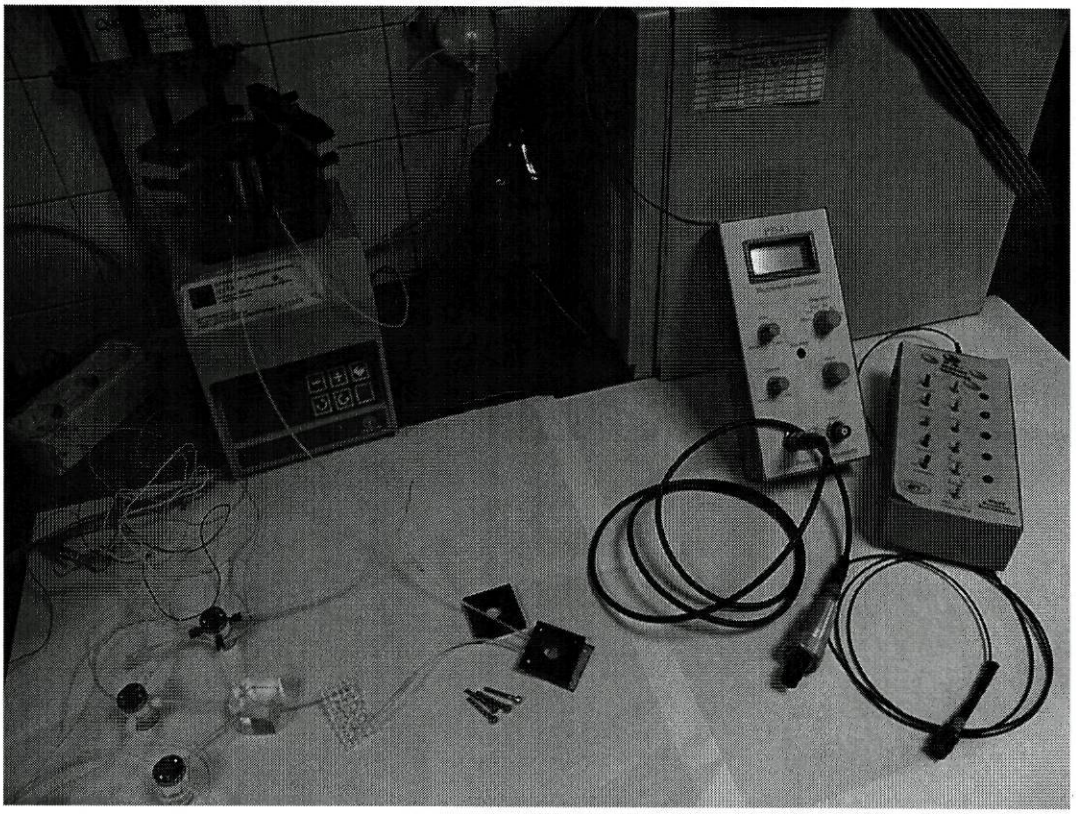


Figura 3.10. Fotografia da montagem experimental típica utilizada.

- *Sistema de inserção*

Para inserção das diferentes soluções foram utilizadas válvulas solenóides de 3 vias (uma entrada / duas saídas) modelo 161 T031 da NResearch Inc. Estes dispositivos têm duas posições possíveis, aberta (ON) e fechada (OFF); duas das três saídas estão sempre ligadas. A inserção da amostra é efectuada por comutação das válvulas para a posição ON, onde permanecem durante o intervalo de tempo previamente definido, ou *tempo de amostragem*, que define, em função do caudal de aspiração, o volume inserido. O funcionamento das válvulas, esquematizado na Fig. 3.11, é condicionado pela direcção da pressão exercida sobre uma membrana de *teflon* que define o percurso das soluções.

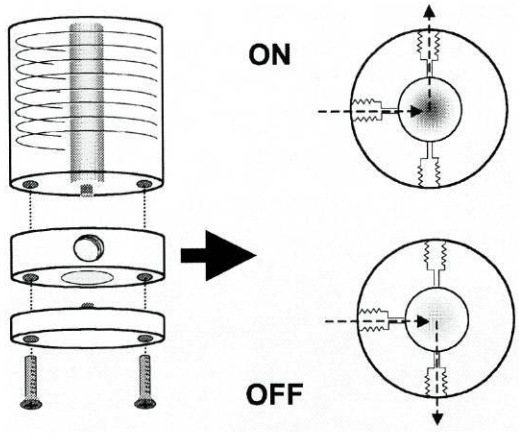


Figura 3.11. Esquema de uma válvula solenóide de 3 vias e do seu ciclo de funcionamento.

O accionamento do núcleo do solenóide empurra a membrana, estabelecendo um dos percursos; após desligar a válvula, uma mola helicoidal coloca a membrana na sua posição inicial, estabelecendo o percurso alternativo.

- *Sistema de propulsão e transporte*

Como dispositivo responsável pelo movimento (no presente caso aspiração) das amostras foi utilizada uma bomba peristáltica Gilson, modelo Minipuls 3, equipada com tubos de propulsão da mesma marca. Esta foi colocada após o detector, de forma a tornar as montagens mais simples: as soluções foram aspiradas por um único canal e os volumes gastos foram reduzidos.

O percurso analítico através do qual se processou o transporte das soluções foi construído com tubagem de *teflon* (PTFE) da marca Omnifit, de diâmetro interno 0.8

mm. Foram ainda utilizados pequenos tubos de silicone para ligação entre tubagens e uma confluência de *perspex*.

- *Sistema de detecção*

Como detector nas montagens desenvolvidas foram utilizados componentes da marca WPI: fibras ópticas de plástico (FOP1-ST) ligadas a uma fonte luminosa baseada no uso de LEDs (*digital colour wheel* modelo FOCWDIG) e um detector de fotodiodos de silicone, modelo VISD, acoplado a um amplificador PDA1.

- *Sistema de controle e aquisição de dados*

Como unidade central de aquisição de dados e de controlo dos componentes do sistema foram utilizados microcomputadores equipados com *software* VisiDAQ 3.1 Standard ou QuickBasic 4.5. A comunicação entre o computador e os componentes das montagens, nomeadamente as válvulas solenóides, o detector e a bomba peristáltica, foi efectuada através de interfaces PCL-711S e PCL-818L da Advantech.

Para acoplamento dos sensores ópticos às referidas montagens construiu-se uma célula de fluxo a partir de dois blocos de *perspex*, unidos com parafusos, e um separador de borracha de silicone. Esta célula, esquematizada na Fig. 3.12, permitiu a utilização de dois filmes sol-gel em simultâneo.

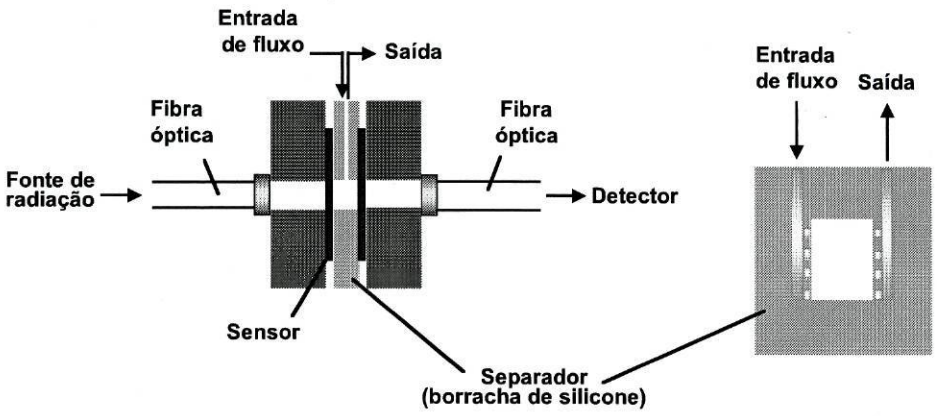


Figura 3.12. Configuração da célula de fluxo.

Nas figuras que se seguem são apresentadas fotografias detalhadas dos componentes descritos.

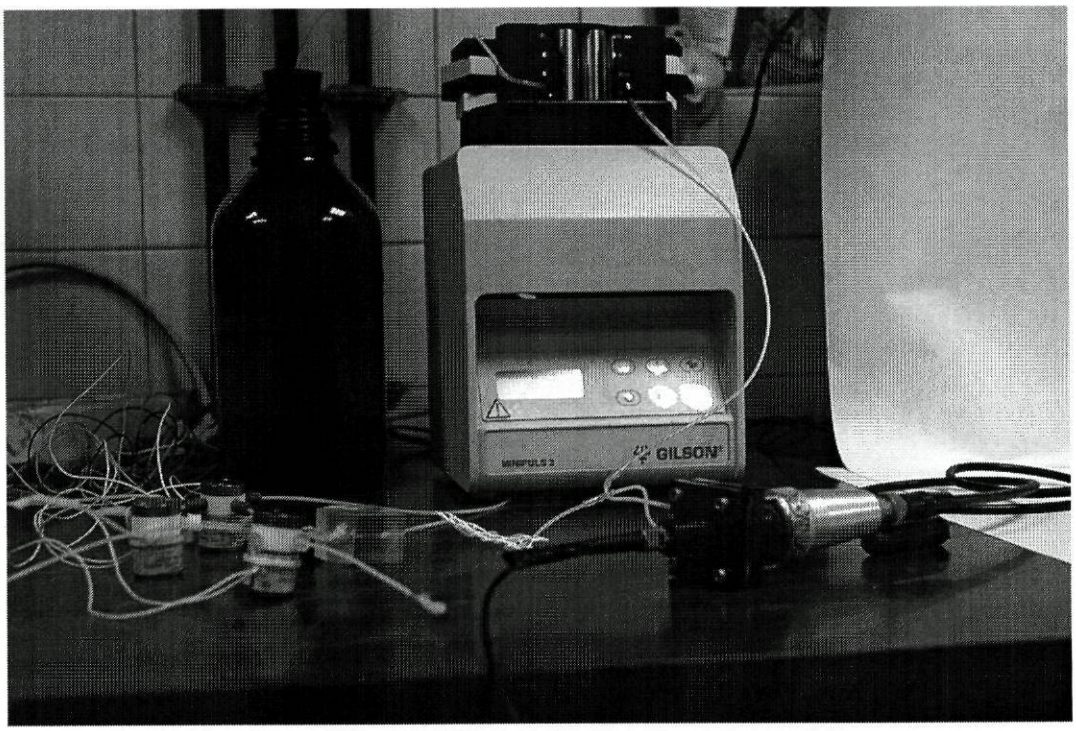


Figura 3.13. Montagem de fluxo utilizada, incluindo o sistema de propulsão e transporte (bomba peristáltica), o sistema de inserção da amostra (válvulas solenóides) e a célula de fluxo acoplada ao detector e ao sistema de fibras ópticas.

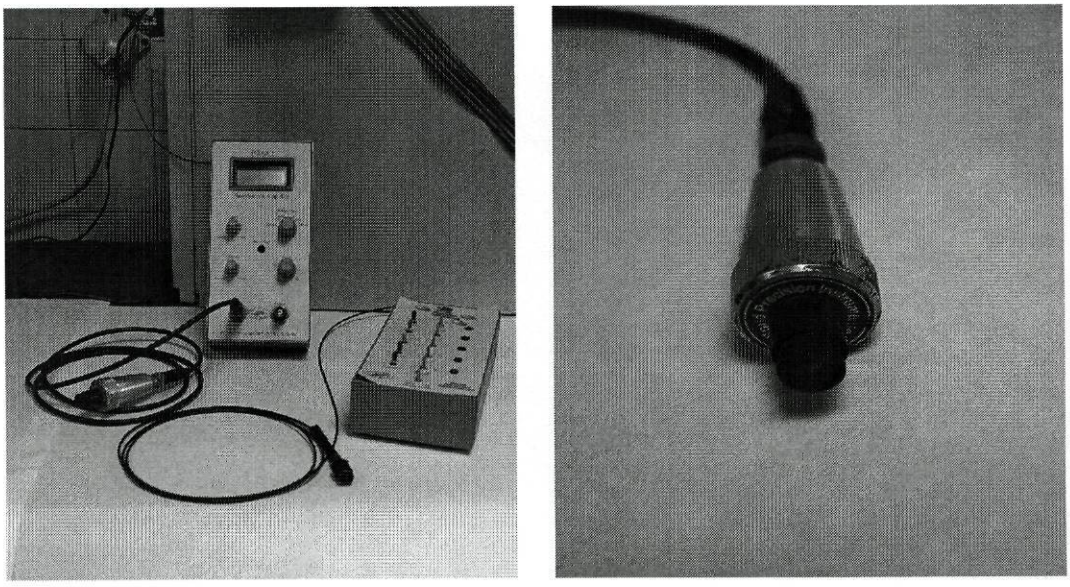


Figura 3.14. À esquerda, fotografia do sistema de detecção (detector e fotoamplificador) e da fonte de radiação. À direita, pormenor do detector.

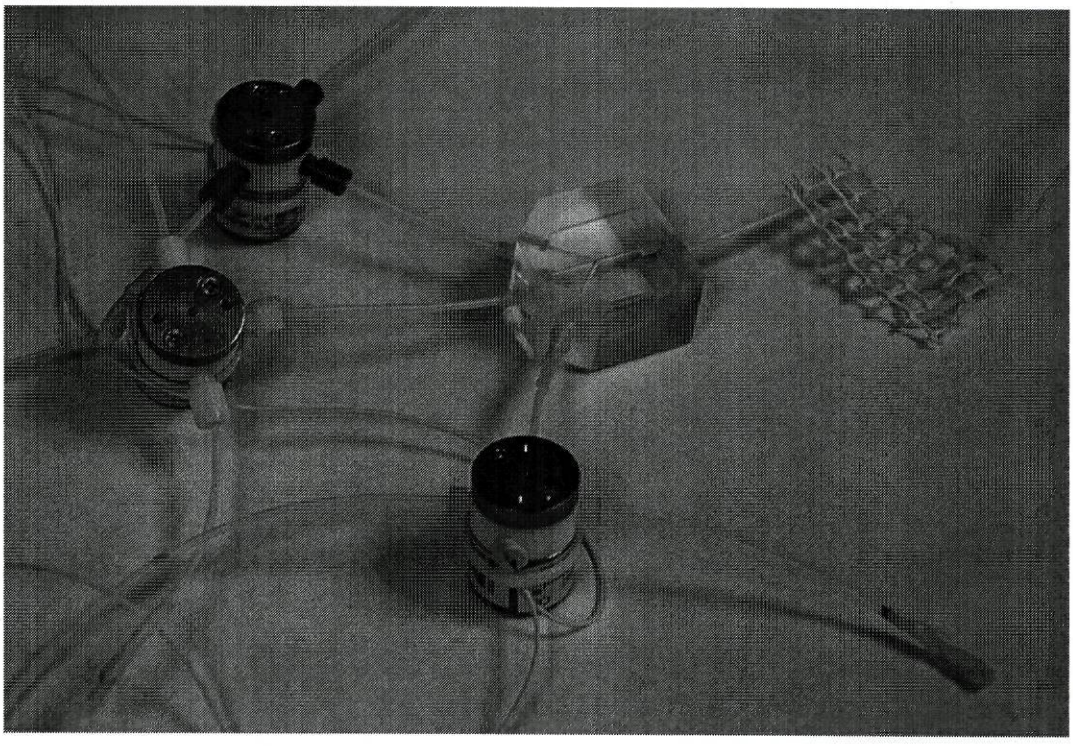


Figura 3.15. Detalhe das válvulas solenóides dipostas em configuração de estrela, da tubagem de *teflon* e da confluência.

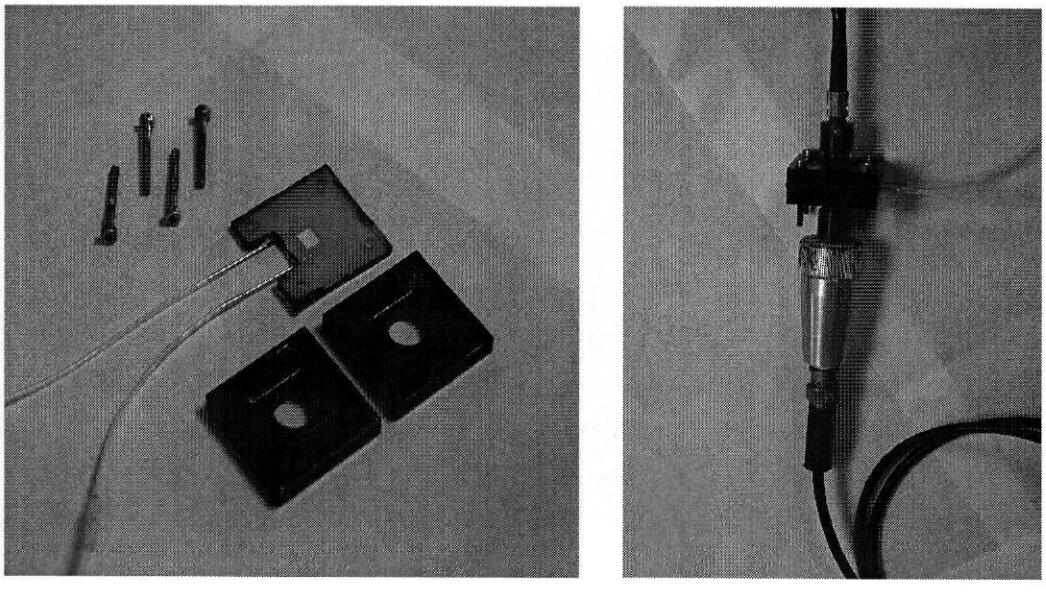


Figura 3.16. À esquerda, componentes da célula de fluxo. À direita, célula de fluxo acoplada às fibras ópticas e ao detector.

A optimização das variáveis (físicas e químicas) que afectam o desempenho das montagens analíticas foi efectuada segundo o método univariado, utilizando como parâmetro de medida o sinal analítico registado. Cada variável foi optimizada de forma rigorosa, mantendo-se as outras constantes, até se estabelecer a melhor relação entre os diversos parâmetros. Além de factores como a gama de concentrações a analisar e as características do detector, no processo de optimização foi privilegiado o máximo desempenho do sensor. Tornou-se necessário por vezes encontrar soluções de compromisso entre diferentes variáveis do sistema, prejudicando por exemplo o ritmo de amostragem em favor do tempo de vida do sensor. Para determinação das espécies a quantificar fez-se a interpolação em curvas de calibração previamente traçadas, utilizando-se a regressão entre os valores de absorvância e de concentração pelo método dos mínimos quadrados dos desvios [10].

3.3.3. Avaliação da qualidade dos resultados obtidos

A qualidade dos resultados obtidos está relacionada com as características dos sensores desenvolvidos, e também com o desempenho dos procedimentos automáticos, pelo que estes foram caracterizados em termos de limite de detecção, intervalo de resposta linear e ritmo de determinação.

O *limite de detecção* é definido como a concentração mais baixa de amostra que pode ser detectada porque, para um nível de confiança de 99.7%, produz um sinal analítico que se distingue do branco [10]. Para o seu cálculo foram efectuadas 20 determinações consecutivas do branco, e o desvio padrão obtido foi multiplicado por 3 e dividido pela sensibilidade (declive da recta de calibração).

O *intervalo de resposta linear* foi avaliado pela determinação de soluções com concentração crescente de analito, considerando-se a média de 5 sinais analíticos obtidos para cada solução, e traçando-se depois a respectiva curva de calibração. A zona de concentrações em que a curva pode ser descrita como linear foi estabelecida por inspecção visual e estabelecimento da respectiva equação de grau um.

O *ritmo de determinação* corresponde ao número de sinais analíticos registados por hora, e está relacionado com o tempo de amostragem, com o caudal de aspiração, e ainda com o tempo de resposta total do sensor (resposta ao analito seguida de regeneração).

Os resultados fornecidos pelas metodologias propostas foram avaliados quanto à precisão e exactidão [10].

A *precisão* foi expressa em termos de *repetibilidade*, ou seja, a precisão obtida por ensaio repetido de uma ou mais amostras durante um processo analítico [10]. Para tal, foram realizadas dez determinações consecutivas de uma amostra, com nível de concentração situado aproximadamente a meio da zona de linearidade, e foi determinado o desvio padrão relativo.

A *exactidão* foi demonstrada pela análise de amostras reais e comparação dos resultados obtidos com os viabilizados por metodologias de referência; no procedimento descrito para a determinação de cobre na urina (Capítulo V) foi também analisada uma amostra de referência certificada. Os pares de resultados obtidos foram submetidos a dois tipos de tratamentos estatísticos:

i) determinou-se o erro relativo (ER), expresso pela equação

$$ER\ (\%) = (C_M - C_R)/C_R \times 100$$

em que C_M corresponde à concentração obtida pela metodologia proposta e C_R ao valor obtido pelo procedimento de referência;

ii) aplicou-se o teste de *t*-student emparelhado, testando-se a hipótese nula para um nível de significância de 95%.

No caso do procedimento proposto para determinação de cobre na urina (Capítulo V), procedeu-se ainda ao traçado de uma recta de correlação, admitindo como variável *x* os resultados fornecidos pelo método de referência e como variável *y* os resultados obtidos pelo procedimento em análise. Obteve-se uma relação linear do tipo [$C_M = a + b\ C_R$] entre os pares de valores; quanto mais próximos da unidade fossem *b* (declive) e R (coeficiente de correlação), e *a* (ordenada na origem) de zero, mais concordantes eram considerados os resultados obtidos pelos dois métodos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Z. Marczenko, M. Balcerzak, *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*, Elsevier, Amsterdão, 2000.
2. G.A. Baker, J.D. Jordan, F.V. Bright, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 11 (1998) 43-54.
3. M. Chakraborty, D. Chowdhury, A. Chattopadhyay, *J. Chem. Ed.* 80 (2003) 806-809.
4. P. Schneider, *Appl. Catalysis A* 129 (1995) 157-165.
5. A. Díaz-Parralejo, R. Caruso, A.L. Ortiz, F. Guiberteau, *Thin Solid Films* 458 (2004) 92-97.
6. D.C. Joy, *Ultramicroscopy* 37 (1991) 216-233.
7. R. García, R. Peréz, *Surface Sci. Reports* 47 (2002) 197-301.
8. K. Camman, B. Ross, A. Katerkamp, J. Reinbold, B. Gründig, R. Renneberg, *Chemical and Biochemical sensors* in *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag, 2002.
9. J. Vessman, R.I. Stefan, J.F. van Staden, K. Danzer, W. Lindner, D.T. Burns, A. Fajgelj, H. Müller, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1381-1386.
10. J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4ª Ed., Prentice Hall, Harlow, 2001.
11. T.D. Yeran, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta* 204 (1988) 7-28.
12. J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329-343.
13. O.S. Wolfbeis, *J. Molec. Struct.* 292 (1993) 133-140.
14. P.C. Hauser, J.C. Litten, *Anal. Chim. Acta* 294 (1994) 49-56.
15. M. Varcárcel, M.D.L. Castro, *Analyst* 118 (1993) 593-600.
16. B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129-138.
17. J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, 2ª Ed., John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1988.
18. M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J.M. Calatayud, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 366-378.
19. F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119-131.

Capítulo IV

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ÓPTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES CATIÓNICAS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

4.1

DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE BISMUTO EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS UTILIZANDO UM SENSOR ÓPTICO ACOPLADO A UM SISTEMA DE FLUXO MULTICOMUTADO

Colorimetric Bismuth determination in pharmaceuticals using a xylenol orange sol-gel sensor coupled to a multicommutated flow system

Analytica Chimica Acta 504 (2004) 235-241

Um novo sensor sensível a Bi(III) foi desenvolvido pela incorporação de laranja de xilenol (XO) em filmes sol-gel, de espessura inferior a 1 μm, depositados sobre lamelas de vidro. Produziram-se várias soluções sol-gel, com o objectivo de avaliar o efeito de diferentes parâmetros reaccionais nas características finais do sensor. Verificou-se que os filmes baseados em tetrametoxisilano (TMOS) como precursor, ácido nítrico como catalisador, razão molar água:alcóxido de 2 e concentração de XO imobilizado de 1.5 g l^{-1}, eram os mais adequados para serem utilizados como sensores de Bi(III). Nas condições de trabalho propostas, apresentaram boas características de sensibilidade, reversibilidade e estabilidade, lixiviação reduzida e tempo de resposta rápido.

Estes sensores foram acoplados a um sistema de fluxo multicomutado para determinação de Bi(III) em produtos farmacêuticos. A absorvância do complexo estabelecido entre Bi(III) e XO imobilizado foi monitorizada a 515 nm. O ião Cl^-, que forma complexos estáveis com Bi(III) e inibe de forma selectiva a formação do complexo com XO, foi utilizado para regeneração dos sensores. Obteve-se resposta linear para concentrações de Bi(III) compreendidas entre 125.0 e 875.0 μg l^{-1}, com limite de detecção de 7.0 μg l^{-1}, frequência de amostragem de 45 amostras por hora e RSD < 0.8%. Os resultados obtidos na análise de amostras reais foram comparados com os obtidos pelo método de referência da Farmacopeia Britânica (método titrimétrico com EDTA), tendo-se obtido erros relativos inferiores a 5%.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Analytica Chimica Acta 504 (2004) 235–241
ANALYTICA CHIMICA ACTA
www.elsevier.com/locate/aca

Colorimetric bismuth determination in pharmaceuticals using a xylenol orange sol–gel sensor coupled to a multicommutated flow system

Paula C.A. Jerónimo[a], Alberto N. Araújo[a,*], M. Conceição B.S.M. Montenegro[a], Dalibor Satinský[b], Petr Solich[b]

[a] *REQUIMTE, Departamento de Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha 164, Porto 4050-047, Portugal*
[b] *Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovskeho 1203, 50005 Hradec Kralove, Czech Republic*

Received 5 June 2003; received in revised form 3 October 2003; accepted 16 October 2003

Abstract

A new sol–gel Bi(III) sensor was developed by incorporating xylenol orange (XO) into sol–gel thin films (<1 μm thick) coated on glass slides. Several sols were produced in order to evaluate the effect of different processing parameters on the final characteristics of the sensor. Sensor films based on tetramethoxysilane (TMOS) as precursor, nitric acid catalysis, water:alkoxide ratio of 2 and XO concentration of 1.5 g l^{-1} were found to be the most suitable to be used as Bi(III) sensors. They presented good sensitivity, reversibility and stability, low leaching and fast response time in the proposed working conditions. These sensors were coupled to a multicommutated flow system for the determination of Bi(III) in pharmaceutical products. The absorbance of the Bi(III)-immobilized XO complex formed was monitored at 515 nm. The regeneration of the sensor was accomplished by flowing a Cl^- ion solution through the flow cell containing the sensor membranes. The procedure enables a relative standard deviation of results better than 0.8%, an analytical concentration range between 125.0 and 875.0 μg l^{-1}, a detection limit of 7.0 μg l^{-1} and a sampling frequency of 45 samples per hour. The results obtained on real samples analysis were compared with those obtained by EDTA titrimetric method (British Pharmacopoeia), with relative deviation errors inferior to 5%.
© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bi(III) optical sensor; Sol–gel films; Multicommutated flow analysis; Pharmaceutical formulations

1. Introduction

The sol–gel technology has been widely used in the preparation of sensors and biosensors since it provides a simple means to incorporate, at low temperature, organic and biological recognizing elements in an optically clean, mechanically and thermally stable inert support [1,2]. Typically, a sol is first formed by mixing a liquid alkoxide precursor, water, a co-solvent (usually ethanol or methanol) and a catalyst (acid or base) at room temperature [3]. Through continuous monomer hydrolysis and condensation reactions, a porous gel network is obtained. Afterwards, gel aging and drying can be conducted under controlled conditions in order to obtain densified solid matrices. During the steps of hydrolysis, condensation or aging, the sensor recognizing elements can be easily added and become entrapped in the support net, yet remaining sterically accessible to small analytes that diffuse into the pore network. A major advantage of sol–gel technology results from the process ability to tailor the network structure, thickness, pore size, and pore distribution by appropriate control of the variables of the preparation procedure [4,5].

When sensor optical transduction is intended flow cells using wave-guide coated sol–gel sensor films are commonly resorted due to their short response time and good optical transparency. By coupling sensing devices to automated continuous flow techniques mutual advantages can be observed [6]. First, simpler manipulation of solutions, simplified manifolds, reagent economy, and cleaner determination procedures are feasible. Moreover, sensor performance characteristics such as selectivity improvement, reduced response time, suitable regeneration, and stable extended use of sensors are obtained through their use as detectors in flow manifolds. This is the case of sensors towards metal ions, in which adequate selectivity is difficult to attain [7]. This paper reports on the development of a new Bi(III) optical sensor based on the immobilization of xylenol orange (XO) in a sol–gel thin film. The sensor was included

* Corresponding author. Fax: +351-2-22004427.
E-mail address: anaraujo@mail.ff.up.pt (A.N. Araújo).

0003-2670/$ – see front matter © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.aca.2003.10.049

in a flow through cell, coupled to a multicommutated flow system [8,9] and successfully applied to the determination of bismuth in pharmaceutical products.

Bismuth compounds have been used orally for their astringent and antidiarrhoeal properties in a wide range of gastrointestinal tract disorders. Certain salts have antibacterial effects against *H. pylori* and are used particularly for ulceration and peptic gastritis. Bismuth has also been applied topically in skin disorders and anorectal disorders such as haemorrhoids [10]. Although bismuth intestinal absorption is low, toxicity is possible with excessive overingestion and is related with neurotoxicity, encephalopaty, and kidney damage [10,11]. Numerous procedures have been reported for the assessment of bismuth in pharmaceutical products. Official methods are based on EDTA titration with several indicators; xylenol orange is used in the current British Pharmacopoeia method [12]. Several spectrophotometric methods have been reported [13–22] and some of these include flow injection procedures [15,17,21,22]. Most of them are based on previous liquid–liquid extraction procedures [13,14,16–21], which are time consuming and require controlled reaction conditions. The method proposed in the present work is based on the reaction of Bi(III) with immobilized XO in strongly acidic medium to form a red colored XO–Bi(III) complex which is monitored colorimetrically at 515 nm. Cl^- ion, which forms stable complexes with Bi(III), is used for regeneration of the sensors.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Analytical grade chemicals were used without further purification. Milli-Q (Millipore) de-ionized water was used to prepare all solutions.

Tetramethoxysilane (TMOS, product no. 87680); tetraethoxysilane (TEOS, product no. 86578); methyltriethoxysilane (MTES, product no. 69435); polyethylene glycol 6000 (PEG, product no. 81253); and nitric acid (product no. 84385) were from Fluka. Xylenol orange tetrasodium salt (product no. 108677), ethanol, sodium chloride, chloridric acid, and sulphuric acid were purchased from Merck.

A stock standard solution containing 1.00 g l^{-1} Bi(III) was prepared by dissolving 0.2321 g of bismuth(III) nitrate pentahydrate (product no. 24,859-2, Aldrich) in 50.0 ml HNO_3 1:1 (v/v) and water to 100.0 ml. Working bismuth solution (1000.0 μg l^{-1}) was obtained by dilution of this stock standard with 7.0 mol l^{-1} HNO_3.

Four pharmaceutical products available in the Portuguese market (Pylorid™, Gastrimuto® and De-Nol® tablets and Synalar® Rectal ointment) were used as samples. Five tablets of each tablet sample were weighed, ground in a mortar and homogenized. From each powdered sample and from the ointment an accurately weighed amount was taken (corresponding to ca. 5.0 mg of bismuth) and 4.0 ml of 14.0 mol l^{-1} HNO_3 were added. The mixture obtained was evaporated nearly to dryness on a sand-bath [22]. This procedure was repeated three times to ensure complete removal of possibly existing Cl^- ions in the form of volatile HCl. The residue was dissolved in 100.0 ml of 7.0 mol l^{-1} HNO_3 and filtered if necessary. From this solution, 2.0 ml were taken and dissolved again in 100.0 ml of 7 mol l^{-1} HNO_3.

2.2. Apparatus

Conventional absorbance measurements for sensors characterization were performed in a Lambda 45 UV-Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA). Thickness of the sol–gel films was measured in an Alpha-Step 200 profilometer (KLA/Tencor Instruments, Milpitas, CA).

The flow manifold comprised four NResearch 161 T031 three-way solenoid valves (Stow, MA, USA) and a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) equipped with isoversinic pump tube of the same brand. Flow lines were built using PTFE 0.8 mm i.d. tubing. For absorbance measurements in the flow system plastic optical fibers (FOP1-ST) connected to a digital color wheel source (FOCWDIG), a silicon photodiode detector (VISD), and a photodetector amplifier (PDA1) from World Precision Instruments (WPI, FL, USA) were used. The manifold devices control and signal acquisition were accomplished through a home-made QuickBasic 4.5 software program, using a computer equipped with a PCL 711 S Advantech interface card.

2.3. Preparation of sol–gel thin films

Square glass slides (18 mm × 18 mm) were used as substrates for film deposition. Prior to film coating, the substrates were treated with concentrated nitric acid, ethanol, and rinsed with distilled water, followed by drying at 100 °C, in order to activate the silanol groups on the surface of the glass. Ten different types of sol–gel thin films were prepared to evaluate the effect of different reaction parameters on the final characteristics of the sensor. Water:alkoxide ratio, pH, type of acid used as catalyst and type of precursor (TEOS, TMOS, and MTES), concentration of immobilized XO and the addition of a surfactant (PEG 6000) were studied. The compositions of the sols, their aging times, as well as the concentration of XO and the molar ratio of acid water to alkoxide precursor (R) are summarized in Table 1. All the sol–gel solutions were prepared in Teflon vials and allowed to gelate at room temperature. They were mechanically stirred during all aging process prior to coating. Films 1–8 were deposited by dip-coating (3 cm min^{-1}); films 9 and 10 were obtained by spin-coating (80 μl of solution coated at 3000 rpm for 15 s). After coating, all films were dried at room temperature for several days.

2.4. Procedures

First of all, triplicate thickness measurements for each type of film were obtained by profilometry in order to

Table 1
Composition of sols for preparation of sensor thin films

		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
TMOS	(ml)	–	–	–	–	–	–	–	–	4.0	–
TEOS	(ml)	–	3.6	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	–	4.0
MTES	(ml)	9.0	0.4	–	–	–	–	–	–	–	–
Ethanol	(ml)	9.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0
XO	(mg)	18.00	30.97	30.97	30.97	20.65	41.30	61.95	30.97	31.47	31.94
HCl (10^{-2} mol l^{-1})	(ml)	–	0.648	–	–	0.645	0.645	0.645	–	–	–
PEG + HCl (10^{-2} mol l^{-1})	(ml)	–	–	0.645	–	–	–	–	–	–	–
Concentrated HCl	(ml)	0.180	–	–	–	–	–	–	–	–	–
HNO_3 (10^{-2} mol l^{-1})	(ml)	–	–	–	–	–	–	–	0.645	0.980	1.290
H_2SO_4 (0.05 mol l^{-1})	(ml)	–	–	–	0.645	–	–	–	–	–	–
XO	(g l^{-1})	1	1.5	1.5	1.5	1	2	3	1.5	1.5	1.5
R		<2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
Gelation time	(h)[a]	24	>24	22	48	20	<20	<20	20	24	24

[a] Aging time of the solution before coating.

evaluate the influence of coating method and aging time of sol–gel solution. To enable immobilized XO and its complex with Bi(III) spectra, solutions containing between 0.1 and 0.5 mg l^{-1} in Bi(III) were prepared in increasing concentrations of H_2SO_4 and HNO_3 solutions. Afterwards, the films were immersed in each solution and the corresponding spectra were recorded in the wavelength range of 400–600 nm against a bare glass slide immersed in the same solutions. The extent of leaching was evaluated by immersing up to 60 times each prepared sol–gel film doped with XO for 60 s intervals in 2.0 ml of 7.0 mol l^{-1} HNO_3 solution. After each interval the sensor was withdrawn and the absorbance of the solution registered at the wavelength of 440 nm (wavelength of maximum absorbance for XO). The response time of the sensor films and their analytical performance were accomplished at the wavelength of 515 nm (maximum absorbance for the XO–Bi(III) complex) under flow conditions by incorporating two slides of each type in a home-made flow through cell with an internal volume of 90 μl (Fig. 1a) by coupling it to a multicommutated flow system (Fig. 1b).

The flow manifold contained four three-way solenoid valves, V_1, V_2, V_3, and V_4, which enabled the access of sample, carrier, or regeneration solution by a programmed activation cycle (Fig 1c). The substitution of solutions accessing the system through valves V_1 (sample), V_2 (carrier) and V_3 (regeneration solution) was made possible by simultaneous activation of each one of these valves together with valve V_4 during 10 s. The sample flow through the mixing coil L placed before the detector was ensured by simultaneous activation of valves V_1 and V_2 for 40 s. During this time period 10 cycles ON/OFF lasting 4 s each were applied to each valve. By this way a binary sampling of sample and carrier (HNO_3 7.0 mol l^{-1} solution) allowed the insertion of small plugs of each solution, which after mixing in coil L enabled the appropriate conditions for bismuth(III) sensing. By selecting different ON/OFF time ratios different sample/carrier dilutions could be produced. This procedure was used for calibration purposes resorting to only one 1000.0 μg l^{-1} bismuth calibrating solution. To achieve

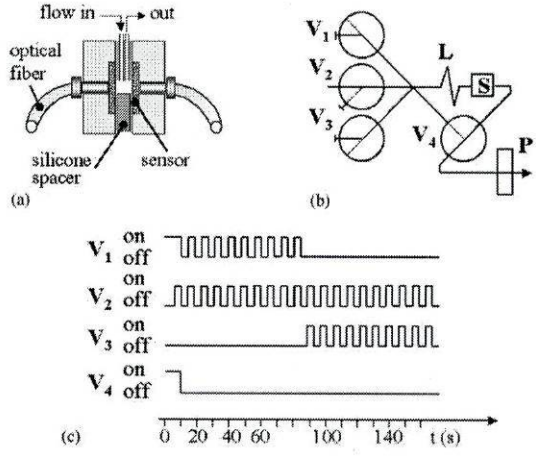


Fig. 1. (a) Flow cell configuration, cross-sectional view. (b) Diagram of the flow manifold for bismuth(III) determination. V_1, V_2, V_3, and V_4—three-way solenoid valves: (- - -) corresponds to the activated position and (—) corresponds to the "off" position; L: mixing coil, 25 cm long; S: sensor; P - peristaltic pump. (c) Sequence for on-line dilution and introduction of sample, carrier, and regeneration of Cl^- solution. High-level line indicates valve in "on" position and low-level line the valve in "off" position.

sensor regeneration 10 ON/OFF cycles were applied simultaneously to valves V_2 and V_3. In the same manner as for sample flow, small plugs of 0.5 mol l^{-1} sodium chloride solution were inserted between small plugs of carrier solution.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of sol–gel films preparation

Xylenol orange is widely used as a photometric reagent in the determination of several cationic species including bismuth, yielding reddish violet complexes [23]. It has also

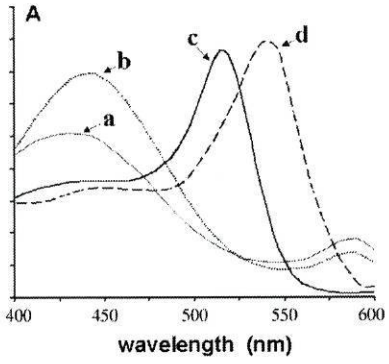


Fig. 2. Absorbance spectra of (a) XO in sensor F1; (b) XO in H_2SO_4 0.05 mol l^{-1} solution; (c) XO–Bi(III) complex in sensor F9 in HNO_3 7.0 mol l^{-1}; and (d) XO–Bi(III) in H_2SO_4 0.05 mol l^{-1} solution.

been used in sol–gel sensors to accomplish lead determinations [24]. Hence, this reagent was selected for implementation of the bismuth sensor. Considering the goals of a good sensor membrane, namely high selectivity, reversibility, fast response, and stability, several types of sol–gel membranes were prepared to evaluate the influence of the type of alkoxide monomer, water:alkoxide ratio, nature and concentration of catalyst, XO concentration, aging time, and coating method (Table 1). Therefore, the most frequently used precursors in the sol–gel process, tetramethoxysilane and tetraethoxysilane, were used, being an amount of twenty coated slides of each type prepared for testing and mean results evaluated. It was decided to include also methyltriethoxysilane once previous reports evidenced that it could influence porosity and contribute to stabilize the films [3,25]. All the TEOS- or TMOS-based films prepared presented a yellow color with absorption maximum around the wavelength of 440 nm. The spectra obtained were similar to that obtained for XO in acidic solution, evidencing that the immobilization procedure does not affect significantly its chemical structure. However, for films containing MTES a hypsochromic effect of about 7 nm was registered, evidencing a perturbation of XO electronic structure (Fig. 2).

When MTES was used as single precursor (F1) the films obtained had very low optical transparency, which made them inadequate to be used as optical sensors. The co-polymerization of MTES with TEOS (F2) rendered cloudy films, still with tolerable optical quality, but this strategy proved to be ineffective for the production of this particular sensor. As can be seen in Fig. 3, films F2 showed initial high leaching rate, which, despite being inferior to similar films based on TEOS alone (F5), was still high when compared to the remaining films. In addition, for films F2 no colorimetric response in the presence of bismuth was registered after the leaching trials, suggesting that final porosity was insufficient for analyte diffusion in the membrane or that their hydrophobic characteristics impair their analytical application. In aqueous media TMOS has a larger hydrolysis rate when compared with TEOS, and so the gel point was reached faster and the films obtained had decreased porosity, which was confirmed for membrane F9, for which no significant leaching was registered even after long immersion periods in acidic solution (Fig. 3). As an alternative to the use of MTES concerning film homogeneity and leaching profile, the co-entrapment of PEG 6000 was tried (F3) [3,26]. As a result, reduced leaching was observed (Fig. 3), but also reduced sensitivity and increased response times (Fig. 4) were obtained when films F3 were applied to bismuth determination.

Chloridric (F1–F3, F5–F7), nitric (F8–F10), and sulfuric (F4) solutions were tested as catalysts. All the films obtained presented uniform aspect, but the use of chloridric acid corresponded to films with higher leaching characteristics when compared with those obtained with nitric acid. The use of sulfuric acid as catalyst showed to be inadequate once the sol needed at least 48 h of gelation, and since it speeds up

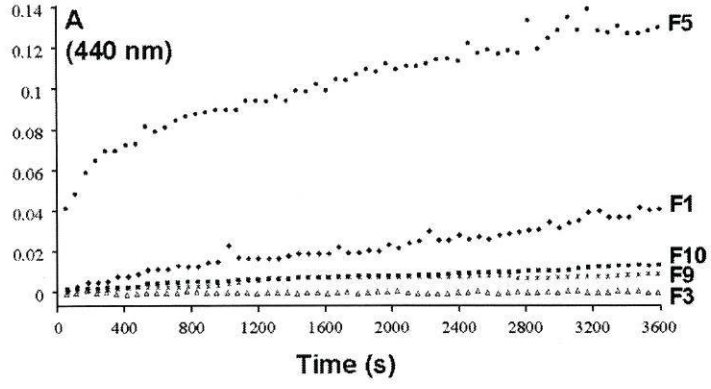


Fig. 3. Leaching of XO from sol–gel films F1, F3, F5, F9, and F10 in 7.0 mol l^{-1} HNO_3. Absorbance of leachant was measured at the wavelength of 440 nm in 60 s intervals.

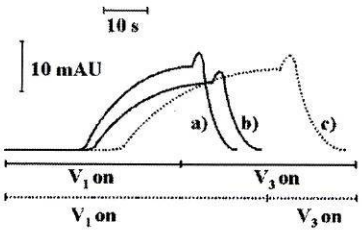


Fig. 4. Response time and reversibility of (a) F9, (b) F3, and (c) F8 when exposed to 500.0 μg l^{-1} Bi(III).

the hydrolysis rate of ethoxy groups it allows the formation of peculiar particles which impairs further condensation after the coating step [27]. Thus, films F4 became disrupted when immersed in acidic media containing the analyte.

XO concentration was also assessed in order to obtain films with increased sensitivity. Films F5–F7 were prepared with increasing concentrations of xylenol orange. For the sensors prepared with 1.0 g l^{-1} in XO (F5) the developed color was very tenuous. The use of XO in concentrations higher than 2.0 g l^{-1} rendered films with irregular surface and low optical transparency. As a compromise, the concentration of 1.5 g l^{-1} in XO was fixed in the remaining studies.

To the increase of molar water/alkoxide ratio (R) corresponds a decrease in thickness, shrinkage, and pore volume of sol–gel films, which is consistent with faster hydrolysis and condensation rates due to increased water content [28,29]. Under the conditions of low R value (R = 2, F8 and F9) a matrix with a more open structure is produced, which seems to be favorable to the formation of the Bi(III)–XO complex. Furthermore, increased sensitivity was obtained. With higher R (R = 4, F10), films presented low leaching profile (Fig. 3) but they lost analytical response after the leaching trials.

Having established the optimized composition of XO sol–gel sensor films, the influence of the coating procedure was evaluated by resorting to dip-coating and spin-coating techniques. Withdrawal speed of the glass slide from the sol–gel solution in dip-coating procedure, and spin rate, time and coating solution volume in spin-coating procedure were optimized by a trial and error basis in order to obtain smooth and homogeneous coatings. In these conditions a mean film thickness of about 1.0 ± 0.1 μm for dip-coating procedure and of about 0.46 ± 0.02 μm for spin-coating were obtained. However, sensors obtained by dip-coating exhibited increased response time due to their enlarged thickness (Fig. 4) albeit equal sensitivity. Hence, it was decided to proceed the application to real analysis considering only the sensors obtained by spin-coating (F9).

3.2. Sensor performance under flow conditions

In solution, the complex formed between XO and Bi(III) presents an absorbance maximum between 540 and 545 nm if sulfuric acid or nitric acid solutions with concentrations in the range 0.05–0.1 mol l^{-1} and 0.08–0.12 mol l^{-1}, respectively, are used [23,30,31]. To evaluate the developed sensor under flow conditions two of the coated slides were inserted in a home-made flow-cell (Fig. 1a), which was coupled to a multicommutated flow system (Fig. 1b). This was selected once its binary sampling characteristics enable homogeneous flow streams of reactants, which are important when minimization of Schlieren noise is intended [8,32]. Therefore, flow-rate was fixed at 0.8 ml min^{-1}, and equal and reduced activation times of valves V_1 or V_3 were selected in order to provide appropriate mixture of sample (or chloride solution) with the carrier (nitric acid solution).

Different chemical conditions were observed for color development in the sensing films. For all the prepared films (F1–F10) the complex XO–Bi(III) exhibited maximal absorption between 515 and 517 nm (Fig. 2) and the reaction only occurred when nitric acid solution with concentration above 4.0 mol l^{-1} was used as carrier. This non-classical behavior evidenced by trapped XO could result from two factors: (i) the complex equilibrium of XO–Bi(III) binding [31] and (ii) a modification of XO induced by the heterogeneous microenvironment in which the molecule is immobilized [33–36]. Xylenol orange possesses two independent chelating groups and so it can react with Bi(III) to yield different coordinated chelates. The complexes formed over the pH interval from 0.2 to 1.0 have a Bi : XO = 1 : 1 composition and absorption maximum at 550 nm, while at pH above 1.0 complexes Bi : XO = 1 : 2 are preferably formed, with maximum absorption at 500 nm [31]. This strong influence of pH on the type of complex formed is critical when XO is confined in the sol–gel matrix porous network. Several reaction products coexist in the sensor membrane, with different stoichiometry, and probably different formation constants and molar absorptivities. Moreover, a fraction of immobilized XO can remain sterically inaccessible to Bi(III) ions. In this manner, the thermodynamics of complex formation in gel pores may differ considerably from that in bulk solution [24,37].

The second factor is that optical properties of indicator molecules in a sol–gel matrix can change with respect to those of liquid solutions due to physical and/or chemical interactions with the silica rigid cage [33]. The evolution of polycondensation reactions induces changes in the sol–gel matrix that may cause pK_a shifts in the trapped indicator, directly dependent on the matrix polarity, and change its form [26,34–36]. Pore size and pore-walls characteristics have great influence on the ability of the entrapped ligand to move or reorient inside the pores. Small pores may restrict translational freedom; interactions between surface hydroxyl groups and water modify solvent structure, which affects enthalpy and entropy terms in complexation reactions [34,37].

Since XO–Bi(III) complex is masked by Cl^-, Br^-, and I^- ions, and Cl^- ion does not affect XO complexes with Zr, Hf, Fe, and Sn, its specific masking behavior may be used to determine Bi(III) selectively in the presence of other metals

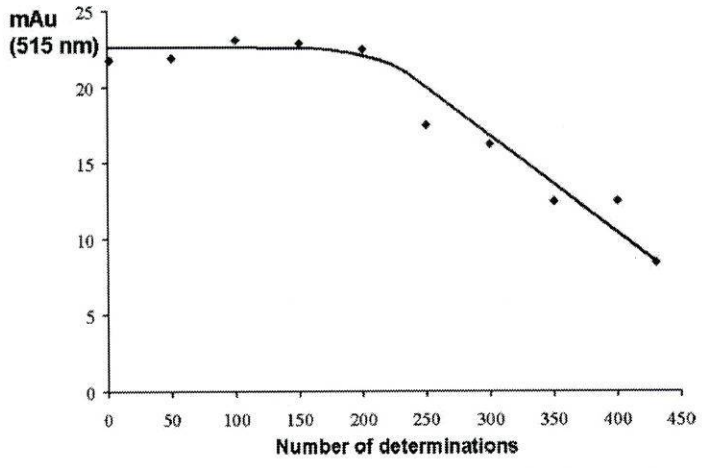


Fig. 5. Profile of absorbencies obtained for the F9 sensor films after successive injections of a calibrating solution containing 500.0 μg l^{-1} Bi(III).

which also form colored complexes with XO [23,30]. Approximately 16 mM of Cl^- are required to completely mask 100 μg of bismuth [30]. Taking into account that this solution is two-fold diluted with the carrier, a 0.5 mol l^{-1} NaCl solution was used for regeneration of the sensors. Under the before mentioned chemical and hydrodynamic conditions, the sensor started to produce response just 17 s after activation of valve V_1 (Fig. 4). By injecting a standard solution containing 500.0 μg l^{-1} Bi(III) a steady state signal was achieved in 40 s, which underlines the fast response of the developed sensor. The regeneration step was complete 15 s after activation of valve V_3.

Five successive calibrations were performed by injection of seven calibrating solutions with concentrations ranging between 125.0 and 875.0 μg l^{-1}. The general calibration equation (mAU = $0.0345 (\pm 5.0 \times 10^{-4}) \times$ [Bi(III)] + 5.1 ($\pm$0.3)) was obtained with a correlation coefficient of 0.9995. The detection limit of 7.0 μg l^{-1} was also calculated from the standard deviation of the signals obtained by injection of a blank without analyte (3σ).

A maximum sampling frequency of 45 samples per hour was achieved. The useful lifetime of the developed sensor was also evaluated by consecutive injections of a calibrating solution containing 500.0 μg l^{-1} Bi(III), having noticed a decrease of sensitivity after more or less two hundred determinations (Fig. 5).

3.3. Real sample analysis

To assess the usefulness of the sensor-based procedure, four pharmaceutical products available in the Portuguese market (Pylorid™, Gastrimuto® and De-Nol® tablets, and Synalar® Rectal ointment) were selected. The most important potential interference comes from Cl^- ions present in samples, which form stable complexes with Bi(III). By this, sample pre-treatment was employed to eliminate chloride interference. The possible influence of other ions likely to be present in pharmaceutical samples and also likely to establish stable complexes with XO was checked for the determination of 500.0 μg l^{-1} Bi(III). The results obtained (Table 2) evidenced the good selectivity of the developed sensor. The results obtained for the samples examined (Table 3) with five replicate injections ($n = 5$) are in good agreement with the labeled information given by the manufacturer and with the results obtained with EDTA titrimetric method [12].

Table 2
Effect of potentially interfering ions in the determination of 500 μg l^{-1} of bismuth

Ion	Ratio to Bi (w/w)	Change in absorbance (%)
Ca	10	−0.4
Mg	10	−3.5
Zn	10	+1.5
Fe(III)	10	−4.1
Fe(II)	10	+2.0
Pb	10	−4.5

Table 3
Determination of bismuth in pharmaceuticals

Sample	Labeled bismuth content (mg)	Bismuth found (mg)[a] EDTA titrimetric method [12]	Bismuth found (mg)[b]
Pylorid™	400[c]	387.2 ± 2.2	387.3 ± 3.9
Gastrimuto®	400[c]	387.6 ± 2.3	388.8 ± 3.8
De-Nol®	120[d]	118.2 ± 0.2	118.8 ± 1.9
Synalar® Rectal	50[e]	50.3 ± 1.6	50.8 ± 0.4

[a] Mean of three results.
[b] Mean of five results.
[c] Milligram of ranitidine bismuth citrate per tablet.
[d] Milligram of Bi_2O_3 per tablet.
[e] Milligram of bismuth subgallate per gram of ointment.

4. Conclusions

The sol–gel entrapment of xylenol orange provided optical sensing films selective and sensitive to bismuth(III), with low leaching characteristics, fast response, and long life time. Their insertion in continuous flow-systems offers interesting features, such as low detection limit, reagent economy, flow simplicity, and minimum previous pre-treatment. It also proved to be convenient for the determination of bismuth(III) in a variety of pharmaceutical products.

Acknowledgements

One of the authors (P.C.A.J.) wishes to thank FCT and FSE (III QCA) for a Ph.D. Grant (SFRH/BD/2876/2000).

References

[1] J. Lin, C.W. Brown, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 200.
[2] W. Jin, J.D. Brennan, Anal. Chim. Acta 461 (2002) 1.
[3] C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol–Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing, Academic Press, New York, 1990.
[4] O. Lev, Analysis 20 (1992) 543.
[5] O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovitch, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, J. Gun, Anal. Chem. 67 (1995) 22A.
[6] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Analyst 118 (1993) 593.
[7] I. Oehme, O.S. Wolfbeis, Mikrochim. Acta 126 (1997) 177.
[8] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119.
[9] M.C. Icardo, J.V.G. Mateo, J.M. Calatayud, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 366.
[10] Martindale, The Complete Drug Reference, 32nd ed., Pharmaceutical Press, 1999.
[11] J.L. Burguera, M. Burguera, C. Rivas, C. Rondon, P. Carrero, M. Gallignani, Talanta 48 (1999) 885.
[12] British Pharmacopoeia, appendix VIII D, vol. II, H.M. Stationary Office, London, 1998.
[13] H. Onishi, N. Ishiwatari, Talanta 8 (1961) 753.
[14] K. Hasebe, M. Taga, Talanta 29 (1982) 1135.
[15] M. Trojanowicz, W. Augustyniak, A. Hulanicki, Mikrochim. Acta II (1984) 17.
[16] Y.K. Agrawal, V.J. Bhatt, Analyst 109 (1984) 1287.
[17] D.T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriot, Anal. Chim. Acta 225 (1989) 449.
[18] D.T. Burns, M.D. Dunford, Anal. Chim. Acta 334 (1996) 209.
[19] D.T. Burns, C.D.P. Dangolle, Anal. Chim. Acta 337 (1997) 113.
[20] D.T. Burns, N. Tungkananuruk, S. Thuwasin, Anal. Chim. Acta 419 (2000) 41.
[21] A. Alonso, M.J. Almendral, M.D. Báez, M.J. Porras, F.L. Lavín, C. García de María, Anal. Chim. Acta 408 (2000) 129.
[22] D.G. Themelis, P.D. Tzanavaras, J.K. Papadimitriou, Analyst 126 (2001) 247.
[23] Z. Marczenko, Spectrophotometric Determination of Elements, Horwood, New York, 1976.
[24] L. Yang, S.S. Saavedra, Anal. Chem. 67 (1995) 1307.
[25] P. Innocenzi, M.O. Abdirashid, M. Guglielmi, J. Sol–Gel Sci. Technol. 3 (1994) 47.
[26] C. Rottman, G. Grader, Y. De Hazan, S. Melchior, D. Avnir, J. Am. Chem. Soc. 121 (1999) 8533.
[27] M.A. Fardad, J. Mater. Sci. 35 (2000) 1835.
[28] M.A. Fardad, E.M. Yeatman, E.J.C. Dawnay, M. Green, F. Horowitz, J. Non-Cryst. Solids 183 (1995) 260.
[29] C. McDonagh, P. Bowe, K. Mongey, B.D. MacCraith, J. Non-Cryst. Solids 306 (2002) 138.
[30] K.L. Cheng, Talanta 5 (1960) 254.
[31] D. Kantcheva, P. Nenova, B. Karadakov, Talanta 19 (1972) 1450.
[32] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 366 (1998) 209.
[33] M. Casalboni, R. Senesi, P. Prosposito, F. De Matteis, R. Pizzoferrato, Appl. Phys. Lett. 70 (1997) 2969.
[34] B. Dunn, J.I. Zink, Chem. Mater. 9 (1997) 2280.
[35] C. Malins, T.M. Butler, B.D. MacCraith, Thin Solid Films 368 (2000) 105.
[36] D. Avnir, D. Levy, R. Reisfeld, J. Phys. Chem. 88 (1984) 5956.
[37] S. Wallington, T. Labayen, A. Poppe, N.A.J.M. Sommerdijk, J.D. Wright, Sens. Actuators B 38–39 (1997) 48.

4.2

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ÓPTICO DE MATRIZ SOL-GEL PARA DETERMINAÇÃO DE ZINCO EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Development of a sol-gel optical sensor for analysis of zinc in pharmaceuticals
Sensors and Actuators B 103 (2004) 169-177

Um sensor óptico sensível a Zn(II) foi desenvolvido pela incorporação de 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) em filmes finos sol-gel. Foram estudados processos sintéticos baseados em catálise ácida e alcalina, assim como diferentes tipos de precursores e diferentes concentrações de PAR imobilizado. Os sensores baseados na co-polimerização de tetraetoxisilano (TEOS) com 3-aminopropiltrietoxisilano (3-APTES), catálise alcalina, razão molar água:alcóxido de 4 e concentração de PAR de 1.0 g l^{-1}, mostraram desempenho óptimo nas condições de trabalho propostas.

O sensor foi acoplado a um sistema de fluxo multicomutado e aplicado à determinação directa de Zn(II) em insulinas de acção lenta. A transdução óptica baseou-se na utilização de um LED bicolor e de um fotodiodo. O sensor mostrou resposta óptima a pH 5.5, com absorvância máxima a 500 nm. A sua regeneração foi efectuada com uma solução de KSCN, com pH ajustado ao valor 3 por adição de HCl. Obteve-se resposta linear para concentrações de Zn(II) compreendidas entre 5.0 e 25.0 μg l^{-1}, com limite de detecção de 2.0 μg l^{-1} e frequência de amostragem de 16 amostras por hora. A possível interferência de outros iões foi avaliada numa razão 10:1 (m/m) de ião interferente: Zn(II). Os resultados obtidos na análise de amostras reais estão de acordo com os obtidos por um método de referência, com erros relativos inferiores a 1.2%.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Sensors and Actuators B 103 (2004) 169–177
SENSORS AND ACTUATORS B CHEMICAL
www.elsevier.com/locate/snb

Development of a sol–gel optical sensor for analysis of zinc in pharmaceuticals

Paula C.A. Jerónimo, Alberto N. Araújo*, M. Conceição B.S.M. Montenegro

REQUIMTE/Departamento de Química-Física, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, R. Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal

Available online 28 May 2004

Abstract

A Zn(II) optical sensor was developed by incorporating 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) in a sol–gel thin film. Acid- and base-catalyzed methods to prepare the sol–gel layers have been studied, as well as different types of precursors and different PAR concentrations. Sensors based on co-polymerization of tetraethoxysilane (TEOS) with 3-amynopropyltriethoxysilane (3-APTES), basic catalysis, water:alkoxyde ratio of 4 and PAR concentration of 1.0 g l^{-1} showed optimum performance in the proposed working conditions. The sensor was coupled to a multicommutated flow system and applied to the direct determination of Zn(II) in injectable insulins. Optical transduction was based on the use of a dual-color LED and a photodiode. The sensor showed optimum response at pH 5.5 with maximum absorbance at 500 nm. Its regeneration was accomplished with a solution of KSCN acidified to pH 3.0 with HCl. Linear response was obtained for Zn(II) concentration range of 5.0–25.0 μg l^{-1}, with detection limit of 2.0 μg l^{-1} and sampling frequency of 16 samples h^{-1}. Interference from foreign ions was studied at 10:1 (w/w) ratio added ion:Zn. The results obtained on real samples analyzed were in good agreement with those obtained by a standard method, with relative deviation errors inferior to 1.2%.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Zn(II) optical sensor; Sol–gel films; 4-(2-Pyridylazo)resorcinol; Multicommutated flow analysis; Dual-wavelength; Pharmaceuticals

1. Introduction

Organic indicator dyes currently used in the spectrophotometric determination of various metal ions play a fundamental role in the design of chemical optical sensors [1]. Several classical indicators have been used in the development of optodes which were successfully applied to metal ions sensing, namely dithizone [2], xylenol orange [3], 5,10,15,20-tetra(*p*-sulfonatophenyl)porphyrin [4], PAN and other azo-derivatives [5–7]. There is a growing interest in developing new sensing schemes and immobilization methods to obtain optodes with improved characteristics.

4-(2-Pyridylazo)resorcinol (PAR) has become very popular as an unselective chelating agent since it forms very stable, water-soluble and highly colored complexes with the vast majority of transition metals [8–13]. In acetate medium (pH 3.0–6.0) PAR forms a red-orange 1:2 (metal:ligand) complex with zinc which can be monitored spectrophotometrically [8,14,15]. The molar absorptivity reported for the PAR–Zn(II) complex ($\varepsilon = 7.7 \times 10^4$ l mol^{-1} cm^{-1} [16]) is considerably greater than for other reagents, which makes PAR a superior chelating agent for zinc analysis [17]. PAR has been immobilized for metals sensing purposes in polymeric materials like XAD-4, XAD-7 and Dowex ion-exchange resins [5], and chitosane membrane [18].

When choosing the polymeric support for chemical sensors development, the sol–gel technology is a very promising and extensively investigated strategy [19–23], since it provides a low-temperature process to obtain porous silicate glass matrices in which organic reagents and molecular receptors may be easily entrapped. The structures obtained possess excellent properties, such as chemical and thermal stability, chemical inertness, high purity and homogeneity and very high transparency in a broad wavelength range from ultraviolet to infrared. One of the unique features of the sol–gel process is that the properties of the final network structure, such as hydrophobicity, thickness, porosity, flexibility, reactivity and stability, can be easily tailored by controlling the process conditions, the type and size of precursors and catalysis [19,20,23,24]. In addition, glass materials of various shapes can be easily prepared. Sol–gel thin films have proved to be excellent hosts for organic dyes [25].

This paper describes the incorporation of PAR in sol–gel thin films in order to obtain Zn(II) optical sensors, which

* Corresponding author. Tel.: +351-2-22078940; fax: +351-2-22004427.
E-mail address: anaraujo@ff.up.pt (A.N. Araújo).

0925-4005/$ – see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.snb.2004.04.049

were coupled to a multicommutated flow system and applied to the determination of zinc in pharmaceuticals.

Zinc compounds are found as active ingredients in pharmaceutical preparations such as ointments and creams for external use, collyria and ophthalmic ointments, mineral–vitamin supplements and mouthwashes [26]. Zinc is also an integral part of the injectable form of slow-action insulin. Thus, determination of zinc in pharmaceutical preparations is an important analytical task. A flow-through optode has already been developed and used for this purpose by Albero et al. [7], based on the immobilization of PAN in a plasticized PVC membrane. Albeit its simplified preparation procedure, it presented serious interference of several ions and short useful lifetime. The new sensor proposed in the present work intends to associate the advantages of the sol–gel technology with the high sensitivity of PAR. In addition, by coupling the sensor to a continuous flow technique, simpler manipulation of solutions, simplified manifold, reagent economy and a cleaner determination procedure may be achieved, with additional increase in sensitivity, stability and selectivity [27].

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Analytical grade chemicals were used without further purification, unless stated otherwise. Milli-Q (Millipore) de-ionized water with resistivity above 18 MΩ cm^{-1} was used to prepare all solutions.

Tetraethoxysilane (TEOS; ref. 86578) methyltriethoxysilane (MTES; product no. 69435), 4-(2-pyridylazo)resorcinol (product no. 82970) and nitric acid (product no. 84385) were from Fluka. Tetramethylammonium hydroxide, 25 wt.% solution in water (TMAOH; product no. 33,163–5) was purchased from Aldrich and 3-amynopropyltriethoxysilane (3-APTES, product no. A-3648) was from Sigma. Ethanol and potassium thiocyanate were from Merck. KSCN solution was purified from traces of metals with non-ionic polymeric adsorbent Amberlite XAD-2 (Sigma, product no. 21,646–1).

A stock standard solution containing 1.0 g l^{-1} Zn(II) was prepared by dissolving 100.0 mg of metallic zinc (product no. 8756, Merck) in a mixture of 2.0 ml of concentrated chloridric acid (Merck) and 1.0 ml of water and then diluting to 100.0 ml with distilled water. Working zinc solutions were obtained by dilution of this stock standard with water. Citrate, acetate, borate and phosphate buffer solutions with pH ranging from 3.0 to 8.0 were prepared with analytical grade reagents from Merck, and purified from traces of metals by shaking with portions of dithizone solution in $CHCl_3$.

Four injectable insulins available in the Portuguese market (Humulin Ultralenta®, Humulin Lenta®, Ultratard® and Monotard®) were used as samples. The contents of five ampoules of each insulin injection were blended and an accurately measured volume, corresponding to ca. 5.0 μg of Zn(II), was transferred into a 100 ml volumetric flask, diluted with water and mixed in a vortex.

2.2. Instrumentation

Conventional absorbance measurements for sensors characterization were performed in a Lambda 45 UV–Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer, Shelton, CT). Surface area, total volume of pores and average pore volume were estimated from N_2 adsorption/desorption analysis, performed on a Micromeritics ASAP 2000 apparatus (Mönchengladbach, Germany). Microstructure of the sensors was investigated using a scanning electron microscope (SEM) JEOL JSM-6360 (Peabody, MA), with an acceleration voltage of 20 kV, and an atomic force microscope (AFM) TopoMetrix Discover TMX2010 (Santa Clara, CA).

The flow manifold was assembled with four NResearch 161 T031 three-way solenoid valves (Stow, MA) and a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) equipped with isoversinic pump tube of the same brand. Flow lines were made of PTFE 0.8 mm i.d. tubing. For absorbance measurements in the flow system plastic optical fibers (ref. FOP1-ST) connected to a digital color wheel source (ref. FOCWDIG), a silicon photodiode detector (ref. VISD) and a photodetector amplifier (ref. PDA1) from WPI (World Precision Instruments, Florida) were used. The control of the commutation devices and signal acquisition were accomplished through VisiDAQ 3.1 Standard software program, using a computer equipped with a PCL-818 L Advantech interface card.

2.3. Preparation of the sensors

Different types of multicomponent sols were prepared by combining TEOS with MTEOS or 3-APTES in increasing ratios. Water:alkoxyde ratio and catalysis were also studied. The compositions of the most representative sols produced are summarized in Table 1. PAR was added to the sols previously dissolved in ethanol. For each type of film several increasing concentrations of PAR were tested, in order to study the effect of the immobilized reagent concentration. All the sol–gel solutions were allowed to gelate at room temperature and mechanically stirred continuously priors to coating. All the films were obtained by spin-coating (3000 rpm, 15 s,

Table 1
Composition of sols for preparation of sensor thin films (all values in ml)

	F1	F2	F3	F4
TEOS	4.0	3.6	–	3.0
MTES	–	0.4	–	–
3-APTES	–	–	4.0	1.0
Ethanol	16.0	16.0	16.0	16.0
HNO_3 (10^{-1} M)	2.0	2.0	–	–
TMAOH	–	–	2.18	2.18

100 μl) on glass slides 18 mm × 18 mm, previously treated with concentrated nitric acid, ethanol and rinsed with distilled water, followed by drying at 100 °C, in order to activate the silanol groups on the surface of the glass. After coating, all films were dried at room temperature for at least 5 days.

2.4. Characterization of the sensors

The different sensor films obtained were characterized in terms of spectral characteristics, porosity, surface area and extension of dye leaching.

To enable spectroscopic characterization and simultaneously study the effect of pH on the formation of immobilized PAR–Zn(II) complex, the sensors were immersed in Zn(II) solutions of two different concentrations (10.0 and 100.0 mg l^{-1}) prepared with buffers of pH ranging from 3.0 to 8.0. The correspondent spectra, as well as the ones referent to the sensor immersed on each buffer solution without zinc, were recorded in the wavelength range between 400 and 650 nm. The same study was carried out with 10.0 mg l^{-1} solutions of other ions capable of forming complexes with PAR.

Area and porosity of the films were estimated by recording the nitrogen adsorption/desorption isotherms at 77 K on the full range (0.1) of relative pressure P/P_0. Surface area and total volume of pores were calculated directly based on the mass of adsorbent after adsorption versus pressure. Average pore diameter was calculated as (4 × volume/BET area). Scanning electron microscopy was used to examine the surface morphology of the sensors. Differences between the acid and base catalyzed films were confirmed by atomic force microscopy.

The extent of leaching was evaluated by immersing the sol–gel film doped with PAR repeatably for 2 min intervals in 2.0 ml of buffer solution (pH 5.5). After each interval, the sensor was withdrawn and the absorbance of the solution registered at the wavelength of 410 nm (wavelength of maximum absorbance for PAR).

2.5. Flow system

The response time of the sensor films and their analytical performance were evaluated at the wavelength of 500 nm under flow conditions by incorporating two sensor layers in a home-made flow through cell with an internal volume of 240 μl (Fig. 1A) and by coupling it to a multicommutated flow system whose components were arranged as illustrated in Fig. 1B. Three-way solenoid valves V_1, V_2, V_3 and V_4 enabled the access of sample, carrier or regeneration solution by a programmed activation cycle (Fig. 1C). The sample flow through the mixing coil L placed before the detector was ensured by simultaneous activation of valves V_1 and V_2 during 100 s. In this time period, cycles ON/OFF lasting 4 s each were applied to each valve. In this way, a binary sampling of sample and carrier (acetate buffer solution, pH 5.5) allowed the insertion of small plugs of each solution, which after mixing in coil L were inserted in the flow cell containing the sensor layers for Zn(II) sensing. By selecting different ON/OFF time ratios, different sample/carrier dilutions

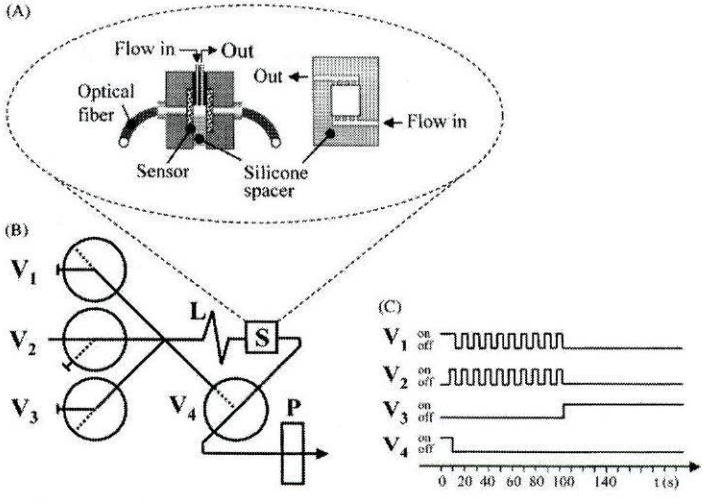


Fig. 1. (A) Flow cell configuration, cross-sectional view. (B) Diagram of the flow manifold for Zn(II) determination. V_1, V_2, V_3 and V_4—three-way solenoid valves: (- - -) corresponds to the activated position and (—) corresponds to the off position; L: mixing coil, 25 cm long; S: sensor; P: peristaltic pump. (C) Sequence for on-line dilution and introduction of sample, carrier and regeneration solution. High-level line indicates valve in on position and low-level line the valve in off position.

could be produced. This procedure was used for calibration purposes resorting to one only zinc calibrating solution. Afterwards, valve V_3 was activated continuously during 120 s for insertion of the regeneration solution (1 mol l^{-1} KSCN, pH 3.0). Valve V_4 enabled sample change by simultaneous activation with valve V_1 for 10 s. Flow rate was fixed at 0.8 ml min^{-1}. The absorbance of the Zn(II)-immobilized PAR was recorded at the wavelength of 500 nm using a dual-color (green/red) LED and a photodiode.

The effect of foreign ions in the determination of Zn(II) using the system described above was studied by adding the potentially interfering ions to samples containing

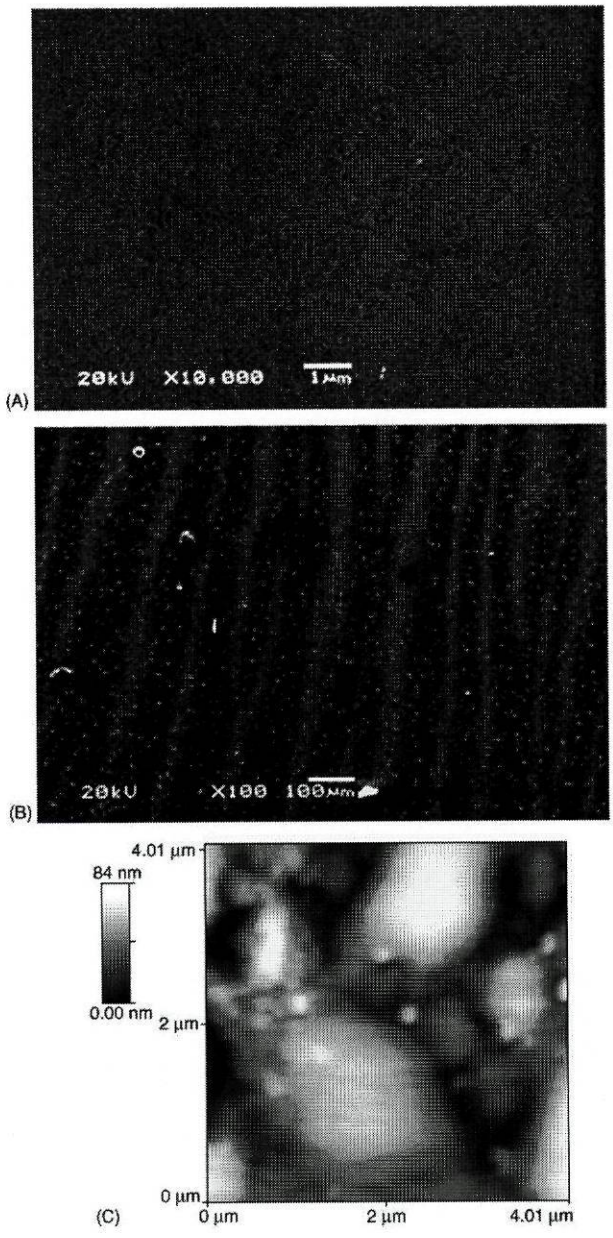


Fig. 2. SEM photos of film F1 (A) and film F4 (B). (C) AFM photo of film F4.

10.0 $\mu g l^{-1}$ Zn(II) in a ratio 1:10 (w/w) zinc:foreign ion. The degree of interference was evaluated by recording the analytical signal in the presence and in the absence of the interfering ion.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the sensors

The sol–gel process involves the hydrolysis of an alkoxyde precursor under acidic or basic conditions, followed by polycondensation of the hydroxylated monomers to form a porous gel network. Afterwards, gel aging and drying can be conducted in order to obtain densified solid matrices. The rate, extent and even the mechanism of the reaction are profoundly affected and may be controlled by many factors such as pH, water:alkoxyde ratio (R), type of catalyst, solvent and precursor [19,20].

The effect of the type of catalyst on the matrix structure is very strong. Acid catalysis is the most frequently used method in the production of sol–gel optical sensors because it typically produces structures with higher durability, regular surface and less prone to leaching [28]. Under acid catalysis, gels composed of entangled linear chains and low pore volume matrices are formed [19,20,29] and so it was the first strategy adopted for the preparation of the sensor. Films F1, based on polymerization of tetraethoxysilane with nitric acid, presented good optical quality, with regular and homogeneous structure (Fig. 2A) and extremely low porosity (Table 2). Simultaneously, films F2 were produced with the same catalyst but by mixing TEOS with methyltriethoxysilane, in order to influence porosity and obtain a more stable structure in a short time. Taking in account that the sol–gel matrix undergoes structural changes, namely pore size reduction, long after gelation as occurred [19], the addition of a more hydrophobic precursor reduces the number of free silanol groups on pore walls, preventing further polymerization and shrinkage [30]. The spectroscopic characterization of these two types of acid-catalyzed films (F1 and F2) showed no reaction with zinc on any of the pH values tested. The same was observed even when other ratios of MTES:TEOS were tried. This fact may be attributed to two factors: (i) the low pore volume which may be insufficient for the Zn(II)–PAR complex establishment; (ii) the ionization of the *para*-OH group in the PAR molecule, which occurs in acidic medium and is not favorable for the metal chelates forming mechanism [13].

Table 2
Porosity characterization of films F1 (acid-catalyzed) and F4 (base-catalyzed)

Sensor	Surface area ($m^2 g^{-1}$)	Total volume of pores ($cm^3 g^{-1}$)	Average pore diameter (nm)
F1	0.0852	0.01759	9.48
F4	1.3299	0.02224	51.21

In order to increase porosity maintaining good optical quality, and at the same time enable the reaction between immobilized PAR and zinc, the co-polymerisation of 3-aminopropyltriethoxysilane and TEOS associated with a base-catalyzed sol–gel method was tested (films F3 and F4). By a basic mechanism, a highly porous matrix with a more open structure is produced [19] and a basic medium also seems to be positive to the complexation mechanism of PAR [13]. 3-APTES is one of the most frequently used organo-silane coupling agents for sensors, because it has excellent affinity for glass silanols and it also provides a means of bonding between organic indicators and inorganic substrates, improving the uptake of the dye into the sol–gel matrix [31]. It contributes to stabilize the film in a similar way to that intended by the use of MTES in film F2, since it possesses a hydrophilic amino-group that is not involved in the sol–gel reactions. More, addition of 3-APTES to the sol inherently decreases the network connectivity and a more open framework is formed, with easier diffusion of the analyte into the film [32]. However, acid catalysts lead to protonation of the amino-group and immediate precipitation of 3-APTES, resulting in cloudy and double-phased gels, unsuitable for optical applications. A basic catalyst, like TMAOH, allows optically transparent gels even with high concentrations of 3-APTES, and reduces long gelation times usually associated with the use of this precursor [33]. Therefore, the approach adopted in films F3 and F4 seemed to offer multiple and mutual advantages in the preparation of this particular sensor. The films obtained presented good optical transparency, similar to the acid-catalyzed sensors F1 and F2. However, the SEM and AFM results (Fig. 2) evidence the morphological differences between acid- and base-catalyzed mechanisms, demonstrating that the surfaces of films prepared with a basic catalyst and a mixture of two alkoxyde precursors were rougher and more heterogeneous than those prepared with an acid.

Films F3, produced with 3-APTES as single precursor, as well as other films produced with 3-APTES:TEOS ratios higher than 1:3 (v/v), had good optical quality but poor mechanical resistance and presented extremely high leaching of PAR. They became immediately disrupted when immersed in buffer solution containing the analyte, even when leaching trials were performed after 1 month of film drying, which made impossible their spectroscopic characterization and analytical application. For films F4, with a 3-APTES:TEOS ratio of 1:3 (v/v), no significant leaching was registered even after long immersion times in buffer solution (Fig. 3), and so they were adopted for further studies.

Besides the type of catalyst and precursor, the amount of water has a strong influence on surface area and porosity, and it was also evaluated in this study. Theoretically, since water is one of the final products of the condensation reaction, a water:alkoxyde ratio (R) of 2 would be sufficient for complete hydrolysis and condensation. However, due to the formation of intermediate species, an excess amount of water is required [19]. An increase of R produces a decrease in

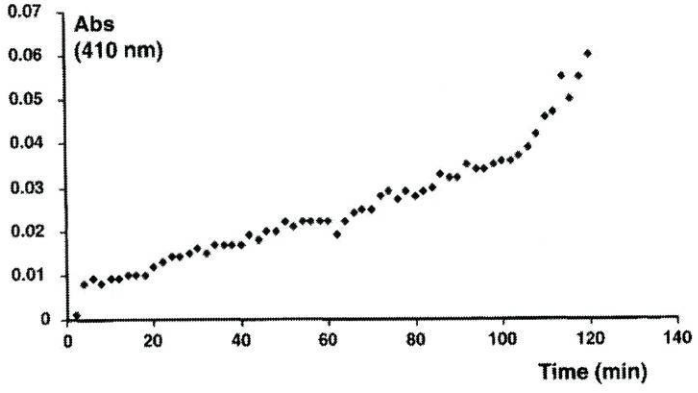


Fig. 3. Leaching of PAR from film F4. Absorbance of leachant was measured at the wavelength of 410 nm in 2 min intervals.

thickness, shrinkage and pore volume [34–36]. Films produced with $R = 2$ showed visible leaching when dipped in aqueous solution. So, R was adjusted to 4 in order to balance the high porosity typical of basic catalysis and polymerization of 3-APTES, and thus provide proper entrapment of PAR with minimal leaching.

The effect of the immobilized reagent amount was studied by using different initial concentrations of PAR, in the range 0.25–1.50 mg ml^{-1}. The higher the reagent concentration, the higher was the absorbance signal obtained, but concentrations of PAR above 1.0 mg ml^{-1} disturbed the optical quality of the films and the homogeneous distribution of the dye. Therefore, the concentration of 1.0 mg ml^{-1} of PAR was adopted.

After establishing the composition of the sensor, the optimum response features were evaluated. As shown in Fig. 4, the absorbance spectrum of the film was similar to the one characteristic of PAR in bulk solution [11], with maximum absorbance around 410 nm, which evidences that the immobilization procedure did not affect significantly the chemical structure of the dye. It can also be seen that the formation of a complex with zinc causes a decrease of absorbance at 410 nm and the appearance of a new absorption band with a maximum at 500 nm, which was the wavelength adopted for analytical measurements. At the same wavelength the appearance of a band for copper and a small absorption due to Fe(II) and Fe(III) were observed.

The complex formation between metal ions and PAR is highly dependent on the pH of the solution, because it involves protonation and deprotonation of the ligand [13]. For films F4, the optimum pH value for complex formation between immobilized PAR and zinc was 5.5 (Fig. 5). At pH 7.0, higher response with 10.0 mg l^{-1} Zn(II) was observed, but extensive leaching occurred after the first utilization of the sensor, leading to large loss of sensitivity and reduction of the sensor's lifetime. Moreover, much more intense absorption was registered due to formation of PAR–Cu(II) complex.

Regeneration of the sensor was accomplished with KSCN, which forms complexes with metals in acidic medium [8]. Short regeneration times with stable base line and no deterioration of the sensor's lifetime were obtained using a

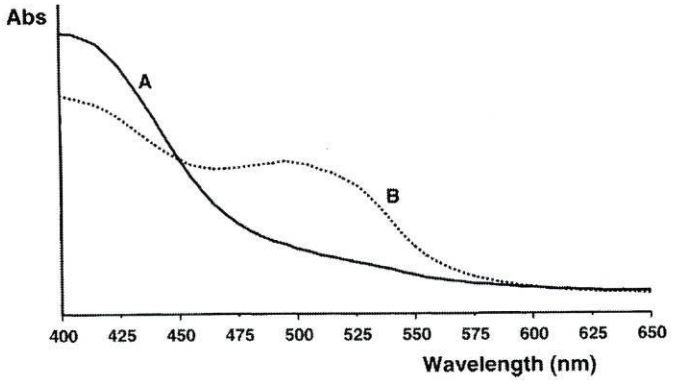


Fig. 4. Absorbance spectra of (A) PAR in sensor F4 and (B) PAR–Zn(II) complex in sensor F4 at pH 5.5.

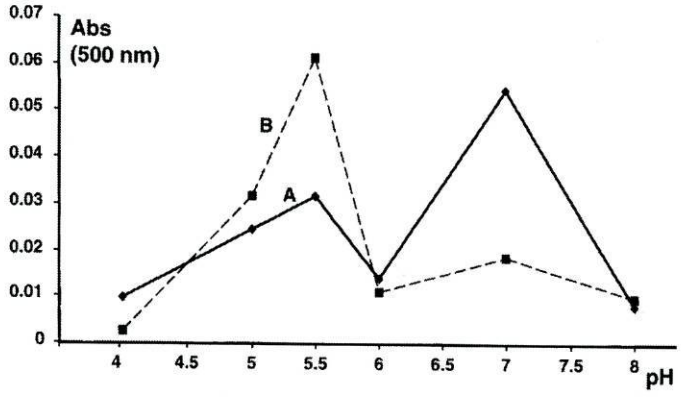


Fig. 5. Study of the optimum pH for complex between PAR and Zn(II) at two different concentrations: (A) 10.0 mg l^{-1} and (B) 100.0 mg l^{-1} Zn(II).

concentration of 1.0 mol l^{-1} in KSCN with pH adjusted to 3.0 by addition of HCl to the solution.

Hence, sensors F4, based on co-polymerisation of TEOS with 3-APTES, basic catalysis, water:alkoxyde ratio (R) of 4 and PAR concentration of 1.0 mg ml^{-1}, were found to be the most suitable to be used as Zn(II) sensors in the proposed working conditions and were adopted for further studies in flow conditions and for real samples analysis.

3.2. Optimization of the flow manifold

In order to study the developed sensors in flow conditions, two slides of sensor F4 were placed inside a home-made flow-cell (Fig. 1A) and coupled to a multicommutated flow system (Fig. 1B). Calibration curves were enabled after alternate activation of valves V_1 and V_2 during 2 s each, thus allowing, respectively, the injection of zinc calibrating standards and buffer solution (pH 5.5). Prior to detection both solutions were mixed in the coil L both by convective transport and by molecular diffusion. By fixing the flow rate at 0.8 ml min^{-1}, it was observed that it was necessary to apply at least 25 ON/OFF cycles to each valve in order to assure maximum intensity signals. These corresponded to the differences between the absorbance of the PAR–Zn(II) complex monitored at its maximum absorbance wavelength, 500 nm, and the apparent absorption observed at a reference wavelength of 650 nm, due only to Schlieren noise [37]. Between measurements, the sensor was regenerated by flowing through the system 0.1 mol l^{-1} KSCN solution when V_3 solenoid valve was activated. By assaying increasing time periods of valve activation it was concluded that for a 100 s period a complete regeneration of the sensor was accomplished. This time was much shorter than the corresponding period for other PAR-based sensors reported in the literature [18].

Typical analytical profile of the sensor's response to Zn(II) in the proposed working conditions is presented in Fig. 6 and it shows that a linear response is obtained for concentrations of Zn(II) between 5.0 and 25.0 μg l^{-1}. The general regression equation $\{A = 0.001\ (\pm 1 \times 10^{-5}) \times [\mathrm{Zn(II)}] + 0.0005\ (\pm 2 \times 10^{-4})\}$ was obtained for five successive injections of five calibrating solutions, with a correlation coefficient of

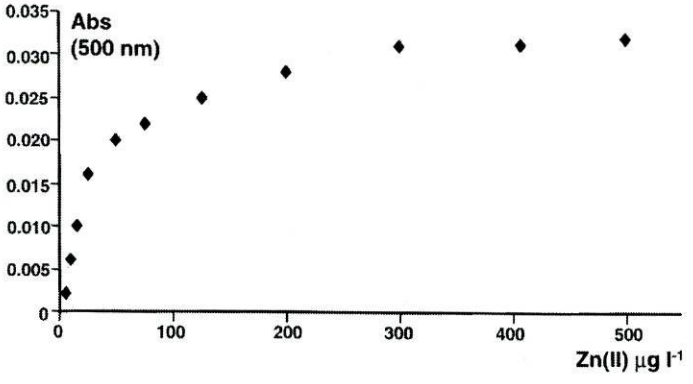


Fig. 6. Typical response profile of the sensor F4, coupled to the proposed flow system, towards different concentrations of Zn(II).

Table 3
Determination of zinc in injections of insulin

Sample	Labeled Zn(II) amount (μg/ml)	Zn(II) found (μg/ml)	
		Proposed method	Standard AAS method
Humulin Ultralenta®	150	146.0 ± 1.9	145.5 ± 4.2
Humulin Lenta®	150	148.9 ± 1.9	149.2 ± 0.7
Ultratard®	149	143.1 ± 1.9	144.9 ± 0.6
Monotard®	149	143.1 ± 1.9	143.9 ± 3.2

0.9998. The apparent molar absorptivity was estimated as $3.4 \times 10^8 \mathrm{l\,mol^{-1}\,cm^{-1}}$, which is considerably higher than the one reported for the reaction in bulk solution [16] and for optrode schemes based on the immobilization of PAR in other polymeric supports [5]. This improvement in sensitivity was due to the extent of PAR amount that was possible to immobilize in a very short path length. The detection limit of $2.0\,\mu\mathrm{g\,l^{-1}}$ was calculated from the standard deviation of the signals obtained by injection of a blank without analyte (3σ) [38]. A maximum sampling frequency of 16 samples $\mathrm{h^{-1}}$ was achieved.

The useful lifetime of the sensor was estimated by consecutive injections of a solution containing $15.0\,\mu\mathrm{g\,l^{-1}}$ Zn(II). After 120 determinations, the sensitivity of the sensor showed a reduction of 10%, and of 20% after 170 determinations. The long-term stability of the sensors was evaluated by testing them in flow conditions periodically. After 1 year of preparation, the films, stored at room temperature, maintained their analytical performance, which may be due to the stabilizing effect of 3-APTES.

Potential interference of Mg(II), Cd(II), Ca(II), Ni(II), Fe(II), Fe(III), Cu(II), Co(II) and Pb(II) was studied for the determination of $10.0\,\mu\mathrm{g\,l^{-1}}$ Zn(II) using a ratio foreign ion:Zn(II) of 10:1 (w/w). As expected, since PAR is a non-selective dye used for the analysis of several metals, some degree of interference was observed for these ions which resulted in the increase of the analytical signal registered, except for Fe(III) (+3.7%), Ni(II) (+7.4%) and Cd(II) (−3.7%). The most significant interference (above 25%) was from Pb(II), Fe(II) and Cu(II). However, these results did not impair the analytical application intended for these sensors in the proposed work (analysis of zinc in injectable insulins) and no masking procedures were necessary.

3.3. Analytical application

The described system was applied to the determination of zinc in injections of insulin available in the Portuguese market (Humulin Ultralenta®, Humulin Lenta®, Ultratard® and Monotard®). The results obtained for the samples examined (Table 3) with five replicate injections are in good agreement with the labeled information provided by the manufacturer and with the results obtained by AAS standard method, presenting deviation errors of results better than 1.2%.

4. Conclusions

The immobilization of PAR using a base-catalyzed sol–gel process in the presence of amino-groups proved to be advantageous over the acid-catalyzed method, providing a Zn(II) optical sensor with very high sensitivity, as well as good leaching characteristics and fast response. In addition, its insertion in a continuous flow system enabled very low detection limit, reagent economy, manifold simplicity and no need of complicated procedures before determination of the analyte. More, the results obtained in the interfering ions study evidence the possible application of these sensors to the multi-determination of metals applied to environmental analysis.

Acknowledgements

One of us (P.C.A.J.) thanks FCT and FSE (III QCA) for a Ph.D. grant (SFRH/BD/2876/2000).

References

[1] I. Oehme, O.S. Wolfbeis, Optical sensors for determination of heavy metal ions, Mikrochim. Acta 126 (1997) 177–192.
[2] W.A. DeOliveira, R. Narayanaswamy, A flow-cell optosensor for lead based on immobilised dithizone, Talanta 39 (1992) 1499–1503.
[3] I. Klimant, M. Otto, A fibre optical sensor for heavy metal ions based on immobilised xylenol orange, Mikrochim. Acta 108 (1992) 11–17.
[4] R. Czolk, J. Reichert, H.J. Ache, An optical sensor for the detection of heavy metal ions, Sens. Actuators B 7 (1992) 540–543.
[5] N. Maleik, O. Oktar, M.E. Ozser, P. Caglar, L. Bushby, A. Vaughan, B. Kuswandi, R. Narayanaswamy, Immobilised reagents for optical heavy metal ions sensing, Sens. Actuators B 53 (1998) 211–221.
[6] J.E. Madden, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, L.W. Deady, Nafion-based optode for the detection of metal ions in flow-analysis, Anal. Chim. Acta 319 (1996) 129–134.
[7] M.I. Albero, J.A. Ortuño, M.S. García, C. Sánchez-Pedreño, R. Expósito, Determination of zinc (II) in pharmaceuticals based on a flow-through bulk optode, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 779–786.
[8] Z. Marczenko, Separation and Spectrophotometric Determination of Elements, Ellis Horwood, Wiley, New York, 1986.
[9] E.B. Sandell, H. Onishi, Photometric Determination of Traces of Metals: General Aspects, fourth ed., Interscience, New York, 1978.
[10] F.H. Pollard, P. Hanson, W.J. Geary, 4-(2-Pyridylazo)-resorcinol as a possible analytical reagent for the colorimetric estimation of cobalt, lead and uranium, Anal. Chim. Acta 20 (1959) 26–31.

[11] T. Iwamoto, Acid–base property and metal chelate formation of 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, Bull. Chem. Soc. Jpn. 34 (1960) 605–610.
[12] W.J. Geary, G. Nickless, F.H. Pollard, The metal complexes of some azo and azomethine dyestuffs. Part I. Spectra in water, and in dioxan/water in the wavelength range 320–600 mμ, Anal. Chim. Acta 26 (1962) 575–582.
[13] W.J. Geary, G. Nickless, F.H. Pollard, The metal complexes of some azo and azomethine dyestuffs. Part II. Determination of stability constants, and preparation of solid complexes, Anal. Chim. Acta 27 (1962) 71–79.
[14] A. Corsini, I.M. Yih, Q. Fernando, H. Freiser, Potentiometric investigation of the metal complexes of 1-(2-pyridylazo)-2-naphtol and 4-(2-pyridylazo)-resorcinol, Anal. Chem. 34 (1962) 1090–1093.
[15] M.F. Molina, J.M. Bosque-Sendra, M. Nechar, R. El Bergmi, Complexes of Zn(II) and Cd(II) with 4-(2-pyridylazo)resorcinol sorbed on sephadex QAE: characterization and theoretical study, Anal. Chim. Acta 398 (1999) 281–290.
[16] M. Tanaka, S. Funahashi, K. Shirai, Chemical analysis of mixtures of some heavy metals by means of differential reaction rates of ligand substitution reactions, Anal. Chim. Acta 39 (1967) 437–445.
[17] G. Ackermann, J. Köthe, Vergleichende untersuchung an reagentien zur spektralphotometrischen bestimmung von zink, Talanta 26 (1979) 693–703.
[18] N.A. Yusof, M. Ahmad, A flow cell optosensor for determination of Co(II) based on immobilised 2-(4-pyridylazo)resorcinol in chitosan membrane by using stopped flow, flow injection analysis, Sens. Actuators B 86 (2002) 127–133.
[19] C.J. Brinker, G.W. Scherer, Sol–Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol–Gel Processing, Academic Press, New York, 1990.
[20] L.L. Hench, J.K. West, The sol–gel process, Chem. Rev. 90 (1990) 33–72.
[21] B.D. MacCraith, C.M. McDonagh, G. O'Keefe, A.K. McEvoy, T. Butler, F.R. Sheridan, Sol–gel coatings for optical chemical sensors and biosensors, Sens. Actuators B 29 (1995) 51–57.
[22] J. Lin, C.W. Brown, Sol–gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 200–211.
[23] M.M. Collinson, Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials, Trends Anal. Chem. 21 (2000) 30–38.
[24] M.M. Collinson, Sol–gel strategies for the preparation of selective materials for chemical analysis, Crit. Rev. Anal. Chem. 29 (1999) 289–311.
[25] M.A. Villegas, L. Pascual, Chemical and optical properties of dye-doped sol–gel films, J. Mater. Sci. 35 (2000) 4615–4619.
[26] Martindale, The Complete Drug Reference, 32nd ed., Pharmaceutical Press, 1999.
[27] M. Varcárcel, M.D. Luque de Castro, Flow-through (bio)chemical sensors. Plenary lecture, Analyst 118 (1993) 593–600.
[28] L.R. Allain, K. Sorasaenee, Z. Xue, Doped thin-film sensors via a sol–gel process for high-acidity determination, Anal. Chem. 69 (1997) 3076–3080.
[29] M.A. Fardad, Catalysts and the structure of SiO_2 sol–gel films, J. Mater. Sci. 35 (2000) 1835–1841.
[30] P. Innocenzi, M.O. Abdirashid, M. Guglielmi, Structure and properties of sol–gel coatings from methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane, J. Sol–Gel Sci. Technol. 3 (1994) 47–55.
[31] G.E. Baldini, K.T.V. Grattan, A.C.C. Tseung, Impregnation of a pH-sensitive dye into sol–gels for fibre optic chemical sensors, Analyst 120 (1995) 1025–1028.
[32] H. Wei, M.M. Collinson, Functional-group effects on the ion-exchange properties of organically modified silicates, Anal. Chim. Acta 397 (1999) 113–121.
[33] D.A. Nivens, Y. Zhang, S. Michael-Angel, A fiber-optic pH sensor prepared using a base-catalysed organo-silica sol–gel, Anal. Chim. Acta 376 (1998) 235–245.
[34] M.A. Fardad, E.M. Yeatman, E.J.C. Dawnay, M. Green, F. Horowitz, Effects of H_2O on structure of acid-catalysed SiO_2 sol–gel films, J. Non-Cryst. Solids 183 (1995) 260–267.
[35] T.M. Butler, B.D. MacCraith, C. McDonagh, Leaching in sol–gel-derived silica films for optical pH sensing, J. Non-Cryst. Solids 224 (1998) 249–258.
[36] M. Klotz, A. Ayral, C. Guizard, L. Cot, Tailoring the porosity in sol–gel derived silica thin-layers, Bull. Korean Chem. Soc. 20 (1999) 879–884.
[37] E.A.G. Zagatto, M.A.Z. Arruda, A.O. Jacintho, I.L. Mattos, Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry, Anal. Chim. Acta 234 (1990) 153–169.
[38] J.N. Miller, J.C. Miller, Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, fourth ed., Prentice Hall, New York, 2000, pp. 120–123.

Biographies

Paula C.A. Jerónimo received her diploma in Pharmaceutical Sciences from the University of Porto, Portugal, Faculty of Pharmacy, in 2000. Currently, she is a PhD student in the Department of Physical–Chemistry of the Faculty of Pharmacy (UP). Her work is related to the development of optical chemical sensors and biosensors based on the sol–gel technology and their application to pharmaceutical and environmental analysis coupled to automated flow systems.

Alberto N. Araújo is currently an associated professor at the Department of Physical Chemistry of the Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal. He obtained his PhD in pharmaceutical chemistry in 1994 at University of Porto, Faculty of Pharmacy, and he has been a lecturer in Instrumental Methods of Analysis at this school since 1991. His present research interests are on automation and development of sensors.

M. Conceição B.S.M. Montenegro is a senior lecturer in the Department of Physical–Chemistry of the Faculty of Pharmacy at University of Porto (Portugal). She received her PhD in Pharmaceutical Chemistry in 1991 (Faculty of Pharmacy, UP). Previously, she was a lecturer in Applied Physics and Physical Chemistry at the same school. Her research interests are related to several aspects of automation and industrial or laboratorial control using flow analysis techniques coupled to potentiometric detection. She has worked as well with other analytical techniques, like ionic and liquid chromatography, applied to wine and water analysis. She also maintains research activities devoted to the development of new electrochemical and optical sensors coupled to flow analysis.

Capítulo V

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ÓPTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES CATIÓNICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

5.1

DETERMINAÇÃO DIRECTA DE COBRE NA URINA UTILIZANDO UM SENSOR ÓPTICO ASSOCIADO A UM SISTEMA DE FLUXO MULTICOMUTADO

Direct determination of copper in urine using a sol-gel optical sensor coupled to a multicommutated flow system

Analytical and Bioanalytical Chemistry 380 (2004) 108-114

Neste trabalho é proposto um sistema de fluxo multicomutado integrando um sensor óptico de matriz sol-gel, para determinação espectrofotométrica directa de cobre na urina.

O sensor óptico foi desenvolvido por imobilização física de 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) em filmes finos sol-gel, preparados por um processo catalisado por uma base. O PAR imobilizado formava um complexo vermelho 2:1 com Cu(II), com máximo de absorvância a 500 nm. A transdução óptica baseou-se num LED bicolor (verde/vermelho) e num fotodiodo como detector. O sensor revelou resposta óptima e boa selectividade a pH 7.0, e a sua regeneração foi efectuada com ácido picolínico. Obteve-se resposta linear para concentrações de Cu(II) compreendidas entre 5.0 e 80.0 $\mu g\ l^{-1}$, com limite de detecção de 3.0 $\mu g\ l^{-1}$ e frequência de amostragem de 14 amostras por hora. A possível interferência de outros iões foi avaliada numa razão 10:1 (m/m) de ião interferente:Cu(II). Os resultados obtidos na análise de amostras de urina estão de acordo com os obtidos por ICP-MS, não se verificando diferenças significativas para um nível de confiança de 95%.

Anal Bioanal Chem (2004) 380: 108 114
DOI 10.1007/s00216-004-2718-7

ORIGINAL PAPER

Paula C. A. Jerónimo · Alberto N. Araújo
M. Conceição B. S. M. Montenegro · Celio Pasquini
Ivo M. Raimundo Jr

Direct determination of copper in urine using a sol–gel optical sensor coupled to a multicommutated flow system

Received: 1 April 2004 / Revised: 4 June 2004 / Accepted: 7 June 2004 / Published online: 15 July 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract In this work, a multicommutated flow system incorporating a sol gel optical sensor is proposed for direct spectrophotometric determination of Cu(II) in urine. The optical sensor was developed by physical entrapment of 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) in sol gel thin films by means of a base-catalysed process. The immobilised PAR formed a red 2:1 complex with Cu(II) with maximum absorbance at 500 nm. Optical transduction was based on a dual-colour light-emitting diode (LED) (green/red) light source and a photodiode detector. The sensor had optimum response and good selectivity towards Cu(II) at pH 7.0 and its regeneration was accomplished with picolinic acid. Linear response was obtained for Cu(II) concentrations between 5.0 and 80.0 μg L^{-1}, with a detection limit of 3.0 μg L^{-1} and sampling frequency of 14 samples h^{-1}. Interference from foreign ions was studied at a 10:1 (*w*/*w*) ion:Cu(II) ratio. Results obtained from analysis of urine samples were in very good agreement with those obtained by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS); there was no significant differences at a confidence level of 95%.

Keywords Cu(II) optical sensor · Sol gel · 4-(2-Pyridylazo)resorcinol · Multicommutation · Urinary copper

P. C. A. Jerónimo · A. N. Araújo (✉)
M. C. B. S. M. Montenegro
REQUIMTE/Departamento de Química-Física,
Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto,
R. Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal
E-mail: anaraujo@ff.up.pt
Tel.: +351-2-22078940
Fax: +351-2-22004427

C. Pasquini · I. M. Raimundo Jr
Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP), Cx. Postal 6154, CEP 13084-971
Campinas, SP, Brazil

Introduction

Copper is an essential trace element for the catalytic activity of many enzymes involved in biological processes. It is required for haemoglobin synthesis and is a constituent of several metalloenzymes with oxidase activity. Under normal conditions the urinary excretion of copper is very low, usually less than 40 μg day^{-1} [1, 2]. However, this value is increased in several pathologies related to abnormalities in copper metabolism. The most important is Wilson's disease, or hepatolenticular degeneration, that results in excessive accumulation of copper in the liver, brain, cornea and kidneys. There is also an increased urinary output of copper, up to 500 1,000 μg day^{-1} [2]. Hence, the determination of copper in urine is of particular interest in clinical chemistry for purposes of diagnosis, for monitoring Wilson's patients under chelation therapy, for detection of environmental or occupational exposure, and for nutritional studies.

Determination of copper in urine is usually performed by relatively expensive techniques, such as graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) [3 6], atomic absorption spectrometry (AAS) [7 9] and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS) [10 12]. There are some colorimetric methods for measurement of urine copper levels [13 15], but they are time-consuming and usually require previous ashing and/or chelation followed by extraction.

Several optodes have been described for sensing of Cu(II) ions; these are based on indicators such as zincon [16], PAN [17, 18], 1,2-cyclohexanedione thiosemicarbazone [19], DPAN [20], lucifer yellow [21], pyrocatechol violet [22], and cupron [23]. All suffer from long response times and high detection limits. Some have been applied to the analysis of waters or alloys [17 20], but most lack analytical application.

PAR (4-(2-pyridylazo)resorcinol) is a non-selective azo dye widely used as a colorimetric reagent for metal ions because it forms very stable water-soluble chelates with most transition metals. At pH values above 5.0,

PAR forms a 2:1 complex with Cu(II) with molar absorptivity of 5.89×10^4 L mol^{-1} cm^{-1} [24, 25]. PAR, immobilised in polymeric materials such as Dowex [26, 27], poly(ethylenimine) [28], and XAD-4 and XAD-7 [27], has been used for the determination of Cu(II) ions.

Sol–gel glass [29, 30] is a good host matrix for development of viable chemical sensors, as it provides a physically and chemically stable environment with excellent optical transparency and can be cast in different shapes and sizes, including fibres, monoliths and thin films [31, 32]. By use of the sol–gel process inorganic networks can be obtained in a simple and versatile way, by hydrolysis and condensation of silicon alkoxides at room temperature. Sensing agents can be readily entrapped in the porous glass matrix during the steps of the process, preserving their selectivity and activity.

In this work, PAR was immobilised in sol–gel thin films to obtain a Cu(II) optical sensor. The proposed sensor was then coupled to a continuous flow system to accomplish the direct determination of urinary copper, in order to achieve simpler, cleaner, and biohazard-protected handling of samples.

Experimental

Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade and used without further purification, unless stated otherwise. Milli-Q (Millipore) deionised water, with resistivity above 18 MΩ cm^{-1}, was used to prepare all solutions.

Tetraethoxysilane (TEOS; product no. 86578), 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR; product no. 82970), and nitric acid (product no. 84385) were purchased from Fluka. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES, product no. A-3648) and picolinic acid (product no. P-5503) were purchased from Sigma. Tetramethylammonium hydroxide, 25 wt% solution in water, (TMAOH; Aldrich, product no. 33,163-5) and ethanol (Merck, product no. 1.00983) were also used. Working Cu(II) solutions were obtained by adequate dilution of a 1,000-mg L^{-1} SpectrosoL (BDH, product no. 141394P) standard stock solution. Buffer solutions with pH values ranging from 3.0 to 10.0 were prepared as recommended [33] with analytical grade reagents from Merck.

Instrumentation

Visible spectra for characterization of the sensors were acquired with a Hewlett–Packard (Palo Alto, CA, USA) model 8452A diode-array spectrophotometer. Surface area, total volume of pores, and average pore volume were measured with a Micromeritics ASAP 2000 apparatus (Mönchengladbach, Germany) by N_2 adsorption/desorption analysis. The homogeneity of the sensing membranes and their microstructure were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) using a Jeol (Peabody, MA, USA) JSM-6360 microscope and atomic force microscopy (AFM) with a TopoMetrix (Santa Clara, CA, USA) Discover TMX2010 AF microscope.

The sensing membranes were placed in a flow-cell (Fig. 1) constructed specifically for this purpose with two perspex blocks and a silicone rubber spacer. The flow manifold used for the determination of Cu(II) is shown in Fig. 2. It was built with three NResearch (Stow, A, USA) 161 T031 three-way solenoid valves and a Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls 3 peristaltic pump equipped with isoversinic pumping tube of the same brand. Flow lines and mixing coil were made of 0.8 mm i.d. PTFE tubing. Homemade connectors and confluence points were also used. For optical transduction two light emitting diodes (LED), green (500 nm) and red (650 nm), from RS Components (Northants, UK), were employed as light sources connected to plastic optical fibres (ref. FOP1-ST), a silicon photodiode detector (ref. VISD), and a photodetector amplifier (ref. PDA1) from WPI (World Precision Instruments, FL, USA). Control of the photometer and commutation devices and data acquisition, were accomplished with VisiDAQ 3.1 Standard software, using a microcomputer equipped with a PCL-818 L Advantech interface card.

Inductively coupled plasma mass spectrometry determinations were made with a PlasmaQuad 3 ICP mass spectrometer from VG Elemental (Cheshire, UK).

Preparation of the sensor

The Cu(II) sensor was obtained by entrapment of 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR) in thin films prepared by

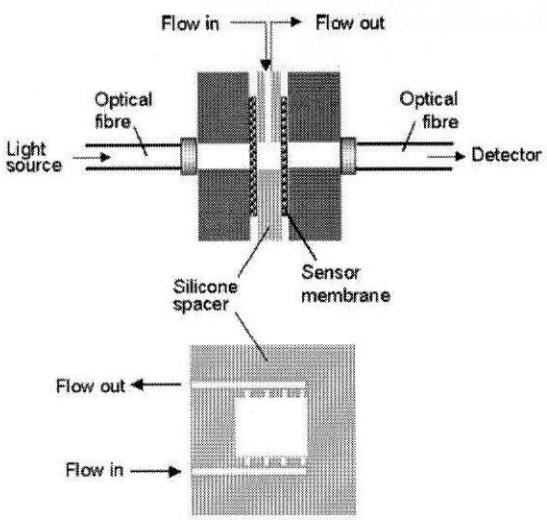


Fig. 1 Schematic diagram of the flow cell, cross-sectional view, and the silicone spacer (3 mm thick), front view

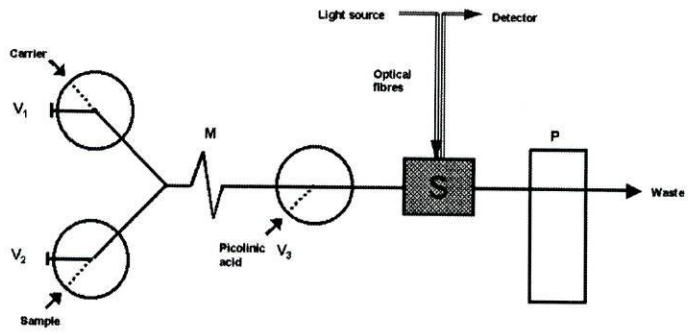


Fig. 2 Diagram of the flow manifold. V_1, V_2 and V_3 are three-way solenoid valves; the *dotted line* corresponds to the activated position and the *continuous line* to the "off" position. *M* mixing coil, 25 cm long; *S* sensor membrane; *P* peristaltic pump

the sol–gel method. Glass slides (18×18 mm) were used as substrates for film deposition. Prior to coating the substrates were treated with concentrated nitric acid and ethanol, thoroughly rinsed with deionised water, and dried at 100 °C, in order to activate the silanol groups on the surface of the glass.

To prepare the sol solution 3.0 mL TEOS, 1.0 mL APTES, 16.0 mL ethanolic PAR solution, and 2.2 mL TMAOH were mixed and mechanically stirred in a PTFE beaker for 4 h at room temperature. The molar ratio Si:H_2O:ethanol was 1:4:12 and the final PAR concentration in the sol was 1.0 g L^{-1}. Thin films were obtained by spin-coating 100.0 μL sol on the glass substrates at 3,000 rpm for 15 s, which were then allowed to gel and age at room temperature for at least 5 days before use.

Procedures

The optical response of the sensor was studied by means of absorption spectra recorded in the wavelength range 400–700 nm after its immersion in 4.0 mg L^{-1} copper solutions at different pH, from 3.0 to 10.0. Surface area and porosity of the membranes were estimated by recording the N_2 adsorption/desorption isotherms at 77 K on the full range of relative pressure P/P_0. Total volume of pores and surface area were calculated directly, based on the mass of adsorbent after adsorption vs. pressure. Average pore size was calculated as 4×volume/surface area from the BET equation. SEM and AFM were used to evaluate morphology and microstructure of the porous thin films. The extent of leaching was evaluated by recording the absorbance of the sensor at the wavelength 410 nm, immersed in pH 7.0 K_2HPO_4/NaOH buffer solution (selected carrier solution), in 2-min intervals.

Two sensing layers were placed in a flow cell that was constructed in-house, as depicted in Fig. 1, and coupled to a flow set-up assembled according to Fig. 2. Three-way solenoid valves V1, V2, and V3 were responsible for access of carrier, sample and regenerating solutions, respectively, according to a programmed activation cycle. First, valves V1 and V2 were simultaneously activated for 25 cycles, ON/OFF and OFF/ON, respectively, lasting 4 s each, allowing the alternate insertion of small plugs of sample and carrier solution, which after mixing in a 25-cm long coil (M), flowed through the flow cell containing the sensor. By selecting different ON/OFF time ratios, solutions of different concentrations were produced, and so calibrations were performed automatically using the Cu(II) standard stock solution. When the complexation reaction was complete, regenerating solution was inserted in the flow cell by continuous activation of valve V3 for 100 s. After establishment of the baseline (corresponding to the absorbance of the immobilised PAR alone), valve V1 was activated for 50 s, inserting carrier solution into the system for washing purposes. Flow rate was fixed at 0.5 mL min^{-1}. The concentration of the pH 7.0 buffer solution was optimised in order to obtain maximum sensitivity. NH_3, EDTA, thiocyanate, citrate, tartrate, oxalate, thiourea, HCl, and picolinic acid, at concentrations between 0.01 and 1.0 mol L^{-1}, were investigated as potential regeneration agents for the sensors.

Absorbance of the complex was monitored using a combination of two LEDs (green/red) and a photodiode detector, resorting to a dual wavelength strategy. Successive measurements were performed at the absorption maximum (500 nm, green LED) and at a reference wavelength (650 nm, red LED). The difference between these two absorbencies constituted the analytical signal.

Results and discussion

Characteristics of the sensor

In the sol–gel process optically transparent silicate gels are synthesised by hydrolysis and condensation of monomeric alkoxide precursors, employing a mineral acid or a base as catalyst [29, 30].

In this work TEOS was co-polymerised with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) by a base-catalysed process. APTES is one of the most frequent organosilane agents used for development of sensors. It enables efficient bonding between organic indicators and

inorganic substrates, improving the uptake of the immobilised dye into the sol–gel network [34]. It also results in more stable structures and eases diffusion of the analytes into the films [35].

Whereas use of acid catalysts lead to protonation of the amino-group and immediate precipitation of APTES, resulting in muddy double-phased gels, not suitable for optical applications, the basic catalyst TMAOH enables relatively large amounts of APTES to be completely incorporated in the gel network and reduces the long gelation times usually associated with this organosilane, rendering clear single-phased homogeneous gels [36]. Basic medium also has a positive effect on the complexation mechanism of PAR, preventing ionisation of the *p*-hydroxyl group in the PAR molecule, which occurs in acidic medium [37].

The water:alkoxide ratio (R) has a very important effect on the porosity characteristics of sol–gel thin films. An increase in R leads to a decrease in thickness, shrinkage, and pore volume [29, 38]. Thus, R was adjusted to 4 to ensure formation of thin films and to balance the high porosity typical of base-catalysed structures, minimising leaching problems.

The coloured coatings obtained by the previously described procedure had good optical transparency and were crack-free. Morphologies observed by SEM (Fig. 3) and AFM techniques show a network of spherical particles packed together, suggesting that the polymerisation process starts with formation of colloidal silica globules followed by their aggregation. This is in agreement with a literature report that base-catalysed hydrolysis tends to produce highly condensed particulate sols [29]. The values of 1.3299 $m^2 g^{-1}$ for surface area, 0.02224 $cm^3 g^{-1}$ for total volume of pores, and 51.21 nm for the average pore diameter, obtained by nitrogen sorption porosimetry, indicate mesoporosity of the films.

Absorbance spectra recorded for the films (Fig. 4) show that the formation of a complex between PAR and Cu(II) causes a decrease of absorbance at 410 nm (maximum for PAR), and the appearance of a new peak at 500 nm. It can also be seen that the optimum pH for complex formation is 7.0, for which higher response towards Cu(II) is obtained. The films exhibited show leaching when immersed in pH 7.0 buffer solution (Fig. 5), as expected from the porosity results.

Flow system procedures

In the proposed system (Fig. 2), sample and carrier were added by a binary sampling process, implemented by time-based selection of sample and carrier aliquots. This strategy reduced the manipulation of solutions, minimising errors, because calibrations were made using a single Cu(II) standard solution that was diluted on-line with buffer solution by alternate activation of valves V1 and V2. The flow-rate was set at 0.5 mL min^{-1} in order to obtain the highest response with low leaching, maximizing the lifetime of the sensor. Under these conditions, 25 on/off cycles of valves V1 and V2, lasting 4 s each, were necessary to obtain maximum signal. For regeneration of the sensor, increasing activation times of valve V3, responsible for insertion of regenerating solution, were tested. Complete regeneration and stable baseline were attained after a 100-s period of activation. The washing step after regeneration was found necessary to remove all remaining regeneration solution and re-establish the optimum pH for complex formation. Without this step, the response time of the sensor be-

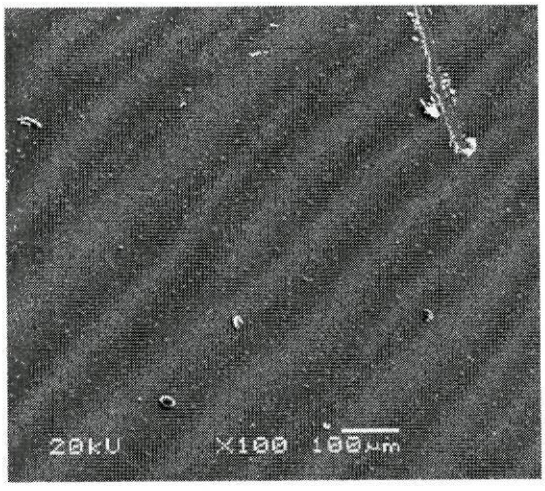


Fig. 3 Scanning electron microscopy photograph of the sol–gel thin film

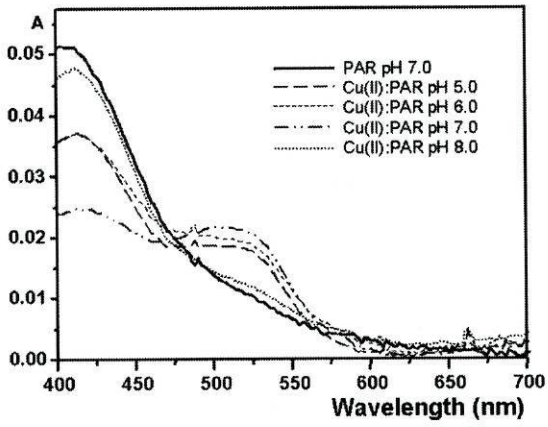


Fig. 4 Absorbance spectra of immobilised PAR at pH 7.0, and of the complex between immobilised PAR and Cu(II) at pH 5.0, 6.0, 7.0, and 8.0

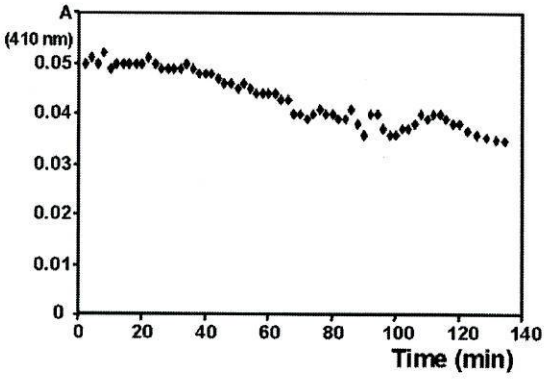


Fig. 5 Leaching profile of the sensor. Absorbance of the film immersed in pH 7.0 solution was measured at 410 nm at 2-min intervals

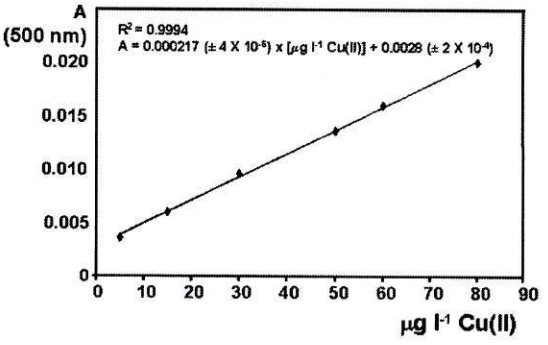


Fig. 6 Range of Cu(II) concentrations which produced a linear response, with five successive insertions of six calibration solutions

came very long (more than 3 min) due to the formation of pH gradients.

In order to be successfully applied in a flow system, the sensor should be rapidly and fully reversible. Several Cu(II) complexing reagents were investigated for regeneration of the sensor. Incomplete and slow regeneration, with increasing baseline drift, was observed for HCl and thiourea, and EDTA resulted in severely increased leaching, impairing the analytical signal. Other Cu(II) complexing agents, namely NH_3, thiocyanate, citrate, tartrate and oxalate, were ineffective in regenerating the sensor; this can be attributed to the high stability of the Cu(II)–PAR complex. Picolinic acid enabled complete and rapid regeneration of the sensor and so was tested in increasing amounts from 0.01 to 0.5 mol L^{-1}. A concentration of 0.1 mol L^{-1} picolinic acid was sufficient to produce a stable baseline without damaging the sensor's useful lifetime or the response time, and so was selected as regenerating solution.

K_2HPO_4/NaOH buffer solution of pH 7.0 was selected as carrier. Because urine samples are currently acidified after collection, buffer capacity became very important in this determination. To ensure that samples reached the sensor at the optimum pH for complex formation, increasing concentrations of buffer solution, from 0.1 to 0.75 mol L^{-1}, were tested. A concentration of 0.5 mol L^{-1} was found optimum to ensure maximum sensitivity, and was adopted for Cu(II) determination in the flow system.

The absorbance of the PAR–Cu(II) complex was monitored at its maximum absorbance wavelength (500 nm) and at a reference wavelength, 650 nm, at which absorbance by the PAR–Cu(II) complex and by the immobilised PAR alone were negligible (Fig. 4). However, since similar Schlieren noise [39] was observed at both wavelengths, the difference between both absorbencies minimised this physical interference.

Analytical features of the method

Under the working conditions described, linear response was obtained for Cu(II) concentrations between 5.0 and 80.0 μg L^{-1} (Fig. 6). For ten replicate measurements of a 50-μg L^{-1} Cu(II) solution, the relative standard deviation was ca. 2%. The detection limit was estimated to be 3.0 μg L^{-1}, calculated from the standard deviation of the signals obtained by injection of a blank solution (3σ).

The useful lifetime of the sensor was evaluated by successive injection of a 50-μg L^{-1} Cu(II) solution, and the results obtained (Fig. 7) illustrate its good stability. After 100 determinations the recorded signal showed a reduction of ca. 10%. The sensing films, stored at room temperature, were also examined over a period of several months, showing no degradation in analytical signal, response time, or sensitivity 1 year after preparation.

The proposed method can handle 14 samples h^{-1} and selectivity towards Cu(II) is good. Interference studies were carried out for determination of 50 μg L^{-1} Cu(II) using a 10:1 (*w*/*w*) foreign ion:Cu(II) ratio. The results obtained are summarised in Table 1. The interference

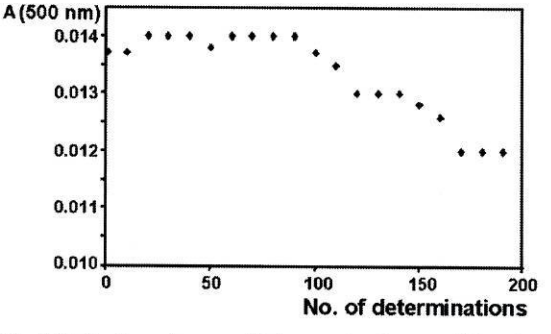


Fig. 7 Evaluation of sensor lifetime under flow conditions by successive injection of a 50 μg L^{-1} Cu(II) solution

Table 1 Effect of some potential interfering ions on the determination of 50 μg L^{-1} Cu(II). Foreign ions were added in a 10:1 (*w*/*w*) ion:Cu(II) ratio

Ion	Change in absorbance (%)
Ni(II)	[a]
Cd(II)	[a]
Mn(II)	−5
Co(II)	+5
Zn(II)	[a]
Ca(II)	−5
Mg(II)	[a]
Na(I)	[a]
K(I)	+5
Fe(II)	+11.7
Fe(III)	+16.7
Pb(II)	+21.7
Cl^-	[a]

[a]No variation was observed

from Fe(II) and Fe(III) is due to precipitation of their hydroxides at pH 7.0, and can be eliminated by washing the system with carrier solution before regeneration. In the application of the developed sensor to urine samples Mn(II) and Co(II) interferences are not usually observed, because they occur only at concentrations much higher than physiological levels [2]. The interference levels observed for Ca(II) and K(I) remained constant, even when their concentration was higher. Because they have opposite effects their total interference does not compromise the accuracy of the measurements. Among the ions investigated, Pb(II) caused the highest interference. However, because urinary levels of Pb(II) are usually below 50 μg L^{-1} [2], the expected interference is not significant.

Analytical application

The proposed system was applied to the determination of Cu(II) in urine. The urine samples were collected in acid washed polyethylene containers, acidified (0.4% *v*/*v* nitric acid), and kept in the refrigerator until analysis. For comparison purposes, samples were spiked with different amounts of cupric nitrate. To assess the accuracy of the procedure a lyophilised control sample of urine from Seronorm (Billingstad, Norway), reconstituted according to the manufacturer's instructions with Milli-Q water, was also analysed.

The results obtained are summarised in Table 2 and are in good agreement with the values provided by ICP MS—there is no statistical differences at a significance level of $p = 0.05$. Additionally, results obtained from analysis of the reference sample match the values obtained by the laboratory responsible for certification of the sample. Data relevant to evaluation of the accuracy are summarised in Table 3 and show that the proposed method can be regarded as accurate for urinary copper determination.

Table 2 Results (μg L^{-1}) obtained from determination of Cu(II) in urine samples

Sample	Proposed method[a]	ICP MS[b]	Relative error (%)
1	18.2±1.8	17.6±0.7	+3.4
2	13.4±1.2	14.4±0.5	−7.4
3	19.1±1.7	19.1±1.0	0.0
4	45.8±1.5	45.1±0.9	+1.3
5	42.1±1.5	45.2±0.1	−7.3
6	20.1±1.7	20.5±0.4	−2.0
7	55.0±1.4	54.8±0.1	+0.4
8	32.8±2.3	32.7±0.1	+0.3
9	44.8±2.1	44.8±0.9	0.0
10	46.5±2.1	46.7±0.1	−0.4
11	27.7±2.4	28.2±0.2	−1.8
12	62.0±2.0	60.5±2.7	+2.5
13	29.4±2.3	29.2±1.2	+0.7
14	24.4±2.6	24.2±0.1	+0.8
15	32.8±2.3	33.4±0.2	−1.8
16	26.8±2.4	26.9±1.1	−0.4
17	38.0±2.2	38.0±0.1	0.0
18	43.1±2.2	43.7±0.8	−1.4
19	39.7±2.2	41.1±0.6	−3.5
20	41.4±2.2	43.8±0.5	−5.8
21	65.4±2.0	65.8±1.2	−0.6
22	50.0±2.1	50.1±0.9	−0.2
23	62.0±2.0	62.5±1.9	−0.8
24[c]	15.5±1.8	15.4±0.4	+0.6

[a]Mean from five determinations
[b]Mean from two determinations
[c]Reference sample

Table 3 Evaluation of the accuracy of the proposed method for determination of urinary copper

Control sample	Certified Cu(II) value (μg L^{-1})	Obtained Cu(II) value (μg L^{-1})	Relative error (%)
Seronorm trace elements urine	16.1±1.4	15.5±1.8	−3.9
Determination of copper in urine by the proposed method vs. ICP MS			
Linear regression	Proposed method = 1.00 (±0.01)×[ICP MS] + 0.35 (±0.51) R^2 = 0.9980		
Student's *t*-test (95%)	*t* calculated = −1.6365; *t* critical = 2.068		

Conclusions

The procedure proposed in this work is a simple, sensitive, and low-cost means of determination of Cu(II) in a complex matrix, for example urine. Analysis was performed without the need for complicated sample pretreatment procedures. The immobilisation of PAR in sol gel thin films by means of a base-catalysed method provided a Cu(II) optical sensor with high sensitivity, selectivity, and stability, and low leaching and short response time. The flow system incorporating the optical

sensor is particularly simple and versatile and enables automatic dilution of samples, which makes this procedure convenient for the determination of higher levels of urinary copper and thus suitable for diagnosis purposes.

Acknowledgement Paula C.A. Jerónimo thanks FCT and FSE (III QCA) for financial support (Ph.D. Grant SFRH/BD/2876/2000).

References

1. Harris ED (2003) Crit Rev Clin Lab Sci 40:547 586
2. Alcock NW (1996) Trace elements. In: Kaplan LA, Pesce AJ (eds) Clinical chemistry theory, analysis and correlation, 3rd edn. Mosby, St. Louis
3. Halls DJ, Fell GS, Dunbar PM (1981) Clin Chim Acta 114:21 27
4. Dube P (1988) At Spectrosc 9:55 58
5. Lin TW, Huang SD (2001) Anal Chem 73:4319 4325
6. Lelis KLA, Magalhães CG, Rocha CA, Silva JBB (2002) Anal Bioanal Chem 374:1301 1305
7. Dawson JB, Ellis DJ, Newton-John H (1968) Clin Chim Acta 21:33 42
8. Spector H, Glusman S, Jatlow P, Seligson D (1971) Clin Chim Acta 31:5 11
9. Almeida AA, Jun X, Lima JLFC (2000) At Spectrosc 21:187 193
10. Szpunar J, Bettmer J, Robert M, Chassaigne H, Cammann K, Lobinski R, Donard OFX (1997) Talanta 44:1389 1396
11. Townsend AT, Miller KA, McLean S, Aldous S (1998) J Anal Atomic Spectr 13:1213 1219
12. Wang J, Hansen EH, Gammelgaard B (2001) Talanta 55:117 126
13. Wilson JF, Klassen WH (1966) Clin Chim Acta 13:766 774
14. Bauer JD (1982) Clinical laboratory methods. Mosby, St. Louis
15. Morales A, Valladares L (1989) Fresenius Z Anal Chem 55:53 55
16. Oehme I, Prattes S, Wolfbeis OS, Mohr GJ (1998) Talanta 47:595 604
17. Sanchez-Pedreno C, Ortuno JA, Albero MI, Garcia MS, de las Bayonas JCG (2000) Fresenius J Anal Chem 366:811 815
18. Coo L, Belmonte CJ (2002) Talanta 58:1063 1069
19. Colsa Herrera JM, Sanchez Rojas F, Bosch Ojeda C, García de Torres A, Cano Pavón JM (2000) Lab Robot Autom 12:241 245
20. Sands TJ, Cardwell TJ, Cattrall RW, Farrell JR, Iles PJ, Kolev SD (2002) Sens Actuators B 85:33 41
21. Mayr T, Klimant I, Wolfbeis OS, Werner T (2002) Anal Chim Acta 462:1 10
22. Steinberg IM, Lobnik A, Wolfbeis OS (2003) Sens Actuators B 90:230 235
23. Mahendra N, Gangaiya P, Sotheeswaran S, Narayanaswamy R (2003) Sens Actuators B 90:118 123
24. Sandell EB, Onishi H (1978) Photometric determination of traces of metals: general aspects, 4th edn. Interscience, New York
25. Geary WJ, Nickless G, Pollard FH (1962) Anal Chim Acta 27:71 79
26. Cordova MLF, Diaz AM, Reguera MIP, Vallvey LFC (1994) Fresenius J Anal Chem 349:722 727
27. Malçik M, Çaglar P, Narayanaswamy R (2000) Quimica Anal 19(Suppl 1):94 98
28. Araújo AN, Costa RCC, Alonso-Chamarro J (1999) Talanta 50:337 343
29. Brinker CJ, Scherer GW (1990) Sol-gel science: the physics and chemistry of sol gel processing. Academic, New York
30. Hench LL, West JK (1990) Chem Rev 90:33 72
31. MacCraith BD, McDonagh CM, O'Keeffe G, McEvoy AK, Butler T, Sheridan FR (1995) Sens Actuators B 29:51 57
32. Lin J, Brown CW (1997) Trends Anal Chem 16:200 211
33. Perrin DD, Dempsey B (1979) Buffers for pH and metal ion control. Chapman and Hall, London
34. Badini GE, Grattan KTV, Tseung ACC (1995) Analyst 120:1025 1028
35. Wei H, Collinson MM (1999) Anal Chim Acta 397:113 121
36. Nivens DA, Zhang Y, Michael-Angel S (1998) Anal Chim Acta 376:235 245
37. Geary WJ, Nickless G, Pollard FH (1962) Anal Chim Acta 26:575 582
38. Klotz M, Ayral A, Guizard C, Cot L (1999) Bull Korean Chem Soc 20:879 884
39. Zagatto EAG, Arruda MAS, Jacintho AO, Mattos IL (1990) Anal Chim Acta 234:153 160

Capítulo VI

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR ÓPTICO PARA APLICAÇÃO NA ANÁLISE FARMACÊUTICA

6.1

BIOSENSOR ÓPTICO ASSOCIADO A UM SISTEMA DE FLUXO MULTICOMUTADO PARA DETERMINAÇÃO DE ACETAZOLAMIDA EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Flow-through sol-gel optical biosensor for the colorimetric determination of acetazolamide

The Analyst 130 (2005) 1190-1197

Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de um biosensor óptico baseado na imobilização da enzima anidrase carbónica, e a sua aplicação à determinação de um agente anti-glaucoma, a acetazolamida, por medida da inibição enzimática. A enzima e um indicador de pH, vermelho de cresol, foram imobilizados fisicamente em filmes sol-gel sobrepostos, constituindo um sensor com duas camadas. A anidrase carbónica catalisa a desidratação de HCO_3^-, o que por seu turno provoca uma alteração do pH no microambiente do sensor; acompanhando a transição de cor do vermelho de cresol, a reacção enzimática, assim como a sua inibição pela acetazolamida, podem ser monitorizadas.

O sensor foi integrado numa célula de fluxo e acoplado a um sistema de fluxo contínuo, baseado nos conceitos de multicomutação e amostragem binária. As medidas foram efectuadas a pH 6.0 e no comprimento de onda de 570 nm. Obteve-se resposta linear para concentrações de acetazolamida compreendidas entre 1.0 a 10.0 mmol l^{-1}, com frequência de amostragem de 22 amostras por hora e limite de detecção de 0.2 mmol l^{-1}. Os resultados obtidos na análise de amostras reais estão em concordância com os obtidos através de um método de referência, não mostrando diferenças significativas para um nível de confiança de 95%.

PAPER www.rsc.org/analyst | The Analyst

Flow-through sol–gel optical biosensor for the colorimetric determination of acetazolamide

Paula C. A. Jerónimo,[a] Alberto N. Araújo,*[a] M. Conceição B. S. M. Montenegro,[a] Dalibor Satinský[b] and Petr Solich[b]

Received 30th March 2005, Accepted 31st May 2005
First published as an Advance Article on the web 29th June 2005
DOI: 10.1039/b504474j

An optical biosensor based on immobilised carbonic anhydrase and its application to the determination of the anti-glaucoma agent acetazolamide by enzyme inhibition measurements, is described. The enzyme and a pH indicator dye, cresol red, were physically immobilised in overlapped sol–gel thin films, in a dual-layer format. Carbonic anhydrase catalyses the dehydration of HCO_3^-, which in turn causes a change of pH in the microenvironment of the sensor. By following the colour transition of cresol red, the enzymatic reaction as well as its inhibition by acetazolamide can be monitored. The sensor was integrated in a flow cell and coupled to a continuous flow system operating on a multicommutation and binary sampling approach. Measurements were made at pH 6.0 at the wavelength of 570 nm. Linear response was obtained for acetazolamide concentrations between 1.0 and 10.0 mmol l^{-1}, with a sampling frequency of 22 samples h^{-1} and a detection limit of 0.2 mmol l^{-1}. The results obtained in the analysis of real samples were in good agreement with those obtained by a reference method, showing no significant differences at a confidence level of 95%.

1. Introduction

Carbonic anhydrase (CA, carbonate hydrolase, EC 4.2.1.1) is the basic enzyme in inhalation function. This well-characterized zinc-containing enzyme (MW 30 000) catalyses a reaction of fundamental physiological and biochemical significance. It promotes the interconversion of the gaseous, membrane-permeable substrate carbon dioxide and the ionic compound bicarbonate (eqn. (1)), with rate constants of 10^6 s^{-1} for CO_2 hydration and 6×10^5 s^{-1} for the dehydration of HCO_3^-, at 25 °C.[1,2]

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \quad (1)$$

The catalytic activity of CA is inhibited by most monovalent ions and sulfonamides possessing the general formula RSO_2NH_2, where R = aryl, hetaryl or perhaloalkyl.[2,4] Since HCO_3^- ion is responsible for the transport of Na^+ and water into the eye, CA inhibition by systemic sulfonamide drugs such as acetazolamide decreases HCO_3^- concentration, and consequently, intraocular pressure. Thus, acetazolamide and other carbonic anhydrase inhibitors are commonly employed as antiglaucoma agents.[5] Acetazolamide is also used, either alone or in association with other antiepileptics, for the treatment of various forms of epilepsy, and is the most frequently used drug for the prophylaxis of high-altitude disorders.[6] The determination of acetazolamide is usually carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC).[7] In this paper a new colorimetric method for its determination, based on a carbonic anhydrase optical biosensor, is proposed.

Development of biosensors involves the immobilization of a biocatalyst on solid supports with an adequate transduction system. Sol–gel materials are particularly attractive for this purpose, since they provide a porous matrix in which sensing enzymes are easily entrapped and into which smaller analytes may diffuse.[8–11] The production of sol–gel glasses involves the use of hydrolysis and condensation polymerisation reactions of an alkoxide precursor, at room temperature, to yield a SiO_2 porous network. The biological element is usually added to the mixture during the formation of the sol or gel. Sol–gel glasses can be produced with a wide variety of compositions and can be used to entrap a large number of different biomolecules, offering the possibility of tailoring the characteristics of the matrix as well as controlling protein behaviour. It is now well established that sol–gel immobilized proteins retain their native reactivity and chemical function, and are often significantly stabilized to chemical and thermal inactivation.[12] In this context, carbonic anhydrase has been encapsulated in sol–gel monoliths by Badjic *et al.*,[13] retaining its overall conformation and catalytic activity. However, slow diffusion of potential substrates and their interactions with the glass matrix limited the application of these doped monoliths. In the present work the enzyme was immobilized in sol–gel films in order to overcome these problems. In fact, thin film based materials require very small amounts of embedded functional molecules, exhibit faster response times and have great potential for miniaturization, besides allowing the possibility of preparing multilayer configurations. Sol–gel films obtained by dip- and spin-coating techniques have been reported for

[a]*REQUIMTE, Department of Physical-Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Porto, R. Aníbal Cunha 164, 4099-030 Porto, Portugal. E-mail: anaraujo@ff.up.pt; Fax: +351 222004427; Tel: +351 222078940*
[b]*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovskeho 1203, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic*

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2005

cytochrome c[14,15] and cd$_1$,[16] glucose oxidase[17] and urease.[18] A pH indicator, cresol red, was used as an optical transducer for the immobilized CA-catalysed reactions. Since the dehydration of bicarbonate at near-neutral pH is rapid and accompanied by the removal of protons, the monitoring of pH with a pH indicator is a versatile technique to follow the reaction, or its inhibition.[19] The developed sensor was coupled to a multicommutated flow system and applied to the determination of acetazolamide in pharmaceuticals.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

Analytical grade chemicals were used without further purification, unless stated otherwise. All solutions were prepared using Milli-Q (Millipore) de-ionised water that was boiled prior to use to remove the dissolved CO_2.

Tetramethoxysilane (TMOS; product No. 87680) and polyethyleneglycol 6000 (PEG; product No. 81253) were from Fluka. Carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (CA; product No. C3934) and *p*-nitrophenyl acetate (product No. N8130) were purchased from Sigma. Cresol red (product No. 105225), ethanol, acetonitrile, sodium hydroxide and chloridric acid were from Merck. Cresol red sodium salt from Aldrich (product No. 114480) was also used. Bicarbonate solutions were freshly prepared from $NaHCO_3$ (Merck, product No. 106329), degassed and used within 12 h. A stock solution of acetazolamide (Sigma, product No. A6011) was prepared daily by dissolving 2.22 g in 100.0 ml of NaOH 0.2 mol l^{-1}. Working solutions of acetazolamide were obtained by dilution of the previous one in water. Buffer solutions were prepared as recommended[20] with analytical grade reagents from Merck, except for 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES, product No. 69889) which was purchased from Fluka.

2.2. Instrumentation

The pH values of all solutions were determined with a GLP 22 pH meter (Crison Instruments SA, Barcelona, Spain) coupled with a combined pH electrode cat. No. 52-02. An ultrasonic bath, model Ultrasons-H from J. P Selecta (Barcelona, Spain), operating at 40 kHz, was used for sol sonication. Visible spectra for characterization of the sensors and enzyme activity assessment were performed in a Lambda 45 UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer, Shelton, Connecticut).

The sensor films were placed in a flow-cell (Fig. 1) constructed specifically for this purpose with two perspex blocks and a silicone rubber spacer. The flow manifold (Fig. 1) was assembled with three NResearch 161 T031 three-way solenoid valves (Stow, MA) and a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Villiers-le-Bel, France) equipped with an isoversinic pump tube of the same brand. Flow lines were made of PTFE 0.8 mm i.d. tubing. For absorbance measurements in the flow system plastic optical fibers (ref. FOP1-ST) connected to a digital colour wheel source (ref. FOCWDIG), a silicon photodiode detector (ref. VISD) and a photodetector amplifier (ref. PDA1) from WPI (World Precision Instruments, Florida) were used. Control of the photometer and commutation devices, as well as data acquisition, were accomplished with VisiDAQ 3.1 Standard software, using a microcomputer equipped with a PCL-818 L Advantech interface card.

HPLC determinations were performed on a Merck-Hitachi (Darmstadt, Germany) LaChrom 7000 chromatographic system, equipped with a L-7100 pump, a diode array detector (L-7455) and a LiChroCART 250-4 column (4.6 × 250 mm;

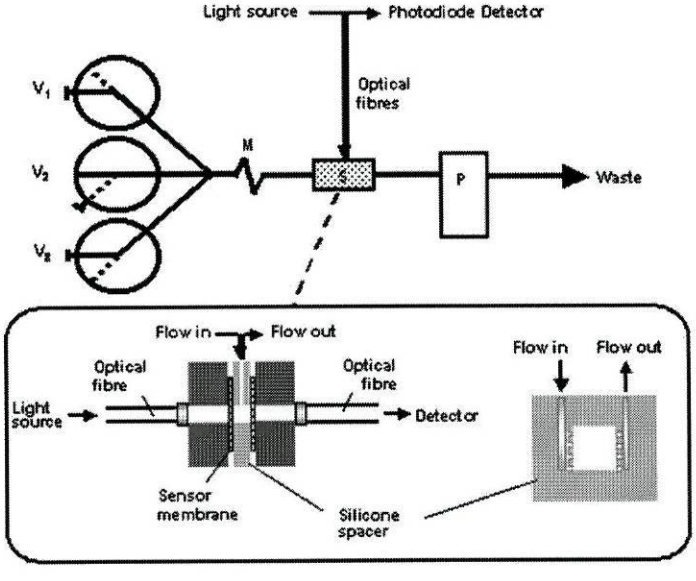


Fig. 1 Diagram of the flow manifold and detail of the flow cell configuration. V1, V2 and V3 - three-way solenoid valves: (- - -) corresponds to the activated position and ( ) corresponds to the off position; M - mixing coil, 25 cm long; S - sensor; P - peristaltic pump.

Merck, Darmstadt, Germany) packed with 5 μm LiChroSorb RP-18 particles.

2.3. Preparation of the sensor

Glass slides (18 × 18 mm) were used as physical supports for film deposition. Prior to coating, the slides were treated with concentrated nitric acid, ethanol and thoroughly rinsed with deionised water, followed by drying at 100 °C, in order to activate the silanol groups on the surface of the glass. The sensors were prepared in a dual-layer immobilization scheme, as follows.

2.3.1. Immobilization of cresol red. For the bottom layer, TMOS (2.0 ml), ethanolic solution of cresol red (8.0 ml) and HCl 0.05 mol l^{-1} (980.0 μl) were mixed and mechanically stirred in a PTFE beaker for 6 h at room temperature. Si:H_2O:ethanol molar ratio was 1:4:12. Different cresol red concentrations in the sol were tested, from 0.5 to 1.5 g l^{-1}. The films were cast by spin-coating 100.0 μl of this sol on the glass substrates at 3000 rpm for 15 s, and then dried at room temperature for one week.

2.3.2. Immobilization of carbonic anhydrase. The sol–gel top layer contained the enzyme immobilized by means of a two-step process. A stock silica sol containing 2.25 ml of TMOS, 700.0 μl of aqueous PEG solution (2 g l^{-1}) and 100.0 μl of HCl 0.05 mol l^{-1}, was sonicated on an ice bath, for 30 min, until a clear sol phase was formed. This sol, if stored at 4 °C, remained fluid for 1 month. The chilled enzyme solution (2 g l^{-1} CA in 0.02 mol l^{-1} phosphate buffer, pH 5.8) was then mixed with the sol in a 1:1 volume ratio. The freshly prepared sol, as well as the enzyme doped sol–gel mixture, were always kept in an ice bath to retard gelation. Films were obtained by spin-coating 150 μl of the enzyme sol–gel solution on top of the cresol red dried films, at 3000 rpm for 15 s. The films obtained were allowed to gel and age at room temperature for 24 h, after which some of them were stored at 4 °C, while others were maintained on air, for at least 5 days before use.

2.3.3. Co-immobilization of cresol red and carbonic anhydrase. For activity studies, single-layer thin films were also obtained by co-immobilization of the enzyme with the pH indicator. The two-step procedure was the same as described for the enzyme immobilization, but cresol red sodium salt was previously dissolved in the PEG solution, in order to obtain a concentration of 3 g l^{-1} in the final sol.

2.4. Procedures

2.4.1. Characterization of the sensor. Before exploiting its usefulness in acetazolamide determinations, the enzymatic activity of the biosensor films was evaluated. For this purpose, *p*-nitrophenyl acetate was used as substrate for CA, acting as an esterase.[21] The sensor was immersed in a 9:1 (v/v) mixture of 0.05 mol l^{-1} phosphate buffer, at pH 7.2, and *p*-nitrophenyl acetate (0.01 mol l^{-1}) dissolved in acetonitrile, and the change in absorbance was measured at the wavelength of 348 nm for 60 min, as reported by Armstrong *et al.*[22] Blank measurements were run under identical conditions but in the absence of the sensor. The esterase activity was obtained by subtracting the value of the blank from the value of the sensor. In order to evaluate the effect of the immobilization procedure on the enzyme's activity, the same determination was performed with the enzyme in solution (0.2 g l^{-1}).

The optical response of the sensor was studied from the absorption spectra recorded in the wavelength range of 400–800 nm after its immersion in buffer solutions at different pH values, from 4.0 to 12.0. HCO_3^- dehydratase activity was evaluated at 570 nm. Absorbance of the films was recorded in the presence of the substrate (bicarbonate, 0.1 mol l^{-1}) and after addition of inhibitor (acetazolamide, 0.1 mol l^{-1}), at pH 7.0. Storage stability was evaluated by comparing dehydratase-catalytic profile of films stored and aged at 4 °C and at room temperature, in a 3-month period.

The extent of cresol red leaching was assessed by immersing a sol–gel film repeatedly for 2-min intervals in 2.0 ml of buffer solution (pH 7.0). After each interval, the sensor was withdrawn and the absorbance of the solution registered at the wavelength of 440 nm. A similar assay was conducted in order to estimate the sensor's enzyme leaching extent, but for this purpose the absorbance of the solution was measured at 280 nm.[13]

2.4.2. Flow system procedures. The response time of the sensor film and its analytical performance were evaluated under flow conditions, by incorporating two sensor layers in a home-made flow through cell with an internal volume of 145 μl, and by coupling it to a multicommutated flow system (Fig. 1). Three-way solenoid valves V1, V2 and V3 were responsible for the access of carrier, substrate and inhibitor, respectively, according to a programmed activation cycle. The procedure was based on the comparison of the enzyme's dehydratase activity in the presence and in the absence of the inhibitor. In the absence of acetazolamide, the substrate HCO_3^- was biocatalytically converted in CO_2, which originated a pH raise that was sensed by the immobilized pH indicator, cresol red; its colour varied from yellow to red leading to an increase of absorbance at the wavelength of 570 nm. In the presence of increasing amounts of acetazolamide and a constant substrate concentration, CA's activity decreased so that smaller pH changes occurred, and therefore reduced changes in the absorbance signal were measured.

First, the initial enzyme activity was measured by inserting substrate solution (bicarbonate, 20 mM) in the flow-cell. For this purpose, valves V1 and V2 were simultaneously activated for 15 cycles, ON/OFF and OFF/ON, respectively, lasting 4 s each, allowing the alternate insertion of small plugs of substrate and carrier solutions. After recording the analytical signal, corresponding to the enzyme's activity, valves V1 and V3 were activated simultaneously for 25 cycles lasting 4 s, and inhibitor solution mixed with carrier flowed through the mixing coil M and then through the flow cell containing the biosensors, allowing the enzyme's activity after inhibition to be recorded. Afterwards the sensors were regenerated by new insertion of substrate solution and the initial activity was re-established. This cycle was repeated for every inhibitor concentration. Inhibition for each acetazolamide concentration tested (I) corresponded to the difference between the

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2005

initial sensor response (E_0) and the final inhibited sensor response (E), according to the expression $I = E_0 - E$.

To monitor the cresol red absorbance, a photodiode detector was coupled to the system *via* optical fibres. The light source used was a yellow light emitting diode (LED) with optimum emission maximum in the wavelength range 560–590 nm.

The flow rate was fixed at 0.5 ml min^{-1}. The response to bicarbonate in the absence of inhibitor was evaluated for concentrations between 5 and 75 mmol l^{-1}. The pH of the carrier buffer solution was varied between 5.5 and 7.8 and its effect on the activity of the immobilized CA was evaluated. The concentration of the carrier buffer solution was also optimised in order to obtain maximum sensitivity.

The useful lifetime of the sensor, as well as the reproducibility of response to the substrate, were estimated by consecutive injections of a solution containing 20 mmol l^{-1} bicarbonate.

3. Results and discussion

3.1. Immobilisation protocol

Much work on the chemistry of sol–gel materials aims at adjusting the initial sol composition to control the hydrolysis and condensation reactions according to the desired application of the end material. The most common preparation of sol–gel films typically involves conditions that are likely to cause protein denaturation, such as high alcohol content and low pH, to reduce viscosity, improve support wetting and to provide long gelation times.[23] To reduce the alkoxide–water system immiscibility gap, sonication was used instead of alcoholic solvents to stimulate the hydrolysis reaction.[24] However, in the absence of ethanol a turbid heterogeneous solution with fast gelation time resulted. To overcome this, hydrolysis was carried out at low temperature. PEG was added to increase the homogeneity of the matrix and to enable enhanced mobility for the entrapped protein. In fact, PEG works as a "pore filling" material that sterically prevents pore collapse[25] and, presumably due to the preferential adsorption of the polymer to the silica surface, it reduces protein–silica interactions.

In the two-step immobilization protocol used for the enzyme films, the pre-hydrolysed TMOS was mixed with the enzyme in a suitable buffer that raised the pH of the medium to near biological values. Still, if the pH transition was too dramatic, gelation became almost immediate, making spin-coating impracticable. So, pH of the buffered enzyme solution was optimised to 5.8 in order to obtain a final sol–gel mixture below neutral pH, in which the condensation rate is maximised, without causing denaturation of the enzyme. Films obtained by this process were homogeneous, crack-free and showed excellent optical transparency.

The pH indicator cresol red, a sulfonaphthalein dye, was used to monitor the CA-catalysed reactions. It was chosen because its colour transition occurs within the operational range of the enzyme, with suitable pK_a, and with high contrast colour transition (yellow to red). Also, the pH transition interval (7.2–8.8) is large enough to allow a good analytical range. In addition, it has proven to be compatible with the enzyme, having no deleterious effect on its activity (see 3.2). However, the co-immobilization of CA with cresol red sodium salt (which is water-soluble) rendered extremely bright films, inadequate for sensing applications, because the amount of dye that was possible to entrap was limited by the amount of water used. Moreover, these films had very intense leaching and poor mechanical resistance. So, as an alternative, ethanol-soluble cresol red was immobilized in a separate layer, taking advantage of the considerable amount of alcohol used as co-solvent in the traditional sol–gel films preparation. These cresol red/sol-gel coatings showed an intense homogeneous orange/yellow colour after drying, with optical transparency suitable for sensing purposes.

3.2. Characteristics of the sensor

The cresol red coatings changed their optical absorption (colour) depending on the pH of the solution in which they were dipped. This change was almost immediate, which states for the fast response of the immobilized dye. The absorbance spectra of cresol red immobilized and in solution, after immersion in buffer solutions of varying pH, is presented in Fig. 2, and show that the characteristic absorption bands of cresol red coatings are the same as for the indicator in solution. The yellow acid form (pH $<$ 7.2) has maximum absorbance at 440 nm while the basic form (red, pH $>$ 8.8) has its maximum at 570 nm, with isosbestic point at *ca.* 480 nm. However, for the immobilized dye the absorption bands are larger and a residual band at 525 nm is observed for the acid form (pH 4). In addition, the titration curves (Fig. 3) are broad and show an apparent pK_a shift of approximately 2–3 pH units, which is consistent with previous work by Makote *et al.* with cresol red sol–gel films.[26] This can be explained by molecule–matrix interactions as well as by physical constraining effects,[27] but predominantly by the heterogeneous nature of the film.[28] Molecules incorporated in the gel pores are distributed along the whole film thickness; some of them remain inaccessible to the buffered solution, so there is at some point simultaneous presence of both forms.

The effect of the immobilized reagent amount was studied by using different initial concentrations of cresol red, in the range 0.25–1.50 g l^{-1}. By increasing the amount of entrapped indicator, higher absorbance signal was obtained in detriment of response speed. Concentrations of cresol red above 1.0 g l^{-1} disturbed the optical quality of the films and the homogeneous distribution of the dye, originating incoherent spectra and enhancing the distribution of chemically inequivalent sites effect described above. Therefore, the concentration of 1.0 g l^{-1} of cresol red was adopted.

Carbonic anhydrase catalyses not only the reversible hydration of CO_2 and dehydration of HCO_3^-, but also the hydrolysis of many esters and the hydration of acetaldehyde and other aldehydes.[4] Although the esterase activity of these enzymes is very weak, by comparison with the hydratase/dehydratase activity, it can be determined with greater ease and accuracy. The kinetic curves obtained for *p*-nitrophenyl hydrolysis in the presence of free and immobilized CA are presented in Fig. 4. It can be seen that the enzyme preserved its characteristic function after entrapment but, in comparison with the free enzyme, the transformation of substrate was

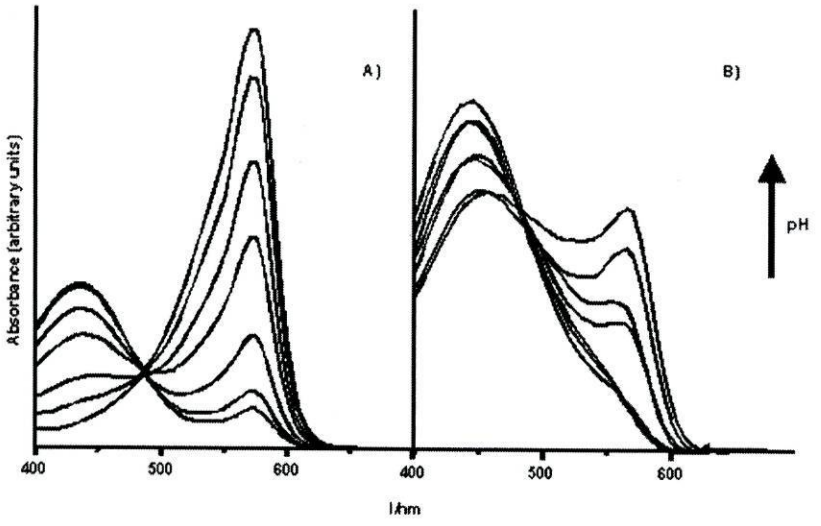


Fig. 2 Absorption spectra of cresol red after immersion in different pH buffer solutions. (A) in solution: (B) immobilized in a sol–gel coating.

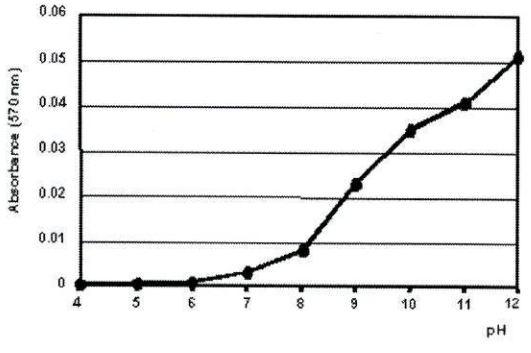


Fig. 3 Absorbance *vs.* pH response curve for sol–gel immobilised cresol red at 570 nm.

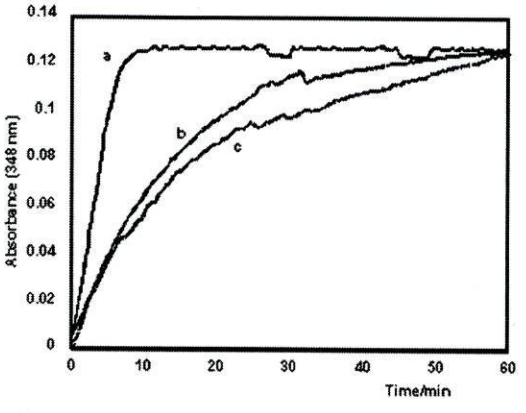


Fig. 4 Kinetic curves of hydrolysis of *p*-nitrophenyl by carbonic anhydrase in solution (a), immobilized in sol–gel film (b) and co-immobilized with cresol red (c).

slower. In fact, coupling of the substrate to the enzyme active site in the sol–gel matrix must proceed slower due both to restrictions of motion inside the pores, and to some degree of polar interactions between the substrate and the surface silanols. Also, some CA molecules may suffer denaturation during the sol–gel immobilization process. The curve (c) in Fig. 4, corresponding to the activity profile of CA in the presence of co-immobilized cresol red, shows that if the indicator dye leaches out to the protein film no significant effect occurs on the reaction rate, *i.e.*, cresol red does not inhibit CA's activity. As can be seen in Fig. 5, in the referred experimental conditions, dehydratase activity of the immobilised CA was inhibited by acetazolamide.

Storage-stability of the immobilized enzyme was also assessed. Although the initial activity is similar, long-term storage at 4 °C seems to compromise the catalytic profile, while immobilized CA shows a greater activity retention on storage at room temperature after a period of 3 months. The films presented reduced and slowed initial leaching (Fig. 6) of enzyme and particularly cresol red (due to its low solubility in aqueous media and also to the protection of the upper film), which makes them suitable for long-term analytical applications.

3.3. Flow system

To enable automated handling of solutions, two biosensor slides were assembled between two Perspex blocks, thus rendering a flow-cell configuration. In the proposed set-up (Fig. 1) calibrations were made resorting to one only stock solution of substrate (bicarbonate 0.1 mol l^{-1}) and inhibitor (acetazolamide 0.02 mol l^{-1}) that were diluted on-line with buffer solution by alternate activation of valves V1 and V2 or V3, respectively. This binary sampling process, implemented by time-based selection of sample and carrier aliquots, reduced

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2005

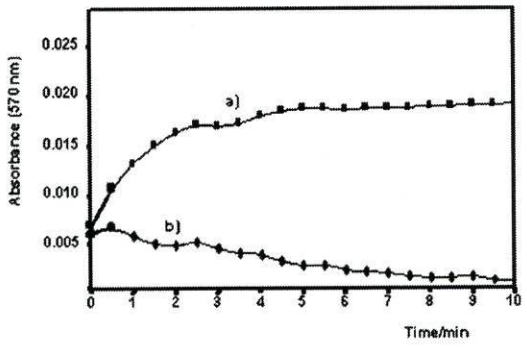


Fig. 5 Kinetic curve for dehydration of HCO_3^- (0.1 mol l^{-1}) catalysed by carbonic anhydrase entrapped in sol–gel film sensor (a), and in the presence of 0.1 mol l^{-1} acetazolamide (b).

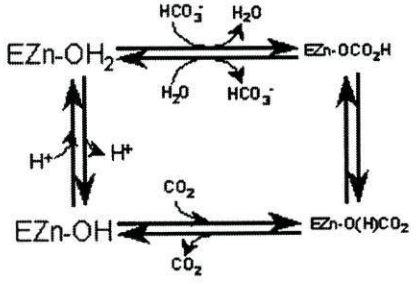


Fig. 7 Catalytic cycle of carbonic anhydrase.

the manipulation of solutions and the consequential errors. Flow rate was set at 0.5 ml min^{-1} in order to reduce leaching and so maximize the sensor's useful lifetime. In the established conditions, 15 ON/OFF activation cycles of valves V1 and V2, lasting 4 s each, were necessary to obtain maximal signal produced by the catalytic activity of the enzyme. Decreased stable signal, corresponding to complete inhibition of the enzyme, was achieved with 25 ON/OFF activation cycles of valves V1 and V3. The pH, concentration and composition of the carrier solution (0.05 mol l^{-1} MES buffer, pH 6.0) were established as a compromise between the sensitivity of the pH indicator and the enzymatic response, namely the optimum conditions for dehydration and inhibition reactions, as discussed below (see 3.3.1 and 3.3.2).

3.3.1. Experimental conditions in the absence of inhibitor. Several parameters affecting the good performance of the enzyme have been optimised, such as the pH of the carrier buffer solution. The reaction catalysed by CA can occur in two pathways, with the formation of CO_2 or HCO_3^-, depending on the pH of the microenvironment containing the enzyme (Fig. 7). One is the conversion of CO_2 in HCO_3^- and involves the zinc-bound hydroxide form of the enzyme. The second is the catalysed reverse reaction and involves the zinc-bound water form.[1] The catalytic activity is characterized by a pK_a value of *ca.* 7.0, such that hydration of CO_2 is dominant above pH 7.0, while dehydration of HCO_3^- is observed below pH 7.0. Accordingly, the dehydration reaction should be carried out at pH $\ll pK_a$ to avoid the interference of the reverse hydration reaction, taking into consideration that pK_a can change after immobilization. So, MES and phosphate buffer solutions in the pH-range 5.5–7.8 were tested as substrate carriers. Moreover, the buffer concentration has a known influence on the kinetic mechanism of the dehydration reaction. At high buffer concentration, the intramolecular proton transfer step limits the maximal rate of catalysis, while at low concentrations buffer molecules enhance the rate constant for catalysis.[2] The fastest and higher response was obtained with MES buffer at pH values between 5.5–6.5. The concentration of the buffer was established as 0.05 mol l^{-1}, weak enough to respond to the

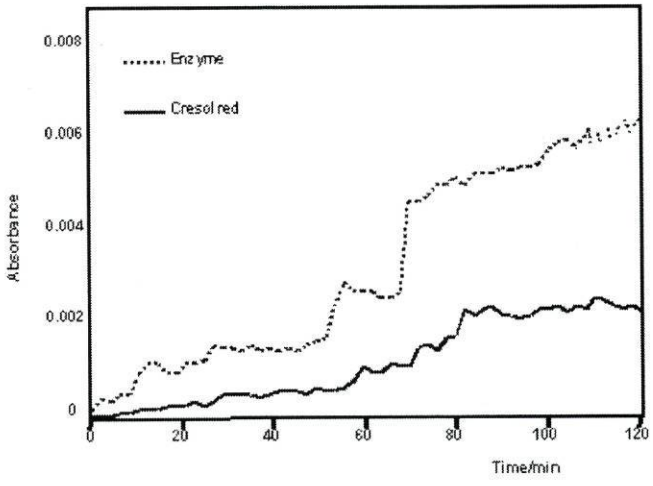


Fig. 6 Leaching profile of the sensor. Absorbance of the leachant was measured at 280 nm for the enzyme and 440 nm for cresol red in 2-min intervals.

change in hydrogen ion concentration and drive the pH to the turnover point of the indicator. Below this concentration the system became very sensitive and any minor pH shifts could lead to inconsistent errors.

The response to various concentrations of substrate was evaluated. Linearity was observed in the range 1.0 to 20.0 mmol l^{-1}; for higher concentrations the sensor response indicates saturation. The sensor exhibited a response time of 60 s and good reproducibility, with an RSD = 0.3% for 20 repeated determinations of 20 mmol l^{-1} bicarbonate. The response to bicarbonate was only reverted by addition of inhibitor, and so water was used for blank measurements.

3.3.2. Experimental conditions in the presence of inhibitor. Acetazolamide inhibits CA by direct coordination to the catalytic Zn^{2+} ion in its deprotonated form through the sulfonamide nitrogen.[3,4,29] As for HCO_3^-, the binding of sulfonamides shows a very strong pH dependence, which results in a bell-shaped curve for the log of the apparent association constant *vs* pH. There is a compromise between the ionisation equilibrium of the sulfonamide moiety, which accounts for the high pH behaviour, and the ionisation equilibrium of the enzyme, which accounts for the low pH part of the curve.[3] Among the pH values optimised for the dehydration of bicarbonate (5.5 to 6.5), maximum inhibition was observed at pH 6.0, and so this value was adopted for acetazolamide determination. Substrate concentration for establishing the reference signal for inhibition measurements was evaluated and set at 20 mmol l^{-1}, near saturation level. At higher bicarbonate concentrations lower inhibition values and inferior sensitivity were obtained. For concentrations below 20 mmol l^{-1} the sensor presented poor reproducibility, due to slow and inefficient enzymatic activity recovery. Under the optimised conditions described, the sensor presented a response time towards acetazolamide of 100 s, with good reproducibility (RSD = 0.7% for 10 replicate determinations of 4.0 mmol l^{-1} acetazolamide) and complete reactivation after each inhibition measurement.

3.4. Determination of acetazolamide: analytical features

Under the conditions described above, for each acetazolamide concentration tested a corresponding inhibition value, I, was measured as the difference between the initial (E_0) and the final inhibited sensor response (E), according to the expression $I = E_0 - E$. A linear response was obtained for acetazolamide concentrations between 1.0 and 10.0 mmol l^{-1} (Fig. 8). The detection limit of 0.2 mmol l^{-1} was calculated from the standard deviation of the signals obtained by injection of a blank without analyte (3σ). The proposed system can handle 22 samples h^{-1}.

The useful lifetime of the sensor was estimated by consecutive injections of a solution containing 4.0 mmol l^{-1} of acetazolamide. After 80 determinations the sensitivity of the sensor showed a reduction of 10%. Potential interference of the major water-soluble excipients present in the real samples, namely sucrose and lactose, was studied for the determination of 5.0 mmol l^{-1} acetazolamide, using a ratio

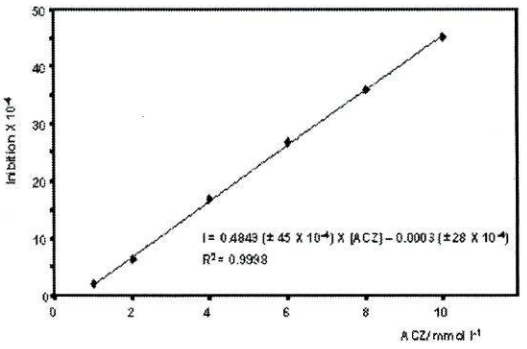


Fig. 8 Range of acetazolamide concentrations that produced a linear response, with five successive insertions of six calibrating solutions.

excipient:acetazolamide of 50:1 (M/M). As expected, no significant interference was observed.

4. Analytical application

In order to demonstrate the usefulness of the developed flow-through biosensor, the described system was applied to the determination of acetazolamide in tablets (Carbinib®) and capsules (Carbinib-R®) available on the Portuguese market.

Ten tablets, or the content of ten capsules, were weighed, ground in a mortar and homogenised. From each powdered sample an accurately weighed amount was taken, corresponding to *ca.* 2.22 g of acetazolamide, diluted with 0.2 mol l^{-1} NaOH, mixed and sonicated for 5 min. This solution was then filtered, and 10.0 ml of the filtrate were taken and diluted to 100.0 ml with water. So, a final sample solution with concentration of approximately 10 mmol l^{-1} in acetazolamide was obtained, and submitted to 1:1 (v/v) on-line dilution with carrier buffer in the flow system.

The results obtained (Table 1) with five replicate injections are in good agreement with the results obtained by HPLC standard method,[7] presenting relative deviation errors better than 0.7%.

5. Conclusions

In this work we demonstrate the immobilization of the enzyme carbonic anhydrase in sol–gel thin films, retaining its catalytic and inhibition properties. The use of a pH indicator as an optical transducer of the enzyme activity provided an optical biosensor with good sensitivity, high storage stability, low leaching, good run-to-run stability and rapid response. By associating this bioptrode with a very simple and versatile

Table 1 Determination of acetazolamide (ACZ) in pharmaceuticals

Sample	Labelled ACZ content/mg	ACZ found/mg: Proposed method[a]	ACZ found/mg: Standard HPLC method[b]
Carbinib®	250	250.0 ± 0.2	252 ± 5
Carbinib-R®	500	514.7 ± 0.4	516 ± 9

[a] Mean of five results. [b] Mean of three results.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2005

continuous flow manifold, which enables automatic handling of solutions, a straightforward, low cost and sensitive procedure for determination of acetazolamide in pharmaceuticals was developed. Since carbonic anhydrase catalyses several reactions *in vitro*, and is also inhibited by several substances other than acetazolamide, this system proposed here can be appropriate for diagnosis and pharmaceutical control purposes.

Acknowledgements

One of us (P.C.A.J.) thanks FCT and FSE (III QCA) for a PhD Grant (SFRH/BD/2876/2000).

References

1 Y. Zheng and K. M. Merz, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10498 10507.
2 S. Lindskog, *Pharmacol. Ther.*, 1997, **74**, 1 20.
3 K. M. Merz, Jr., M. A. Murcko and P. A. Kullman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 4484 4490.
4 C. T. Supuran, A. Scozzafava and A. Casini, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 146 189.
5 P. Kaur, R. Smitha, D. Aggarwal and M. Kapil, *Int. J. Pharm.*, 2002, **248**, 1 14.
6 *Martindale, The Complete Drug Reference*, 32nd edn., Pharmaceutical Press, London, UK, 1999.
7 *US Pharmacopoeia*, 24th ed., U. S. Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD, USA, 2000.
8 B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine and J. I. Zink, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 1120A 1127A.
9 I. Gill and A. Ballesteros, *TIBTECH*, 2000, **18**, 282 296.
10 I. Gill, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 3404 3421.
11 W. Jin and J. D. Brennan, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **461**, 1 36.
12 D. K. Eggers and J. S. Valentine, *Protein Sci.*, 2001, **10**, 250 261.
13 J. D. Badjic and N. M. Kostic, *Chem. Mater.*, 1999, **11**, 3671 3679.
14 B. C. Dave, H. Soyez, J. M. Miller, B. Dunn, J. S. Valentine and J. I. Zink, *Chem. Mater.*, 1995, **7**, 1431 1434.
15 J. W. Aylott, D. J. Richardson and D. A. Russell, *Chem. Mater.*, 1997, **9**, 2261 2263.
16 S. Ferretti, S. Lee, B. D. MacCraith, A. G. Oliva, D. J. Richardson, D. A. Russell, K. E. Sapsford and M. Vidal, *Analyst*, 2000, **125**, 1993 1999.
17 U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright, K. Ramanathan, N. D. Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasanan and S. Chandra, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 3139 3144.
18 U. Narang, P. N. Prasad and F. V. Bright, *Chem. Mater.*, 1994, **6**, 1596 1598.
19 A. Ulatowska-Jarza and H. Podbielska, *Opt. Appl.*, 2002, **32**, 685 690.
20 D. D. Perrin and B. Dempsey, *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall, London, UK, 1979.
21 J. Anderson, T. Byrne, K. J. Woelfel, J. E. Meany, G. T. Spyridis and Y. Pocker, *J. Chem. Educ.*, 1994, **71**, 715 718.
22 J. M. Armstrong, D. V. Myers, J. A. Verpoorte and J. T. Edsall, *J. Biol. Chem.*, 1966, **241**, 5137 5149.
23 C. J. Brinker and G. W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, New York, USA, 1990.
24 E. Blanco, L. Esquivias, R. Litrán, M. Piñero, M. Ramírez-del-Solar and N. de la Rosa-Fox, *Appl. Organomet. Chem.*, 1999, **13**, 399 418.
25 G. A. Baker, J. D. Jordan and F. V. Bright, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1998, **11**, 43 54.
26 R. Makote and M. M. Collinson, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **394**, 195 200.
27 B. Dunn and J. I. Zink, *Chem. Mater.*, 1997, **9**, 2280 2291.
28 M. A. Villegas and L. Pascual, *J. Mater. Sci.*, 2000, **35**, 4615 4619.
29 J. Y. Liang and W. N. Lipscomb, *Biochemistry*, 1989, **28**, 9724 9733.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No trabalho que integra esta dissertação pretendeu-se explorar o recurso a materiais e métodos de imobilização acessíveis a um laboratório de química analítica, para o desenvolvimento de sensores ópticos de matriz sol-gel. Procedeu-se igualmente ao seu acoplamento a procedimentos automáticos, como forma de simplificação e melhoria do desempenho dos procedimentos analíticos sugeridos.

A imobilização dos agentes de reconhecimento químico e bioquímico em filmes finos obtidos pelo processo sol-gel revelou-se uma estratégia vantajosa, na medida em que permitiu a implementação de procedimentos reprodutíveis, simples e económicos de preparação dos sensores. Os dispositivos obtidos demonstraram possuir, para cada caso, a necessidade de uma formulação que correspondesse às melhores características de sensibilidade, estabilidade e robustez, com tempo de resposta curto e tempos de vida útil adequados para a sua rendibilização em aplicações analíticas.

A imobilização em filmes sol-gel de reagentes corados, vulgarmente utilizados como agentes quelantes não-específicos de metais, permitiu a obtenção de sensores sensíveis a espécies catiónicas. Com base nesta estratégia, sensores baseados na imobilização de laranja de xilenol e 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) foram aplicados à determinação de, respectivamente, Bi(III) em diversas formas farmacêuticas, e Zn(II) em insulinas de acção lenta. As condições de imobilização dos reagentes referidos, nomeadamente o tipo de catalisador e os precursores utilizados, revelaram-se determinantes para o desempenho analítico destes sensores. Enquanto que a hidrólise e condensação de TMOS em condições acídicas possibilitou a obtenção de sensores dopados com laranja de xilenol sensíveis a bismuto, com excelente homogeneidade e qualidade óptica, condições similares mostraram-se inadequadas para a imobilização de PAR, resultando em sensores desprovidos de resposta analítica. Após avaliação de condições distintas, foram obtidos sensores sensíveis a zinco, e com qualidades ópticas adequadas, pela co-polimerização de APTES e TMOS na presença de um catalisador alcalino. A adição de APTES resultou na estabilização da matriz sol-gel e contribuiu para a redução da lixiviação do reagente imobilizado; a utilização de um catalisador alcalino revelou-se vantajosa para a obtenção de materiais transparentes baseados neste precursor (que precipita em condições acídicas), e, adicionalmente, favoreceu o mecanismo de complexação do PAR, cujo grupo envolvido na formação do complexo com o zinco sofre ionização em meio ácido.

Os resultados obtidos na aplicação destes sensores indicaram um aumento considerável na sensibilidade dos reagentes depois de imobilizados. Tal pode atribuir-se à elevada concentração de reagente que foi imobilizado num percurso óptico muito reduzido, e a algum grau de efeito de pré-concentração do analito por parte dos sensores, devido à presença de grupos OH livres na matriz sol-gel. Deve ainda considerar-se o efeito da estabilização das moléculas, resultante da imobilização num suporte poroso rígido, e as respectivas interacções indicador/matriz. De facto, para os dois reagentes verificou-se uma alteração das condições óptimas de complexação dos analitos respectivos, em relação às descritas para as reacções em solução, e, no caso do laranja de xilenol, uma aparente alteração da estequeometria, o que parece confirmar a importância deste factor. Adicionalmente, registou-se uma tendência geral para a melhoria da selectividade dos reagentes imobilizados, o que pode ser relacionado com as características de porosidade, ou seja, de permeabilidade selectiva, da matriz sol-gel, e/ou com alterações na reactividade dos reagentes após imobilização, de acordo com as indicações fornecidas pela caracterização espectroscópica.

As melhorias analíticas referidas evidenciaram possíveis aplicações destes dispositivos a outro tipo de amostras e à determinação de outras espécies químicas. Nesse âmbito, estendeu-se a sua aplicação à análise de amostras biológicas. Assim, o sensor baseado na imobilização de PAR em filmes sol-gel foi aplicado com sucesso à determinação de cobre urinário. A metodologia proposta permitiu a análise de uma matriz complexa, como é a urina, sem necessidade de processos de pré-tratamento, tendo-se obtido resultados exactos e precisos, comparáveis aos obtidos através de procedimentos morosos e dispendiosos como ICP-MS. Desta forma, a abordagem inicialmente aplicada ao controlo farmacêutico demonstrou ser também adequada para o diagnóstico clínico.

Finalmente, comprovou-se que o protocolo de imobilização adoptado para os reagentes orgânicos era também compatível com a imobilização de moléculas biológicas. A enzima anidrase carbónica foi encapsulada em filmes sol-gel, mantendo as suas características de actividade catalítica e inibição; a utilização de um indicador de pH, vermelho de cresol, como transdutor óptico-químico, foi viabilizada pela facilidade de sobreposição dos filmes sol-gel. O biosensor obtido demonstrou possuir sensibilidade, estabilidade elevada durante o armazenamento, lixiviação reduzida, reversibilidade e resposta rápida. A monitorização da reacção catalisada pela enzima, e da respectiva inibição, através do acompanhamento das alterações de pH no microambiente do sensor, permitiu a determinação de um inibidor, a acetazolamida, em produtos farmacêuticos usados para o tratamento do glaucoma. Uma vez que a anidrase carbónica catalisa várias reacções *in vitro* e é inibida por diversas substâncias além da

acetazolamida, o biosensor desenvolvido pode ser aplicado ao controlo farmacêutico e clínico num âmbito mais alargado. Adicionalmente, a estratégia explorada no desenvolvimento deste biosensor óptico pode ser extensível a outras enzimas, mesmo aquelas cujos substratos e/ou produtos de reacção não possuam propriedades ópticas mensuráveis.

Os sensores ópticos desenvolvidos foram facilmente acoplados a fibras ópticas e a sistemas de fluxo contínuo, pela simples colocação numa célula de fluxo concebida para o efeito. Estes sistemas possibilitaram o processamento automático e flexível de soluções, o que conduziu a resultados relevantes, nomeadamente a uma maximização da respectiva sensibilidade, reprodutibilidade e rapidez de resposta, e ainda à simplificação dos módulos analíticos. O recurso à detecção simultânea em dois comprimentos de onda distintos, sendo o sinal analítico obtido pela diferença entre o sinal correspondente ao comprimento de onda de interesse e o respeitante ao comprimento de onda de referência, permitiu minimizar o efeito de Schlieren e melhorar a sensibilidade.

As metodologias analíticas apresentadas demonstram que os sensores desenvolvidos constituem uma alternativa viável a processos analíticos de rotina mais dispendiosos, demorados e frequentemente geradores de efluentes agressivos do ponto de vista ambiental. As vantagens e a versatilidade registadas, cuja utilidade na análise de produtos farmacêuticos e na química clínica foi comprovada, podem ainda ser exploradas, não só noutras etapas do controlo farmacêutico, nomeadamente no controlo em processo ou em ensaios de dissolução, como também noutras áreas, como o controlo de qualidade alimentar ou a monitorização ambiental.