FACULDADE DE ENGENHARIA

UNIVERSIDADE DO PORTO

SENSORES EM FIBRA ÓPTICA PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Michelle Shereen Alves Castanheira

Dissertação submetida à Faculdade de Engenharia do Porto para candidatura à obtenção de grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Porto, 2009

Dissertação realizada sob a supervisão de

Professor Doutor José Luís Campos Oliveira Santos

Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Doutor Gerardo González Aguilar

O INESC Porto - Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores do Porto

A instituição de acolhimento para o desenvolvimento desta tese foi:

O INESC Porto – Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores do Porto, na Unidade de Optoelectrónica

Agradecimentos

O meu obrigado a todo um conjunto de pessoas que contribuíram para que o presente trabalho fosse uma realidade.

Agradeço:

Ao Professor José Luís Santos pela pronta disponibilidade, ajuda, apoio, orientação e correcção da tese.

Ao Doutor Gerardo González Aguilar por todos os ensinamentos, ajuda, correcção da tese, apoio, confiança e orientação.

Ao Orlando Frazão, Carlos Gouveia, Paulo Caldas e Susana Silva pelo apoio na realização de toda a parte experimental, pelo incentivo no ínicio e na conclusão deste trabalho, pelo carinho, amizade e paciência sempre demonstrada.

A todos os elementos do INESC Porto, Unidade UOSE, pelo carinho sempre demonstrado.

Aos amigos e à minha família pelo amor, amizade, carinho e apoio.

Resumo

Os sensores em fibra óptica (SFO) são dispositivos de dimensões reduzidas que utilizam as propriedades ópticas para medição, monitorização e sensoriamento de espécies químicas ou bioquímicas tais como os metabolitos, fármacos, vírus e toxinas. Devido à sua sensibilidade, precisão, miniaturização e elevado potencial para a operação multiplexada, os SFO são alternativas promissoras aos métodos tradicionais para medições moleculares.

Os compostos mais comummente usados para aplicações em fibra óptica são indubitávelmente, os compostos fluorescentes, principalmente devido à sua capacidade deles próprios gerarem um sinal óptico. No entanto, os compostos inorgânicos luminescentes são muito raros e caros, por isso podem ser substituidos por compostos orgânicos e inorgânicos que contem uma espécie de luminescência estimulada. A possibilidade de dissolução de compostos orgânicos e inorgânicos em silíca e promover a hidrólise e condensação da mistura a baixas temperaturas permite obter bons resultados através desta técnica denominada sol-gel.

O presente trabalho teve por objectivo desenvolver sensores capazes de gerar uma resposta dependente da concentração dos analitos acima mencionados, mensurável através de uma resposta óptica quando em contacto com o analito de interesse.

Foram preparadas várias matrizes e depositadas em pontas de fibra de vidro pela técnica sol-gel com o propósito de serem utilizadas como sensores de fibra-óptica. As membranas foram caracterizadas pelas técnicas SEM, Raio-X, EDS. Foi estudada a resposta destes sensores a diferentes estimulos químicos de interesse bioquímico ou biomédico em meio aquoso através de técnicas ópticas standartizadas de interrogação. Os três tipos de membranas sol-gel demonstraram capacidade na detecção de metabolitos tais como alguns compostos mutagênicos ou oligoelementos:, H_2O_2, NH_3, NO_2^-, NO_3^-, H^+, Cu^{2+}, Na^+, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, assim como outras substâncias de igual importância como por exemplo C_2H_5OH.

A primeira membrana, FPA, desenvolvida consistiu numa solução de APTEOS (3-aminopropiltriethoxisilano) com Neodímio (III) trifluorometanosulfonato num processo sol-gel de vidro para produzir um composito sensível. Este sensor foi fabricado usando uma rede de Bragg em fibra óptica (FBG) revestida com a membrana sensivel de sol-gel. Esta configuração comportava-se como uma cavidade de Fabry-Pérot, tendo-se demonstrado funcionar como um sensor refractómetro de elevada sensibilidade. Este sensor quando introduzido em soluções ácidas/alcalinas apresentava uma resposta

com sensibilidade a protões e a hidroxílos. O aumento gradual da concentração do analito produzia o deslocamento em comprimento de onda ($\Delta\lambda$) das franjas interferométricas e, consequentemente, na fase do mesmo. Isto foi devido à alteração do índice de refracção da membrana e das suas propriedades físico-quimicas (permissividade do meio), alterando consequentemente o percurso óptico do sinal. A visibilidade das franjas de interferência e o comprimento de onda dos picos interferométricos demonstravam sensibilidades diferentes à variação do indice de refracção externo ou da concentração das soluções ácidas/alcalinas, permitindo a sua discriminação.

A segunda membrana, FPB, foi dopada com EDTA e a terceira, FPC, com hidroxiquinolina (QOH), tendo-se verificado para ambas, um comportamento semelhante ao do primeiro sensor preparado, sendo que o sensor FPB dopado com EDTA e APTEOS mostrou sensibilidade a alguns catiões metálicos, tais como o Ca(II), Cu(II) e Zn(II), enquanto que o sensor FPC evidenciou sensibilidade a Fe(III), Ca(II) e Cu(II). O princípio de funcionamento para ambas as matrizes era o mesmo, ou seja, a matriz sol-gel formou um complexo M^{n+}/complexante no gel.

O tempo de resposta e recuperação estimados para os sensores referidos foi aproximadamente de 5 segundos.

Os sensores desenvolvidos tinham comportamento logarítmico ou exponencial. Para FPA, os coeficientes de determinação ajustados foram iguais a 0,9939, 0,9938 e 0,9949 para as soluções ácidas de ácido clorídrico, ácido acético e ácido sulfúrico respectivamente. Em meio alcalino, o sensor FPA obteve um $R^2_{ajustado}$ de 0,9949 e 0,9895 para as soluções de hidróxido de sódio e amoníaco. O sensor FPB obteve como $R^2_{ajustado}$ 0,9991, 0,9943 e 0,9798 para as soluções de Cu(II), Ca(II) e Zn(II) respectivamente , enquanto que para o sensor dopado com QOH (FPC) aqueles valores foram de 0,9142, 0,9810 e 0,9895 para as soluções de Cu(II), Ca(II) e Fe(III) respectivamente.

A reproductibilidade e repetibilidade da membrana sensora FPA foram estudadas, apresentando um $R^2_{ajustado}$ à função exponencial de 0,9939 e 0,9889 para as cabeças sensoras FPA e FPA.1(réplica), respectivamente. Quando eram testadas amostras contendo uma determinada concentração de analito e água, fazendo medições alternadas verificava-se sobreposição de espectros para o mesmo tipo de amostra.

Os resultados obtidos indicam que acoplar uma segunda cavidade de Fabry-Pérot sem qualquer tipo de revestimento para controlar a temperatura é um procedimento que pode ser utilizado para fazer correcções de temperatura quando o meio envolvente sofre oscilações da mesma.

A solução para os aspectos relacionados com a baixa selectividade poderá passar por considerar um conjunto de sensores que detectam diferentes substâncias, integrados num sistema de multiplexagem. Este tema poderá ser estudado em futuro trabalho. A validação de cruzameno de dados em dispositivos de multiplexagem pode ser fornecida pelo procedimento de n-equações a-n-variáveis. Entre as várias formas de resolução deste problema, existem métodos que podem ser aplicados tais como Análise da Componente Principal (PCA), Regressão da Componente Principal (PCR), *Partial Least-Square Regression* (PLS), *Self Organizing Maps* (SOM), *Cluster Analysis* (CA) e *Backpropagation Neural Networks* (BPN) para tratamento estatistico.

.

Abstract

Optical fiber sensors (OFS) are small devices which use the optical field characteristics to measure chemical or biochemical species such metabolites, pharmaceuticals, virus or toxins. Because of their sensitivity, accuracy, small size and potential for multiplexed operation, OFS are promising alternatives to traditional methods for molecular measurements. The development of a reliable and stable fiber-optic bio-sensor must address several factors.

The most interesting compounds to be used in fiber-optic applications are, undoubtedly, fluorescent compounds, mainly because of the ability to generate an optical signal themselves. However, luminescent inorganic compounds are very scarce and expensive, thus being commonly substituted by inorganic or organic compounds that have some kind of stimulated luminescence. Fortunately, it is possible to dissolve the organic or inorganic compound into a silicon (or titanium) alcoxilate and to promote the hydrolysis and condensation of the mixture at relatively low temperatures leading to the expected results. This technique is commonly named sol-gel synthesis and has been frequently used in the low-temperature synthesis of complex oxides.

This study aimed to develop sensors capable of generating a response dependent on the concentration of the analytes mentioned above, by a measurable optical response when in contact with the analyte of interest. Thin films of several oxides and doped oxides were deposited on commercial glass and glass fibers by sol-gel technologies with the purpose of being used as fiber-optic biosensors. The prepared films were characterized by SEM, DRX and EDS techniques. The response of these thin films to different chemical stimulus of biochemical and biomedical interests in liquid were studied by means of standard optical interrogation techniques.

The three types of sol-gel membranes demonstrated ability to detect metabolites like certain mutagenic compounds or oligoelements such as: H_2O_2, NH_3, NO_2^-, NO_3^-, H^+, Cu^{2+}, Na^+, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, as well as for other interesting substances like C_2H_5OH, for example.

For the first membrane, FPA a sol-gel solution of APTEOS (3-aminopropyltriethoxysilano) based sol-gel glass was mixed with Neodymium (III) trifluoromethanosulfonate to produce a sensitive composite. This sensor has been fabricated using a fibre Bragg grating (FBG) coated with the moisture-sensitive sol-gel. This configuration behaves like a Fabry-Pérot Cavity and it was demonstrated to be a

sensitive refractometric sensor. The technique is particularly suited to the side-coating of optical fibres based on entrapped acid/alkaline solutions.

When immersed in acid/alkaline solutions, the film response by diffusion of ions into the material. The gradual increase of the analyte concentration produces a displacement in the wavelength interferometric fringes and consequently in the phase. This is because the refractive index changes with the physical and chemical properties of the membrane (permittivity of the membrane), thereby changing the optical path of the signal. Fringe visibility and the wavelength of the interferometric peaks display different sensitivities to changes in external refractive index or changes in acid/alkaline concentration, enabling their discrimination.

The second membrane, FPB, was doped with EDTA and the third, FPC, with hydroxyquinoline (QOH) had a similar behavior to the first sensor prepared (FPA). The sensor, FPB, doped with EDTA and APTEOS, showed some sensitivity to metal cations such as Ca (II), Cu (II) and Zn (II), and the FPC sensor showed sensitivity to Fe (III), as well as Ca (II) and Cu (II). Considering the principle of operation for both matrices was the same, this means that the sol-gel matrix formed a complex M^{n+}/complexing molecule in the gel.

The response and recovery time estimated for these sensors was approximately 5 seconds.

The sensors developed showed logarithmic or exponential behavior. For FPA, the adjusted coefficients were equal to 0,9939, 0,9938 and 0,9949 for the acid solution of hydrochloric acid, acetic acid and sulfuric acid respectively. In alkaline medium, the sensor FPA had a $R^2_{adjusted}$ of 0,9949 and 0,9895 for the solutions of sodium hydroxide and ammonia. The sensor FPB had a $R^2_{adjusted}$ of 0,9991, 0,9943 and 0,9798 for solutions of Cu (II), Ca (II) and Zn (II), respectively, while for the sensor doped with QOH, FPC, those values were 0,9142, 0,9810 and 0,9895 for solutions of Cu (II), Ca (II) and Fe (III), respectively.

The reproducibility and repeatability of the sensor membrane, FPA, was studied and it was obtained an exponential adjust of $R^2_{adjusted}$ equal to 0,9889 and 0,9939 for the sensing heads FPA.1 and FPA (reply), respectively. These fiber tips, when tested with samples containing a concentration of analyte and water, presented an overlap of spectra for alternate measurements with the same type of sample.

The obtained results indicated that it is possible to consider a second Fabry-Perot cavity without coating to measure the temperature, permitting real time corrections of the measured chemical data.

The problems related with a low selectivity can be circumvented if tips with multiple sensing substances are multiplexed. This topic can be addressed in a future work.

Data cross validation in multiplexed devices can be afforded by means of the common approach “n-equations, -n-variables”, optimized using methods such as Principal Component Analysis (PCA), Principal Component Regression (PCR), Partial Least-Square Regression (PLS), Self Organizing Maps (SOM), Cluster Analysis (CA), and Backpropagation Neural Networks (BPN).

Índice Geral

Página

Resumo iv

Abstract vii

Índice Geral x

Índice de Figuras xii

Lista de abreviaturas e símbolos xvi

I. Introdução 1

I.1 Instrumentação Médica 2

I.2 A Fibra Óptica 5

I.2.1 Reflexão Interna Total 6

I.3. Redes de Bragg 9

I.4 Sensores em Fibra Óptica 12

I.4.1 Sensores em fibra óptica baseados em interferometria e cavidades de Fabry-Pérot 15

I.4.2 Benefícios da aplicação de sensores em fibra óptica 19

I.5 Transformação de um sensor físico num sensor químico: revestimento de fibras 20

I.5.1 Técnica sol-gel 21

I.5.2. Dip-coating 23

I.6 A importância da Biocompatibilidade 24

I.6.1 Degradação dos materiais 27

I.7. A importância do pH no organismo 28

I.8. A função de alguns sais minerais no organismo 31

I.8.1 A importância do Ferro 32

I.8.2 A importância do Cálcio 33

I.8.3 Doenças causadas por falta ou excesso de Cobre 34

I.8.4 O papel do Zinco em processos biológicos 35

I.9. Enquadramento do Trabalho Desenvolvido 36

II. Materiais e Métodos 39

II.1 Equipamento e material 39

II.2 Reagentes 40

II.3 Soluções 41

II.4 Preparação das cabeças sensoras 42

II.5 Preparação das membranas por sol-gel 43

II.6 Revestimento das cabeças sensoras 44

II.7 Caracterização da membrana sol-gel dopada com APTEOS 45

II.8 Pesquisa de espécies químicas 45

II.9 Controlo da variação de temperatura ambiente na medição de amostras 47

III. Resultados e Discussão 49

III.1 Membrana sol-gel dopada com APTEOS 51

III.1.1 Difracção Raio-X 52

III.1.2 Microscopia de Varrimento Electrónico (SEM) e Espectroscopia Dispersiva (EDS) 53

III.1.3 Desempenho da membrana sol-gel dopada com APTEOS 54

III.1.3.1 Reversibilidade e Reprodutibilidade da membrana sol-gel dopada com APTEOS 67

III.1.4 Membrana sol-gel dopada com APTEOS como sensor de NO_3^-, H_2O_2 e NH_3 70

III.2 Membrana sol-gel dopada com APTEOS e EDTA 71

III.3 Membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH 79

III.3.1 Desempenho/Detecção da membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH 79

III.3.2 Estudo do desempenho do sensor com membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH com variação de temperatura 82

IV. Conclusões 87

V. Referências Bibliográficas 92

Índice de Figuras

Página

Figura I.1	Esquema dos componentes funcionais típicos de um sistema de instrumentação biomédica.	2
Figura I.2	Esquema das principais categorias de mensurandos.	3
Figura I.3	Esquema das fases típicas de estudo num sistema de instrumentação biomédica.	4
Figura I.4	Absorção, transmissão, reflexão e dispersão da luz num material.	5
Figura I.5	Esquemas do comportamento da reflexão em superfícies lisas e rugosas.	6
Figura I.6	Esquemas do comportamento da refracção em meios distintos.	7
Figura I.7	Esquema da refracção de um raio de luz quando passa de um meio com índice de refracção n_1 para outro meio com índice de refracção n_2.	7
Figura I.8	Esquema da estrutura de uma fibra óptica.	8
Figura I.9	Fabrico de redes de Bragg usando máscara de fase.	10
Figura I.10	Espectro da rede de Bragg ($\lambda \approx$ 1550 nm e R≈85%).	11
Figura I.11	Rede de Bragg: espectros de transmissão e de reflexão.	11
Figura I.12	Esquema de sensores de fibra óptica directos: (a) reflexão; (b) absorção; (c) fluorescência.	14
Figura I.13	Esquema de sensores de fibra óptica indirectos: (a) reflexão; (b) fluorescência.	14
Figura I.14	Princípio de funcionamento de uma cavidade de Fabry-Pérot (R_1 e R_2 são as reflectividades das interfaces e T_1 e T_2 as correspondentes transmissividades).	16
Figura I.15	Esquema de uma cavidade de Fabry-Pérot formada com redes de Bragg em fibra.	17

Figura I.16	Espectro de reflexão típico para uma cavidade Fabry-Perot com uma rede de Bragg. À esquerda (A), a imagem exemplifica o conceito de visibilidade, enquanto que à direita (B), a imagem exemplifica o deslocamento em comprimento de onda do espectro, que se traduz na variação de fase do interferómetro.	17
Figura I.17	Interferómetro de Fabry-Perot formado por uma rede de Bragg (R_f~4%) e a reflexão de Fresnel da interface fibra-ar.	18
Figura I.18	Esquema representativo de um sensor químico indirecto baseado na tecnologia de sol-gel.	23
Figura I.19	Representação esquemática do processo de obtenção de filmes por dip-coating.	24
Figura I.20	Esquema de um acontecimento típico na superfície metálica usado num implante biológico	25
Figura I.21	Esquema representativo do estômago humano.	29
Figura I.22	Esquema representativo da escala de pH do sangue.	30
Figura II.1	Esquema representativo da técnica dip-coating.	43
Figura II.2	Montagem da estrutura sensora.	44
Figura II.3	Montagem experimental do sistema sensor desenvolvido.	45
Figura II.4	Esquema experimental do sistema sensor desenvolvido com uma rede de Bragg (λ=1548 nm) e o sensor químico.	46
Figura III.1	Difracção raio-X do substrato em fibra óptica revestido (FPA).	52
Figura III.2	Microscopia de varrimento electrónico da fibra sem revestimento (a), matriz sol-gel dopada com APTEOS, FPA (b).	53
Figura III.3	Espectro de EDS da matriz sol-gel dopada com APTEOS (FPA).	54
Figura III.4	Espectro da cavidade de Fabry-Pérot antes e após revestimento com a membrana sol-gel.	55
Figura III.5	Fibra sem revestimento: sensibilidade em comprimento de onda e visibilidade quando submergida a ponta da fibra FP1 em soluções de ácido acético.	56
Figura III.6	Franjas interferométricas resultantes da imersão da estrutura sensora em duas concentrações distintas (0,6 e 1 mol L^{-1}).	57
Figura III.7	Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas em função do índice de	58

refracção do meio externo (soluções de etileno-glicol).

Figura III.8 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Ácido Acético. 59

Figura III.9 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o o Ácido Clorídrico. 60

Figura III.10 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Ácido Sulfúrico. 61

Figura III.11 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Hidróxido de Sódio. 62

Figura III.12 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Amoníaco. 63

Figura III.13 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas em função do pH do meio exterior. 66

Figura III.14 Resposta da membrana sensora FPA ao ácido clorídrico quando o interferómetro é interrogado utilizando interrogação pseudo-heterodina. 66

Figura III.15 Espectros sobrepostos para concentrações de água e ácido acético (2,0 $x10^{-1}$ mol L^{-1}) que mostram a reversibilidade da resposta da estrutura sensora ao ácido. 67

Figura III.16 Reprodutibilidade da cabeça sensora com ácido clorídrico (FPA e FPA.1). 68

Figura III.17 Gama de pH do estômago para o sensor FPA. 69

Figura III.18 Resposta do sensor FPA ao peróxido de hidrogénio, nitratos e amónia. 71

Figura III.19 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função da concentração de cálcio. 72

Figura III.20 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função da concentração de cobre. 73

Figura III.21 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função das concentrações de cálcio existentes no sangue. 75

Figura III.22 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em solução acidificada e neutra. 75

Figura III.23 Estabilização de pontes de hidrogénio na esfera de coordenação do 76

ião cálcio.

Figura III.24 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em soluções de zinco. 77

Figura III.25 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função da concentração de zinco. 77

Figura III.26 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC em função da concentração de cálcio. 80

Figura III.27 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC em função da concentração de cobre. 80

Figura III.28 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC em função da concentração de ferro. 81

Figura III.29 Esquema das configurações para a estrutura sensora sem (1) e com (2) membrana sensora. 83

Figura III.30 Espectro obtido para o caso das configurações indicadas na figura anterior. 83

Figura III.31 Desempenho das configurações indicadas na Figura III.29 em função da concentração de cálcio. 84

Figura III.32 Estudo do efeito da temperatura no desempenho da membrana sensora FPC. 85

Figura III.33 Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC para soluções tampão de pH. 85

Lista de abreviaturas e símbolos

ASTM	American Society for Testing and Materials
BMD	Biomedical Diagnostics
ºC	Grau Celsius
c	Velocidade da luz no vácuo
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDS	Espectroscopia Dispersiva
FBG	Fiber Bragg Grating
FBG (1)	Fiber Bragg Grating sem revestimento
FDA	Food and Drug Administration
FFP	Fibre Fabry-Perot
FPA	Fibre Fabry-Perot com revestimento tipo A
FPA.1	Fibre Fabry-Perot com revestimento tipo A - réplica
FPB	Fibre Fabry-Perot com revestimento tipo B
FPC	Fibre Fabry-Perot com revestimento tipo C
I_a	Intensidade da radiação absorvida
I_i	Intensidade da radiação incidente
I_r	Intensidade da radiação reflectida
I_s	Intensidade da radiação dispersada
I_t	Intensidade da radiação transmitida
ISO	International Organization for Standardization
L_c	Comprimento da rede de difracção
L	Comprimento da cavidade de Fabry-Perot
n	Índice de refracção
n_1	Índice de refracção do meio 1
n_2	Índice de refracção do meio 2
n_{ar}	Índice de refracção do ar
n_{ef}	Índice de refracção efectivo
n_{fibra}	Índice de refracção da fibra óptica
nm	Nanometros
OSA	Optical Spectrum Analyzer
pO_2	Pressão parcial de oxigénio no sangue
pCO_2	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue
pm	Picometros
R	Reflectividade da fibra

$R_{fresnel}$	Reflexão de Fresnel
$R_{FBG}(\lambda)$	Espectro de reflexão da rede de Bragg original
$R(\lambda)$	Espectro normalizado de reflexão
RDX	Difracção de Raios-x
RIU	Refractive Índex Unit
$R^2_{ajustado}$	Coeficiente de correlação ajustado
R^2	Coeficiente de correlação
R_{sg}	Razão água/precursor
s	segundos
SEM	Scanning Electron Microscope
UV	Radiação ultravioleta
USP	United States Pharmacopeia
μ_r	Permeabilidade relativa do meio
v	Velocidade da luz num determinado meio
V	Visibilidade das franjas
$\Delta\lambda$	Variação de comprimento de onda
ε_r	Permissividade relativa do meio
$\eta(v)$	Coeficiente de sobreposição entre a modulação de índice e o modo propagante
Λ	Período da rede de difracção
θ	Ângulo de incidência
θ_1	Ângulo de incidência da radiação da luz no meio 1
θ_2	Ângulo de incidência da radiação da luz no meio 2
λ	Comprimento de onda da luz
λ_B	Comprimento de onda de ressonância da rede de Bragg
ϕ	Diferença de fase entre as duas ondas reflectidas pelos espelhos de Bragg

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

I. Introdução

Ao longo da história a luz tem sido utilizada em procedimentos de diagnóstico e terapia. Através da observação visual era possível diagnosticar, aplicando a luz em posteriores tratamentos, como por exemplo na inspecção dos olhos e na terapêutica de úlceras [1][2].

Antes de 1900, a medicina tinha pouco a oferecer aos cidadãos, mas era já claramente entendido pelos físicos a importância da instrumentação médica não cirúrgica no diagnóstico e tratamento do corpo humano. De facto ao longo do tempo a medicina tem demonstrado alguma tendência para a rápida expansão nas áreas de diagnóstico e cirurgia minimamente invasivas, o que passou por várias fases no intuito de se conseguirem elementos flexíveis e pouco invasivos capazes de efectuarem uma observação eficaz no interior do organismo [2].

Em 1960, o primeiro laser foi desenvolvido por T. Maimam. Esta nova fonte de luz teve muitas aplicações tecnológicas e militares [1]. Esta descoberta trouxe vantagens na área da aplicação em fibras ópticas, pois conseguiu-se obter fontes de luz monocromática e de alta energia que vieram melhorar a qualidade do sinal a ser transmitido pela fibra.

A partir de 1970, houve um rápido desenvolvimento no campo das fibras ópticas para as Telecomunicações. Fibras ópticas de excelente qualidade foram produzidas para aplicações em redes de Telecomunicações. O sistema em fibra óptica trouxe igualmente a iluminação e a transmissão de imagem para aplicações biomédicas. È também de referir que os métodos ópticos estão entre as técnicas mais antigas e bem conhecidas para o sensoriamento dos analitos bioquímicos.

A miniaturização das fibras ópticas pode tornar possível a medição directa de determinados parâmetros biomédicos, uma vez que existe a possibilidade de introduzir o sensor quer em contacto com a pele humana ou no interior do corpo. Os cateteres ópticos com diâmetros da ordem de dezenas de micrometros e as cabeças sensoras também miniaturizadas a alguns micrometros, permitem aos profissionais de saúde alcançar locais no corpo humano que seriam impensáveis com outras tecnológicas

sensoras. Esta característica, aliada a tantas outras, torna os dispositivos em fibra óptica muito competitivos no vasto domínio da instrumentação sensorial [3] [4].

I.1 Instrumentação Médica

A concepção de um dispositivo médico depende de algumas características exigíveis a ter em conta, tais como o projecto do protótipo, o desenvolvimento do produto, os testes clínicos, a regulamentação, a produção em grande escala, marketing e a comercialização. Esta longa cadeia faz com que o processo seja complexo, de alto custo e lento.

Qualquer sistema de instrumentação tem alguns dos componentes funcionais mostrados na Figura I.1.

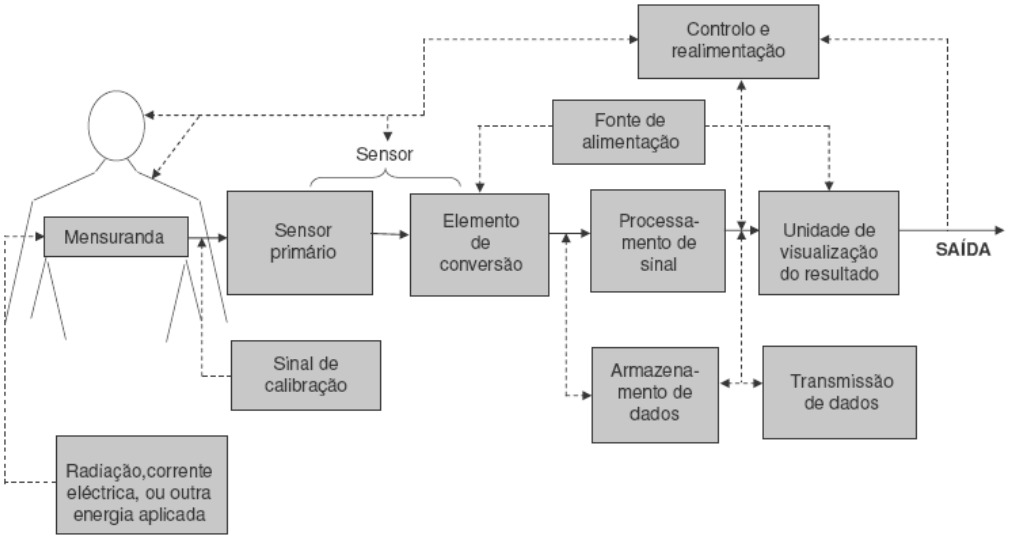


Figura I.1 – Esquema dos componentes funcionais típicos de um sistema de instrumentação biomédica [5].

No esquema representado o fluxo da informação processa-se da esquerda para a direita. Os sistemas de instrumentação médica são análogos aos outros sistemas de instrumentação excepto no facto de o mensurando se situar no corpo humano.

I.1.1 Características de um Sistema de Instrumentação Médica

O estudo da instrumentação biomédica pode ser abordado segundo pelo menos quatro pontos de vista. As técnicas da medida biomédica podem ser agrupadas de acordo com a quantidade sensorial que é medida, tais como a pressão, o fluxo ou a temperatura, segundo o princípio da transdução, como resistivo, indutivo, capacitivo, ultrasonico ou electroquímico. As técnicas de medição podem ainda ser estudadas separadamente para cada sistema orgânico, tais como o cardiovascular, pulmonar, nervoso e o endócrino, o que irá isolar todas as medições importantes para os especialistas que necessitam saber acerca de uma área específica.

Finalmente, a instrumentação biomédica pode ser classificada de acordo com as especialidades de medicina clínica, tais como a pediatria, obstetrícia, cardiologia ou radiologia. Esta abordagem é considerada para o pessoal médico que está interessado em instrumentos específicos, tendo em conta que determinadas medidas, tais como a pressão sanguínea, são importantes para muitas especialidades médicas.

A quantidade física, propriedade ou condição que o sistema mede, denominada mensurando é importante, uma vez que poderá estar no interior do corpo (pressão sanguínea, por exemplo), ou na superfície do corpo (potência do electrocardiograma, por exemplo), emanando do corpo, (radiação infravermelha, por exemplo), ou ainda derivar de uma amostra de tecido retirada do corpo (biópsia, por exemplo) [6]. A maioria dos mensurandos principais pode estar agrupados nas categorias indicadas na Figura I.2.

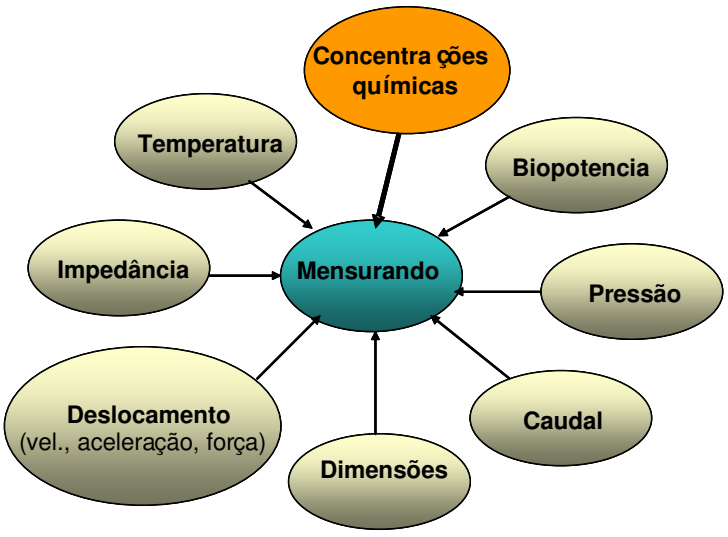


Figura I.2 – Esquema das principais categorias de mensurandos [6].

Os dispositivos operativos num ambiente aplicado à biomedicina impõem uma significativa série de limitações. O equipamento exige uma fácil manipulação e interpretação de medições físicas e/ou químicas, devendo ser minimizado o perigo de choque eléctrico. Existem outras aplicações, como por exemplo dispositivos para detecção de anormalidades de funcionamento ou no exceder de limites desejáveis em determinados sistemas.

Os factores que impõem limitações no projecto são com certeza diferentes para cada tipo de equipamento. No entanto, alguns requisitos genéricos podem ser categorizados ao nível do sinal e da envolvência médica e económica. Para se chegar ao projecto final são requeridos alguns compromissos nas especificações. Os testes actuais de um protótipo são sempre necessários antes das decisões definitivas relativas à avaliação de um determinado projecto [6].

Um projecto de instrumentação médica para ser comercializado deverá passar por diferentes fases, de acordo com a Figura I.3.

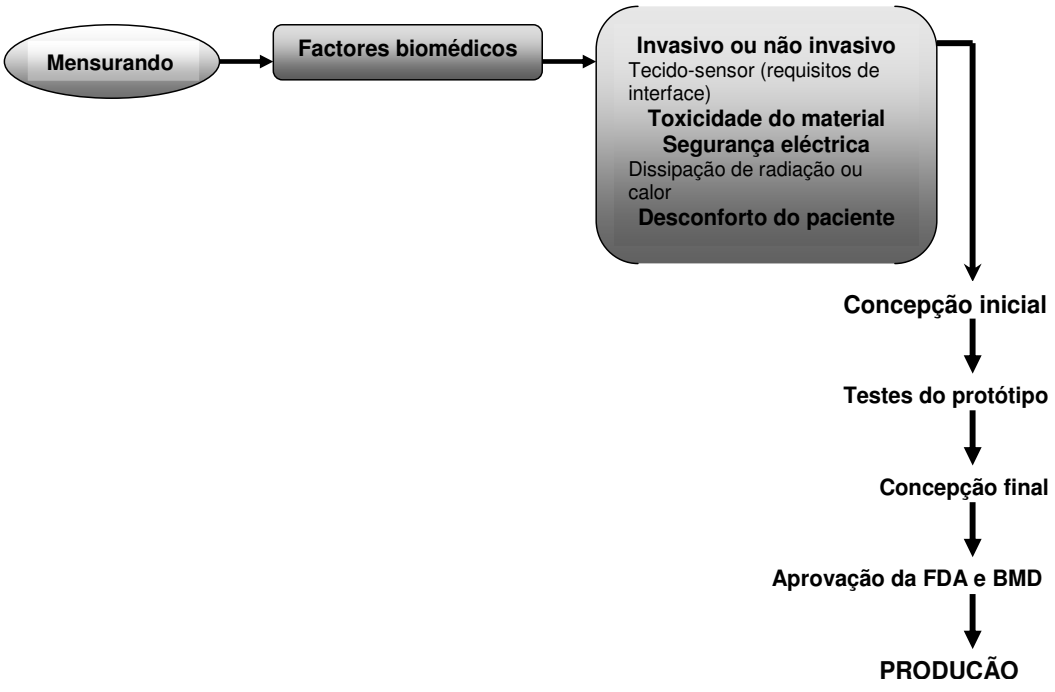


Figura I.3 – Esquema das fases típicas de estudo num sistema internacional de instrumentação biomédica [6].

O desenvolvimento de cada uma das fases da Figura I.3 requer um profundo conhecimento, o que torna o processo singularmente lento.
Posteriormente serão abordados alguns temas relevantes que enquadram o tema proposto para a aplicação biomédica.

I.2 A Fibra Óptica

A fibra óptica tem a capacidade de transmitir luz através do material de que é composta, ou seja vidro ou material polimérico. A transmissão da luz pela fibra segue um mesmo princípio, independentemente do material usado ou da aplicação: é lançado um feixe de luz numa extremidade da fibra, e pelas características ópticas do meio (fibra), a luz propaga-se através de consecutivas reflexões.

Quando a luz incide num material, apenas uma fracção de energia de luz é transmitida, toda a restante é perdida através de três processos: reflexão, absorção e espalhamento [1].
Quando a luz incide num determinado plano do material, podem ocorrer vários processos representados no seguinte esquema, I_r (radiação reflectida), I_s (radiação por dispersão), I_a (radiação absorvida), e finalmente I_t (radiação transmitida) [1].

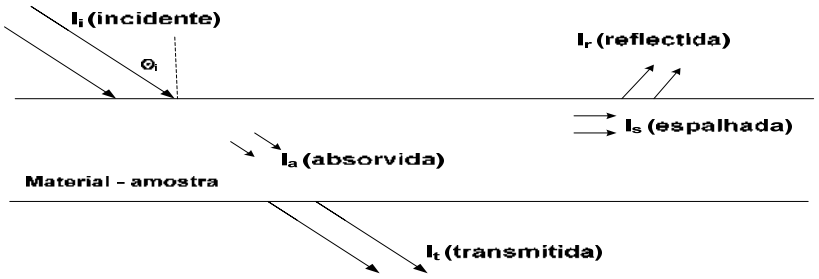


Figura I.4 – Absorção, transmissão, reflexão e espalhamento da luz num material [1].

Pela lei da conservação de energia,

$$I_i = I_r + I_s + I_a + I_t \qquad (I.1)$$

Os materiais ópticos podem ser caracterizados através do índice de refracção que determina a velocidade da luz no meio. O índice de refracção do ar é ≈1, o da água ≈1,33, sendo de ≈1,5 para o caso do vidro. Isto significa que a luz nestes materiais tem uma velocidade menor do que aquela que se verifica no ar. Assumindo que o material tem um índice de refracção n, que a superfície do material é plana e opticamente polida e que a radiação não é absorvida pelo material, sendo I_i a radiação incidente existirá parte da radiação, I_r, que volta para o ar e parte da radiação, I_t, será refractada para dentro do material. A razão I_r/I_i é chamada de reflectividade.
A radiação que é propagada através do material é muitas vezes absorvida e convertida em calor [7].

I.2.1 Reflexão Interna Total

Apesar de a transmissão da luz em fibras ópticas ser um problema complexo, o fenómeno pode ser simplificado com um modelo elementar.

Considere-se dois meios transparentes, meio 1 e meio 2, com índices de refracção n_1 e n_2, respectivamente, com $n_1 > n_2$. Um raio de luz propaga-se com um ângulo θ_1, relativamente à perpendicular da interface entre os dois meios. A intensidade do raio é representada por I_i. Na interface o raio é dividido em dois. Uma parte da intensidade I_r é reflectida de volta para o meio n_1. A outra parte com intensidade I_t é transmitida no meio n_2 e propaga-se a um ângulo θ_2. Os fenómenos da reflexão e refracção são ilustrados nas Figuras I.5 e I.6. [1], respectivamente.

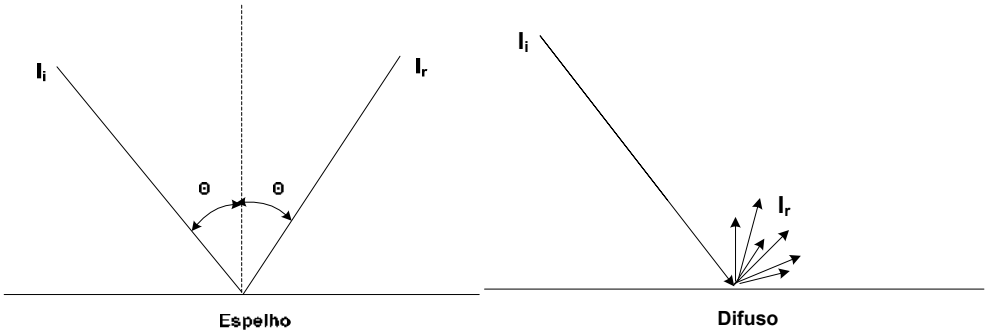


Figura I.5 – Esquemas do comportamento da reflexão em superfícies lisas e rugosas [1].

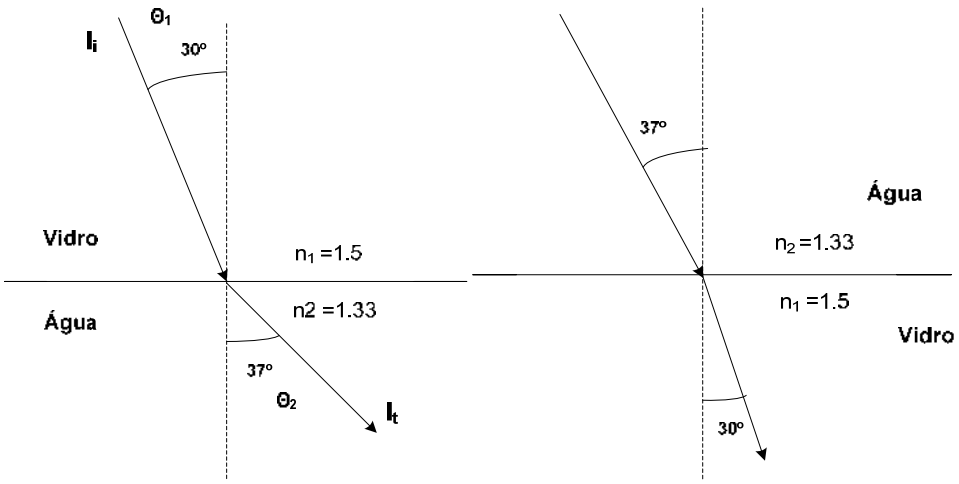


Figura I.6 – Esquemas do comportamento da refracção em meios distintos [1].

Pela lei de Snell,

$$n_2 \sin \theta_2 = n_1 \sin \theta_1 \qquad \text{(I.2)}$$

Em que θ_1 é o ângulo de incidência e θ_2 o ângulo de refracção (Figura I.7).

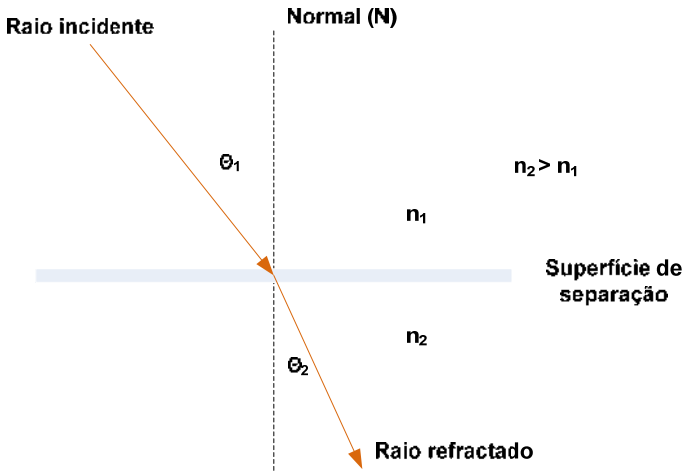


Figura I.7 – Esquema da refracção de um raio de luz quando passa de um meio com índice de refracção n_1 para outro meio com índice de refracção n_2 [1].

Em 1952, o físico Narinder Singh Kapany, baseando-se em estudos efectuados pelo físico inglês John Tyndall de que a luz poderia descrever uma trajectória curva dentro de um material, pode concluir as suas experiências que o levaram à invenção da fibra óptica. Para que haja a reflexão total, a luz deve propagar-se num meio mais denso do que o meio adjacente, devendo ser o ângulo de incidência igual ou superior ao ângulo limite. É por isso que as fibras em vidro ou plástico com um índice de refracção n_1 são revestidas por um segundo material com um índice de refracção inferior, n_2. A nomenclatura usual para estas estruturas é designar núcleo a região cilíndrica central que permite a passagem da luz e a região periférica que envolve o núcleo é denominada baínha [7] [8] [9].

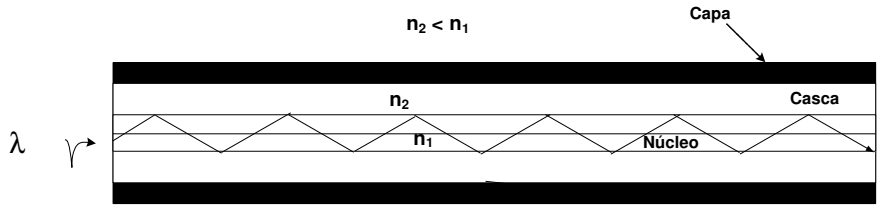


Figura I.8 – Esquema da estrutura de uma fibra óptica [1].

A transmissão da luz pela fibra segue um princípio único, independentemente do material usado ou da aplicação: é lançado um feixe de luz numa extremidade da fibra e, pelas características ópticas do meio (fibra), esse feixe percorre a fibra por meio de reflexões sucessivas.

A transmissão da luz dentro da fibra é possível graças a uma diferença de índice de refracção entre o revestimento e o núcleo, sendo que o núcleo possui sempre um índice de refracção mais elevado, característica que aliada ao ângulo de incidência do feixe de luz, possibilita o fenómeno da reflexão total. As fibras ópticas são constituídas basicamente de materiais dieléctricos (isolantes) que permitem total imunidade a interferências electromagnéticas [10] [11] [12].

I.3. Redes de Bragg

A descoberta da foto-sensibilidade da fibra conduziu ao início da fabricação de redes de Bragg no núcleo da fibra. Uma rede de Bragg é uma microestrutura de pequenas dimensões (≈ 1 cm) inscrita no núcleo de uma fibra óptica utilizando radiação UV coerente, ou seja, emitida por um laser. A microestrutura consiste numa pequena alteração periódica do índice de refracção do núcleo da ordem dos 0.1% [13].
A primeira rede de Bragg foi fabricada com luz laser visível propagando-se ao longo do núcleo da fibra [14]. Contudo, em 1989 foi desenvolvida uma técnica mais versátil por G. Meltz que utilizava sobreposição interferométrica de raios ultravioleta que surgiam na parte lateral da fibra [15]. Actualmente, os dois raios ultravioletas difractados de primeira ordem são normalmente gerados expondo uma máscara de fase periódica com um único raio [16]. A Figura I.9 ilustra um dos processos mais utilizados na escrita de redes de Bragg em fibra óptica: o método da máscara de fase.

Uma máscara de fase é um elemento difractivo fabricado sobre uma base de sílica fundida transparente à luz ultravioleta. Quando a máscara de fase é iluminada perpendicularmente com um feixe de radiação ultravioleta, as ondas correspondentes às duas ordens de difracção eficientes interferem logo após a máscara originando franjas de interferência de elevada visibilidade. Se for colocada em frente à máscara uma fibra óptica fotossensível, ocorrerão alterações de índice de refracção nos locais correspondentes aos máximos de interferência.

Essas alterações formam uma estrutura periódica que constitui a rede de difracção de Bragg. Outra técnica também utilizada é designada de ponto a ponto onde as regiões com índices de refracção mais elevados são escritas ponto a ponto com recurso a radiação laser focada.

Esta é uma técnica muito apropriada para a escrita de redes de período longo [13].

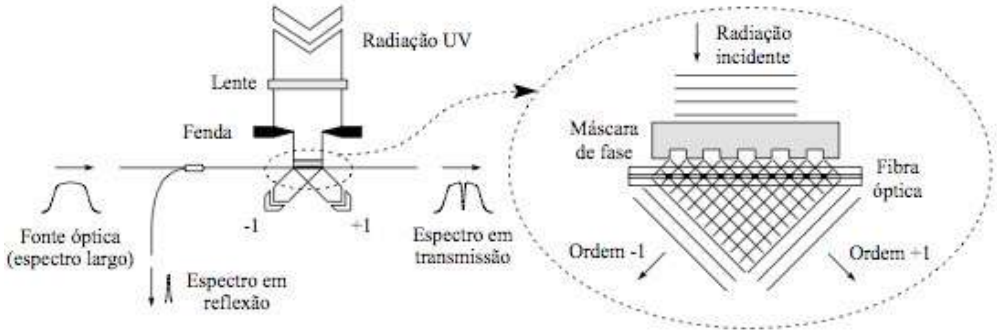


Figura I.9 – Fabrico de redes de Bragg em fibra óptica usando máscara de fase [16].

Quando a luz proveniente de uma fonte de espectro largo é guiada pela fibra e incide na rede de difracção, ocorre espalhamento de luz nos planos consecutivos da rede. De uma forma simplificada, pode dizer-se que para cada rede há um determinado comprimento de onda para o qual é satisfeita uma condição de ressonância em que as ondas geradas em cada plano estão em fase, originando uma reflexão forte (o espectro resultante é mostrado na Figura I.10). Esse comprimento de onda é denominado comprimento de onda de Bragg, λ_B, e a dependência no período da rede de difracção, Λ, é dada por:

$$\lambda_B = 2n_{ef}\Lambda \tag{I.3}$$

onde n_{ef} é o índice de refracção efectivo correspondente ao modo guiado pela fibra óptica. A reflectividade, R, correspondente ao comprimento de onda de Bragg pode ser calculada através da expressão I.4,

$$R = \tanh^2\left(\frac{\pi\Delta n L_c \eta(\upsilon)}{\lambda_B}\right) \tag{I.4}$$

Onde $\eta(\upsilon)$ representa o coeficiente de sobreposição entre a modulação de índice e o modo propagante e L_c o comprimento da rede de difracção.

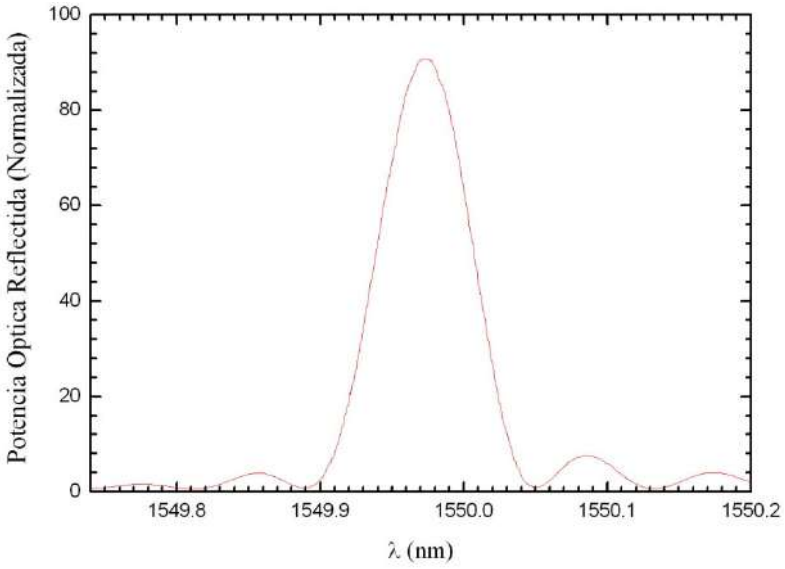


Figura I.10 – Espectro da rede de Bragg (λ≈ 1550 nm e R≈85%).

O comprimento de onda de Bragg (λ_B) depende do período da rede de difracção e do índice de refracção efectivo associado ao modo guiado pela fibra, isto é, dos índices de refracção do núcleo e da bainha. Assim, o comprimento de onda de Bragg (λ_B) será dado também em função de todas as grandezas físicas, que ao interagir com a fibra que contem a rede, possam alterar esses parâmetros. Este facto possibilita a existência de sensores de Bragg em fibra óptica.

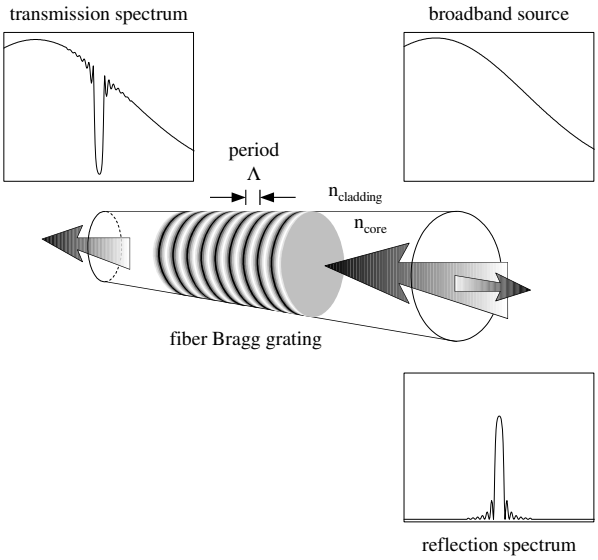


Figura I.11 – Rede de Bragg: espectros de transmissão e reflexão [16].

As redes de Bragg têm grande potencial para produção em massa, uma vez que estão confinadas ao núcleo da fibra óptica. A informação é codificada num parâmetro absoluto – o comprimento de onda, o que significa que as medições não são afectadas pelas variações de potência óptica. Outra característica única é a aplicação a estas estruturas do conceito de multiplexagem em comprimento de onda, que pode ser aplicado a uma única fibra óptica contendo diversos elementos sensores com ressonâncias de Bragg distintas. De facto a capacidade de multiplexagem e de auto-referenciação são características únicas dos sensores de Bragg em fibra óptica [16].
Com o aparecimento destas estruturas têm-se encontrado muitas aplicações devido a estas propriedades, e também à versatilidade e variedade de parâmetros controláveis, que podem formatar de diversas maneiras as suas características espectrais [17].

A utilização das redes de Bragg como elementos sensores implica a necessidade de detectar variações do comprimento de onda de ressonância, um processo designado de interrogação de redes de Bragg [18]-[21]. Um sistema de interrogação adequado deve, em primeiro lugar, garantir a transdução da alteração de comprimento de onda num sinal de intensidade, fase ou frequência. Deve ainda obedecer a alguns requisitos básicos de entre os quais se destacam: alta sensibilidade, isto é, a capacidade de medir desvios de comprimento de onda com resolução elevada; associada a esta resolução, a capacidade de medir largas variações do mensurando; imunidade a flutuações de potência; baixo custo; facilidade de multiplexagem; e também estabilidade relativamente a perturbações externas, nomeadamente variações de temperatura, em situações em que seja difícil proteger adequadamente todo o sistema sensor [22], [23].

I.4 Sensores em Fibra Óptica

O sensor em fibra óptica é um dos mais recentes na evolução tecnológica, cuja variação no mensurando causa mudança nas propriedades da luz transmitida numa fibra óptica. No contexto biomédico, a maior vantagem das fibras ópticas é o facto de serem capazes de efectuar medidas no interior do corpo humano, mesmo dentro de orgãos específicos, como o coração [6] [24] - [28].
Os sensores em fibra óptica que são desenvolvidos são chamados de optrodos, um termo que sugere serem semelhantes aos eléctrodos convencionais.

Contudo, as propriedades e os princípios de operação dos sensores ópticos em fibra são bastante diferentes [6].

Muitas vezes a necessidade de medição *in situ* é dificultada sendo rotineiramente enviadas amostras de fluidos para laboratório, estando sujeitas a atrasos frequentes e a erros na análise química ou bioquímica. As decisões terapêuticas podem ser afectadas por não serem baseadas numa completa, rápida e exacta informação.

A alternativa será o uso de sensores miniaturizados que podem ser inseridos no corpo do paciente, sendo capazes de efectuar uma análise química em tempo real e descartável de modo a evitar doenças transmissíveis [6].

Em principio, o sensor em fibra óptica pode ser inserido no sangue para medir a pressão sanguínea, pH e a pressão parcial de oxigénio. Actualmente é conhecida a aplicação destes sensores na medicina, sendo obtida informação acerca dos fluidos biológicos ou de tecido. Neste contexto, uma das técnicas mais comuns consiste na inserção de duas fibras ópticas através de um cateter num vaso sanguíneo, sendo transmitida luz numa cor particular por uma das fibras, enquanto a luz reflectida pelo sangue é colectada e transmitida pela segunda fibra até ao bloco de detecção e processamento.

O sinal obtido será proporcional à reflectividade do sangue nesta cor particular. Se o processo for repetido para um determinado número de cores, consegue-se obter a reflectividade espectral do sangue. Este espectro pode revelar a saturação de oxigénio no sangue. Neste caso, a ponta das fibras está nua e o diagnóstico pode ser feito por interacção directa entre a luz e o sangue,pelo que estes sensores são chamados sensores de fibra óptica directos (Figuras I.12). Outros casos envolvem um transdutor, chamado optrodo que é adaptado à ponta de uma ou mais fibras. A luz é enviada através da primeira fibra e interage com este transdutor óptico, que por sua vez interage com os fluidos corporais.

Este tipo de sensor chama-se sensor de fibra óptica indirecto (Figuras I.13). Em ambos os casos as fibras ópticas são apenas os transportadores de luz no corpo.

Os métodos convencionais para a medição de pH no corpo humano são baseados na medida de potencial em microeléctrodos. O sensor em fibra óptica de pH oferece muitas vantagens em relação a esse tipo de sensores, pois é potencialmente seguro de interferências e contacto eléctrico, flexível, barato e descartável. Normalmente faz-se uma adaptação de um óptrodo a uma fibra e reveste-se com uma fina camada de uma matriz, possibilitando que pequenos iões, tais como os iões de hidrogénio, penetrem e interajam com o óptrodo, não permitindo assim a entrada de iões maiores

na matriz [1]. A aplicação mais comum ocorre no laboratório químico-clínico, em que as amostras de sangue e de outros tecidos são analisadas.

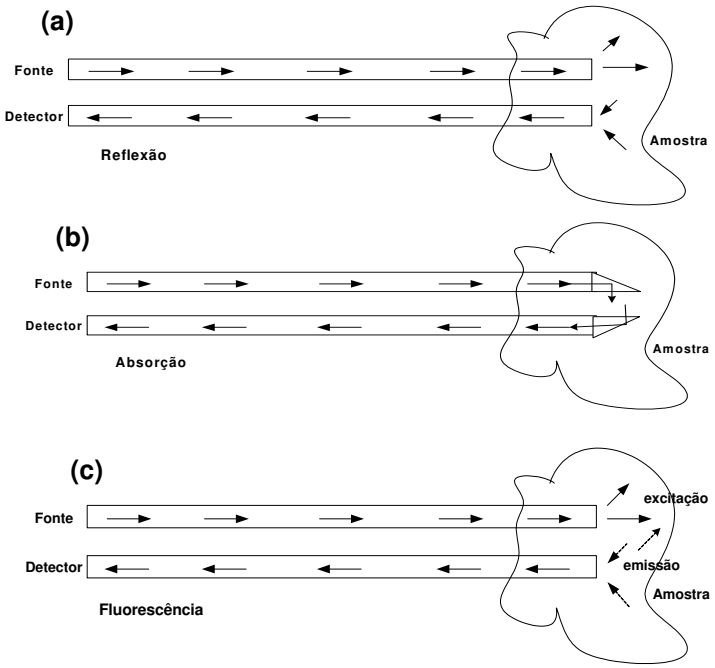


Figura I.12 – Esquema de sensores de fibra óptica directos: (a) reflexão; (b) absorção; (c) fluorescência [1].

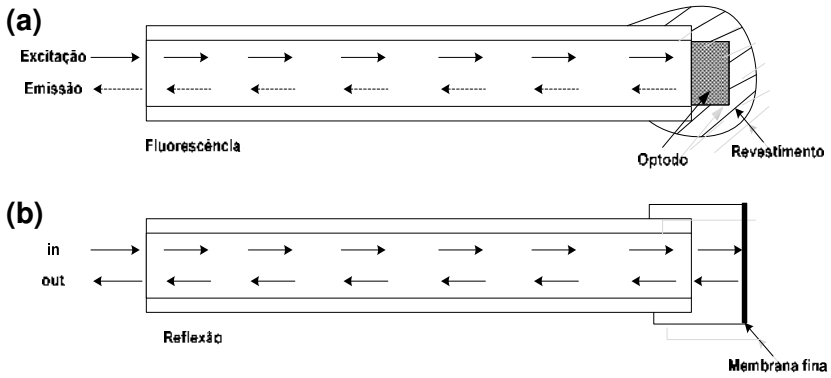


Figura I.13 – Esquema de sensores de fibra óptica indirectos: (a) reflexão; (b) fluorescência [1].

O organismo é composto de células vivas. Estas células, que são essencialmente factores químicos de entrada/saída para a comida metabólica e produtos resultantes, são os blocos constituintes dos órgãos no corpo humano. O estado funcional de um sistema orgânico é determinado pela medida das entradas químicas e saídas dos analitos das células. Como consequência a maioria dos testes feitos em hospital ou em laboratórios de análises clínicas lidam com a análise química do corpo.

Os analitos críticos mais importantes são ao nível do sangue: pH, pO_2, pCO_2, índice de hemoglobina, saturação de O_2, electrólitos incluindo sódio, potássio, fosfato, cálcio, cloro e outros metabolitos incluindo a glicose, lactose, ureia, etc. [6].

Actualmente existe uma emergente necessidade na melhoria de técnicas para diagnóstico médico. As presentes técnicas podem ser divididas em duas classes: métodos invasivos e não invasivos. Os métodos não invasivos, tais como raios- X, tomografia computorizada, ressonância magnética, imagem ultrasónica não causam dor ao paciente e são métodos potencialmente seguros [29] [30].

Os métodos invasivos que requerem penetração no interior do corpo continuam a ser necessários devido a serem muitas vezes mais precisos e fiáveis, melhorando a informação que não poderia ser obtida de outra forma. Os sensores em fibra óptica estão incluídos no novo grupo dos "menos invasivos" [6].

I.4.1 Sensores em fibra óptica baseados em interferometria e cavidades de Fabry-Pérot

No diagnóstico médico é extremamente importante a utilização de sensores não invasivos, conforme mencionado anteriormente. A miniaturização do sensor é muitas vezes fulcral de forma a reduzir a sensibilidade cruzada, minimização da dependência na temperatura, e facilidade de montagem e operação em locais de difícil acesso. Muitas vezes a inércia de alguns fluidos a medir, as bolhas de ar ou gases nas tubagens e a própria elasticidade de alguns materiais podem limitar severamente a resposta das medidas [3].

A presença de um interferómetro poderá minimizar estes factores, devido à sua grande sensibilidade e miniaturização. Nas últimas duas décadas têm sido estudadas e desenvolvidas técnicas em sensores de fibra óptica, em particular em sensores de interferometria e de FBG. Como indicado anteriormente, o desempenho dos sensores de Bragg é determinado essencialmente pela resolução em comprimento de onda de um dispositivo de interrogação usado para medir a variação de comprimento de onda induzido por factores externos (pressão e temperatura, p.e.) [31]

O interferómetro de Fabry-Perot é conceptualmente muito importante, sendo-o também as suas aplicações no contexto da óptica moderna [32].

Na sua forma mais simples, o interferómetro de Fabry-Perot consiste em duas superfícies separadas deuma certa distância onde ocorrem múltiplas reflexões. A grandeza a medir provoca variações no comprimento do interferómetro, o que se traduz em variações da sua fase.

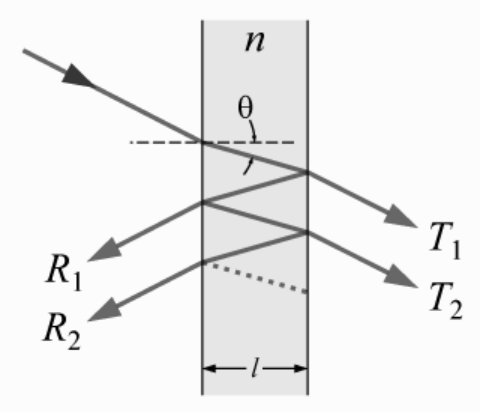


Figura I.14 – Princípio de funcionamento de uma cavidade de Fabry-Pérot (R_1 e R_2 são as reflectividades das interfaces e T_1 e T_2 as correspondentes transmissividades).

Pela análise das características daradiação reflectida (ou transmitida) por este dispositivoé possível determinar a grandeza em estudo. Conceptualmente, isto é conseguido, comparando a fase da luz que atravessou a região onde actua o mensurando, com a da radiação proveniente da mesma fonte óptica mas que percorreu um caminho óptico diferente e protegido da acção do mensurando. Como a radiação é mantida na fibra óptica, este tipo de sensor terá, em geral, baixas perdas e, como já foi referido, é intrinsecamente muito sensível [33], [34]. De facto os sensores baseados neste dispositivo (sensores FFP – *Fabry-Pérot* em fibra) têm mostrado considerável potencial na medição de parâmetros como a temperatura, deformação e índice de refracção, e representam uma das configurações preferidas e mais utilizadas no contexto da sensorização por fibra óptica [35].

Deverá ser referido que é possível implementar um interferómetro de Fabry-Perot em fibra utilizando redes de Bragg como elementos reflectores, conceito que é ilustrado na Figura I.15.

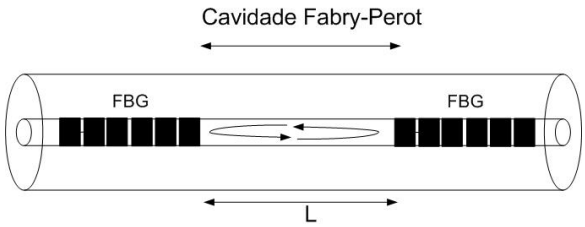


Figura I.15 – Esquema de uma cavidade de Fabry-Pérot formada com redes de Bragg em fibra.

A Figura I.16 mostra o espectro típico de uma cavidade Fabry-Perot baseada na estrutura mostrada na Figura I.15. Basicamente, consiste no espectro do interferómetro modulado pelo espectro da rede de Bragg.

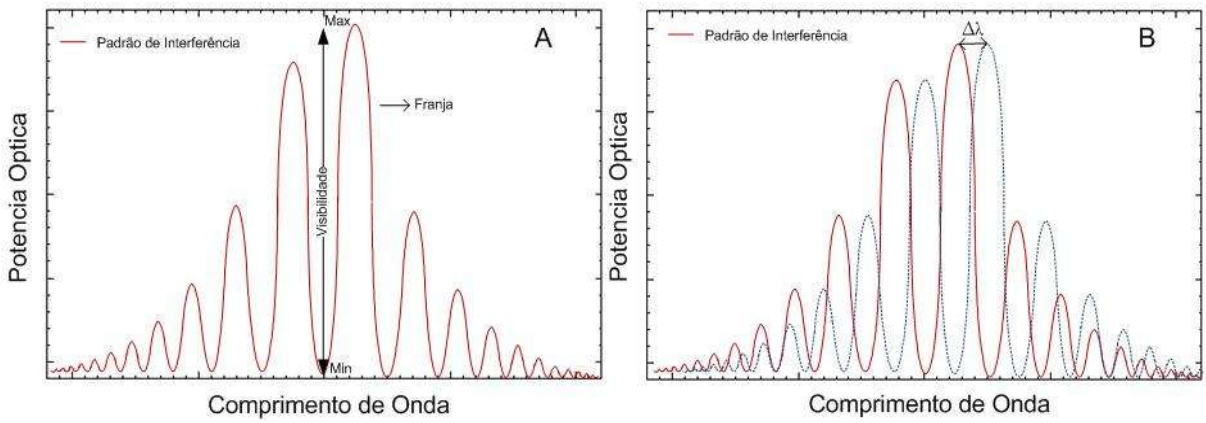


Figura I.16 – Espectro de reflexão típico para uma cavidade Fabry-Perot com uma rede de Bragg. À esquerda (A), a imagem exemplifica o conceito de visibilidade, enquanto que à direita (B), a imagem exemplifica o deslocamento em comprimento de onda do espectro, que se traduz na variação de fase do interferómetro.

A visibilidade das franjas V em função dos máximos e mínimos de interferência, é dada por:

$$V = \frac{Max - Min}{Max + Min} \tag{I.5}$$

O espectro normalizado de reflexão (Figura I.16), assumindo visibilidade unitária, é dado pela seguinte expressão:

$$R(\lambda) = R_{FBG}(\lambda)[1 - \cos(\emptyset)] \quad \text{(I.6)}$$

onde $R_{FBG}(\lambda)$ é o espectro de reflexão da rede de Bragg original e ϕ é a diferença de fase entre as duas ondas reflectidas pelos espelhos de Bragg:

$$\phi = \frac{4\pi nL}{\lambda} \quad \text{(I.7)}$$

onde n é o índice de refracção efectivo do núcleo e L o comprimento da cavidade. A equação (I.6) descreve o espectro de reflexão do interferómetro (Figura I.16A) que é formado pelo produto de duas componentes. A primeira componente é o espectro de reflexão da rede de Bragg original, formando a envolvente do padrão de interferência. A segunda componente é a modulação co-sinusoidal resultante da interferência entre as ondas reflectidas pelos espelhos de Bragg. Ambas as componentes espectrais se alteram devido à acção do mesurando. O deslocamento em comprimento de onda da função ($R_{FBG}(\lambda)$), que determina a posição central da envolvente, é o mesmo que nos sensores de Bragg tradicionais. Se o mesurando actua sobre ambos os espelhos de Bragg, a função interferométrica desloca-se à mesma taxa que a função envolvente. Assim, sob a acção do mensurando, a resposta espectral do interferómetro desloca-se mantendo a sua forma (Figura I.16B) [35] [36].

Outra configuração possível de cavidades Fabry-Perot com redes de Bragg apresenta-se na Figura I.17. Para este caso, uma única rede de Bragg, de baixa reflectividade (R ~4%), é escrita no núcleo de uma fibra monomodo, a uma distância L da ponta da fibra. No extremo da fibra, um segundo espelho é constituído pela reflexão de Fresnel resultante da diferença de índices de refracção da interface fibra - ar.

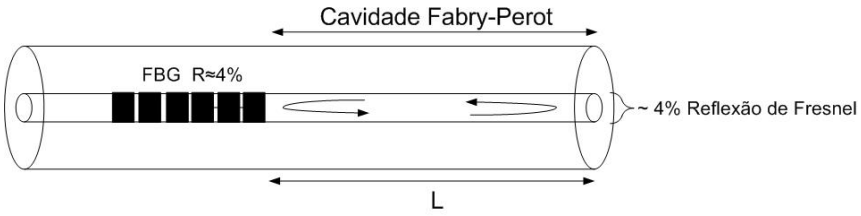


Figura I.17 – Interferómetro de Fabry-Perot formado por uma rede de Bragg (R_f~4%) e a reflexão de Fresnel da interface fibra-ar.

A resposta espectral desta configuração é semelhante à apresentada no caso anterior. Esta configuração é utilizada como refractómetro pois o segundo espelho altera a sua reflectividade em função da reflexão de Fresnel que, como mostra a expressão (I.8) é dada em função da diferença dos índices. Ao submergir a ponta da fibra em líquidos, a visibilidade das franjas modifica-se de acordo com o índice de refracção circundante [37].

$$R_{fresnel} = \frac{n_{fibra} - n_{ar}}{n_{fibra} + n_{ar}} \qquad \text{(I.8)}$$

Os sensores interferométricos para a detecção de substâncias químicas baseiam-se nas mudanças do padrão de franjas, produzidas pela variação de caminho óptico entre as duas ondas que interferem induzida por um determinado mensurando.

Esta mudança de caminho óptico pode ser gerada por uma mudança do índice de refracção. Aplicando um revestimento adequado de modo a absorver moléculas específicas e alterar o índice de refracção, permitirá monitorar um conjunto de espécies químicas [38]. Desta forma, a configuração descrita na Figura I.17 mostra-se interessante deste ponto de vista, pois a utilização de membranas de sensibilidade selectiva na ponta da fibra possibilita a sua aplicação na detecção de diversas substâncias bioquímicas.

I.4.2 Benefícios da aplicação de sensores em fibra óptica

Existem várias vantagens das fibras ópticas (e redes de Bragg) em relação a outros tipos de sensores. Tal como foi referido anteriormente, a fibra óptica é totalmente imune a interferências electromagnéticas, o que significa que os dados não serão corrompidos durante a utilização, sendo imunes a fenómenos como descargas atmosféricas [39]. Outras vantagens que se podem inumerar são:

- Dimensões reduzidas.
- Capacidade para transportar grandes quantidades de informação.
- Matéria-prima muito abundante.
- Potencial baixo custo.

- Elevada largura de banda.
- Elevada sensibilidade e selectividade.
- Monitorização *in situ*.
- Compatibilidade intrínseca com o conceito de multiplexagem de sensores.

Estas e outras características tornam a tecnologia dos sensores em fibra óptica particularmente atractiva em várias áreas, em particular na sensorização bioquímica.

I.5 Transformação de um sensor físico num sensor químico: revestimento de fibras.

A Ciência dos Materiais tem investigado novos materiais cristalinos e amorfos de forma a optimizar determinados processos físico-químicos para uma vasta gama de aplicações, nomeadamente no fabrico de sensores químicos.

Teoricamente, o funcionamento dos sensores de Bragg consiste numa variação de comprimento de onda que é proporcional ao índice de refracção do material, n_2, colocado na ponta da fibra. Por outro lado, o índice de refracção está relacionado com a permissividade dieléctrica do material, sendo que quando a matriz sol-gel é depositada na fibra, passa a existir uma interacção entre esta e uma determinada molécula química do meio circundante permitindo modificar a permissividade da matriz [40]. Por sua vez, o índice de refracção muda consequentemente o comprimento de onda reflectido pela cavidade Fabry-Perot. O índice de refracção, n, de um meio é definido como sendo a razão da velocidade da luz, v, num determinado meio e a velocidade da luz no vácuo (c).

$$n = \frac{c}{v} \tag{I.9}$$

Em termos de propriedades do meio o índice de refracção é dado por,

$$n = \sqrt{\varepsilon_r}\mu_r \tag{I.10}$$

onde ε_r é a permitividade eléctrica do meio e μ_r é sua permeabilidade magnética relativa. Para a grande maioria dos materiais, μ_r, é muito próximo de 1 nas frequências ópticas, donde n, é aproximadamente igual a $\sqrt{\varepsilon_r}$.

A obtenção de uma boa adesão entre a superfície da fibra e um revestimento sol-gel é determinada pela similaridade de propriedades químicas ou pela similaridade entre os materiais em termos de parâmetros da rede cristalina. Sendo que, as fibras ópticas de melhor qualidade são feitas de vidro, é natural que também o revestimento das mesmas seja feito com material baseado em óxido de silício.

I.5.1 Técnica sol-gel

O método sol-gel permite obtenção de materiais inorgânicos ou híbridos orgânico-inorgânicos. Neste método alcóxidos de elementos metálicos ou de silício são submetidos a reacções de hidrólise e condensação que conduzem à formação de partículas de tamanho coloidal e posterior formação da rede tridimensional com a formação de um gel [41].

O processo por sol-gel necessita de técnicas específicas para a deposição dos filmes finos tal como o *"dip-coating"* e o *"spin-coating".* Uma das vantagens é que este processo permite produzir matrizes com uma boa resistência mecânica e química.

A grande vantagem deste tipo de matriz é que durante o processo de fabrico podem ser controlados os parâmetros finais, especialmente a microporosidade. A porosidade da matriz de suporte, na qual está imobilizado o indicador, tem um papel importante na sensibilidade e tempo de resposta do sensor óptico [42] - [44].

O processo básico envolve a hidrólise e condensação/polimerização de um metal apropriado ou de uma solução de alcóxidos, seguido de um programa de temperatura que controla o processo de densificação.

O alcóxido mais utilizado é o tetratoxisilano (TEOS). ROH representa o álcool que é usado como co-solvente que permite a diminuição da velocidade de hidrólise.

A hidrólise e condensação do alcóxido produzem inicialmente uma suspensão de partículas coloidais (o *sol*). À medida que a policondensação aumenta as ligações entre as partículas, a viscosidade também aumenta rapidamente permitindo a formação de uma matriz rígida (o *gel*). Este gel é uma matriz húmida de siloxano que é submetida a um tratamento térmico (usualmente <100ºC) para formar o gel seco (o

xerogel). Uma subsequente exposição a altas temperaturas poderá causar densificação da matriz.

Com o decorrer do tempo a reacção de polimerização prossegue e a viscosidade da solução aumenta até atingir o ponto de transição sol-gel, denominado ponto de gelificação. Outro aspecto a ter em conta é o envelhecimento da matriz. Este processo começa após a secagem e pode durar vários dias até meses. Uma alternativa é fazer um envelhecimento a uma temperatura elevada, tornando o processo mais rápido e a matriz final mais estável.

O valor de pH do sol tem uma influência significativa nas propriedades da microestrutura do material final. Uma catálise ácida está associada a uma hidrólise rápida e uma condensação lenta, ao contrário das catálises básicas que estão associadas a hidrólises lentas e condensações mais rápidas. Além do pH, outros parâmetros tem uma importância que influencia a microestrutura do sol-gel, estes incluem: tipo de precursor, razão água/precursor (R_{sg}), natureza do catalisador (mesmo a um pH fixo, variando o ácido mineral causará uma variação significativa), tempo de cura, temperatura de cura, tempo de secagem, e temperatura de secagem [45]. Para um dado valor de pH o aumento de R_{sg} aumenta a hidrólise, o que origina matrizes densas, ou seja com uma porosidade mais baixa [42] - [44],[46].

Geralmente, no processo de fabrico do sol, solventes como o etanol são usados para facilitar a mistura e produzir um sol mais homogéneo. Contudo, o solvente influência a hidrólise e a condensação. O solvente pode influenciar a taxa de hidrólise pelo aumento ou decréscimo da actividade catalítica. Este pode igualmente reduzir as taxas de reacção pela diluição do sol a partir da redução da concentração do precursor. A razão solvente/precursor também influencia a porosidade da matriz. O aumento desta razão diminui a porosidade do sol. Isto deve-se à retardação do processo de gelificação com o aumento do solvente resultando num crescimento lento das partículas [47].

A temperatura é um factor fundamental a ter em conta na produção de sol-gel, uma vez que quando são aplicadas temperaturas altas o filme torna-se mais homogéneo, e consequentemente, permitir obter uma resposta mais linear [48].

Os materiais em sol-gel são usados com alguma vantagem como sensores uma vez que tem tempos de resposta bastante curtos. Quando baseados em sílica ou substratos de sílica exibem uma adesão bastante forte e boa força mecânica. Os filmes finos, em particular, têm como vantagem tempos de resposta mais curtos o que poderá ser extremamente importante como aplicação em sensores.

Os finos filmes que são produzidos a partir da técnica sol-gel, têm um elevado interesse na investigação e desenvolvimento de sensores químicos, uma vez que o seu contacto com várias espécies químicas origina a modificação da estrutura do filme, por expansão e subsequente alteração das propriedades físico-químicas deste. Estas alterações, quer de índice de refracção quer de alterações ao nível do percurso óptico são interpretadas consequentemente no sinal de resposta.
Na Figura I.18 apresenta-se o esquema geral de um sensor químico baseado na tecnlogia sol-gel.

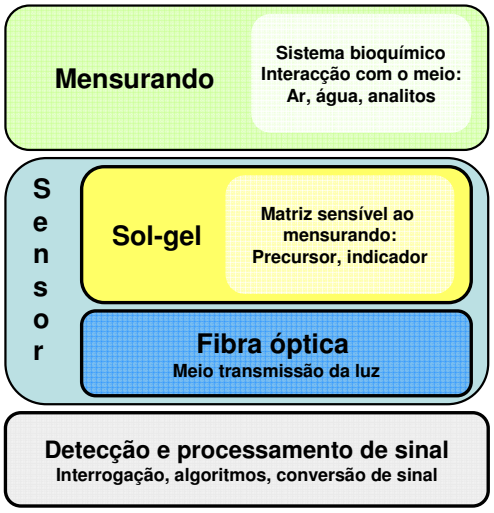


Figura I.18 – Esquema representativo de um sensor químico indirecto baseado na tecnologia de sol-gel.

I.5.2. Dip-coating

Dip coating é uma técnica utilizada na imersão de um substrato num depósito contendo material de revestimento. O processo de dip coating está geralmente separado em três fases:

- **Imersão:** o substrato é imerso na solução do material de revestimento a uma velocidade constante de forma a se obter um revestimento constante em toda a superfície.
- **Tempo de permanência:** o substrato permanece totalmente submerso e sem se mexer para permitir que o material de revestimento adira ao substrato.

- **Retirada**: o substrato é retirado, novamente, a uma velocidade constante. Quanto mais rápido o substrato é retirado do tanque mais espesso será o revestimento no material [41]

Seguidamente é ilustrado o esquema do processo de dip-coating para este tipo de aplicação (Figura I.19).

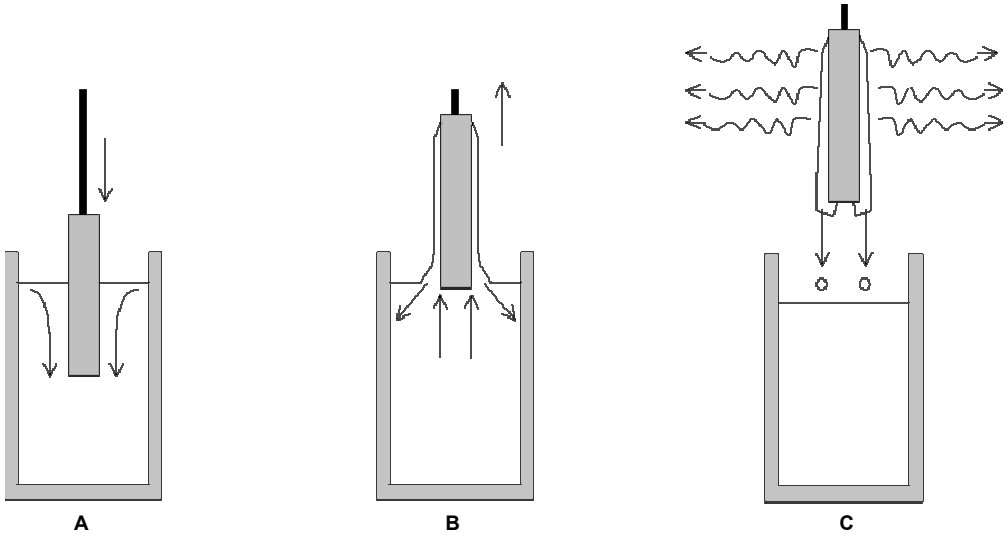


Figura I.19 – Esquema representativo da técnica dip-coating: A- imersão da fibra; B- formação da camada sol-gel molhada; C- evaporação de solvente.

Dada a dimensão dos poros neste tipo de matriz ser de pequena dimensão, geralmente são as espécies mais pequenas (iões simples, átomos) que difundem e interagem nessa matriz muito mais rapidamente, no entanto, uma aplicação mais cuidada de compostos usados para a produção de sol-gel pode permitir a sua aplicação na detecção e/ou quantificação de espécies maiores até uma dimensão correspondente à das proteínas. A técnica sol-gel trás muitas vantagens como suporte de polímeros que permitem uma adesão forte, boa força mecânica e transparência óptica excelente [49].

I.6 A importância da Biocompatibilidade

O biomaterial é um termo usado para indicar um tipo de material que constitui parte dos implantes médicos, dispositivos biomédicos e descartáveis que são utilizados em medicina, cirurgia, medicina dentária e veterinária assim como em qualquer aspecto relativo ao cuidado de saúde do paciente.

O *National Institutes of Health Consensus Development Conference* definiu biomaterial como sendo " toda a substância (outra que não química) ou a combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que pode ser usada por qualquer período de tempo, como um conjunto ou como fazendo parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo" [50].

Os biomateriais têm um papel decisivo na prática da medicina contemporânea melhorando e protegendo a qualidade das vidas humana e animal. A biocompatibilidade e a biofuncionalidade são temas importantes na decisão e concepção dos mesmos. A interacção entre tecidos e fluidos corporais com os biomateriais ou dispositivos biomédicos é uma área extremamente importante e crucial para todo o tipo de tecnologia na medicina.
No caso dos sensores eléctricos ou dispositivos para administração de medicamentos aplicados externamente na pele, devem ser designados para funcionarem de forma optimizada sem causar reacções de irritação ou hipersensibilidade.
Um conceito crucial para entender a interface tecido-biomaterial é todo o conjunto de situações que acontecem nessa mesma interface. O ambiente interno corporal é quimicamente, electricamente e mecanicamente activo, e a interface entre um biomaterial implementado e o organismo é a localização de uma variedade de processos bioquímicos dinâmicos e as suas reacções. Um exemplo típico ilustrado é a Figura I.20 que mostra algumas etapas moleculares e atómicas que acontecem quando um corpo desconhecido (implante metálico) é colocado no organismo.

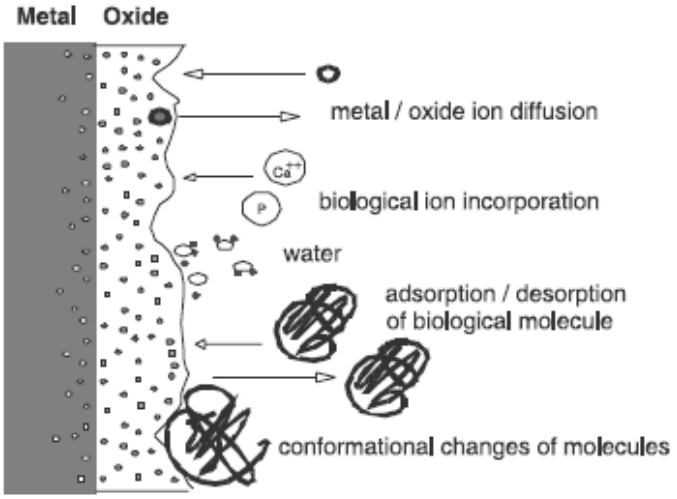


Figura I.20 – Esquema de um acontecimento típico na superfície metálica usado num implante biológico [50].

As interacções entre as moléculas biológicas (proteínas, enzimas, etc.) com a superfície implantada poderão causar mudanças transitórias ou permanentes na sua conformação e na função destas moléculas, sendo que muitas vezes estas mudanças são totalmente indesejáveis.

Poderão existir três interfaces distintas a considerar: entre o organismo e o biomaterial, entre o organismo e as células vivas, e entre as células e o biomaterial. Cada interface apresenta potenciais problemas a longo termo. Numa perspectiva prática, a compatibilidade dos dispositivos médicos é levada a determinar o desempenho dos mesmos, garantindo o não dano significativo para o paciente ou utilizador. Portanto, o objectivo principal será testar *in vivo* a compatibilidade do dispositivo, como se irá comportar em contacto físico num ambiente biológico, fazendo-se assim as avaliações necessárias sob condições simulando o uso clínico.

Algumas entidades responsáveis tais como, *Food and Drug Administration* (FDA), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *International Organization for Standardization* (ISO) e *United States Pharmacopeia* (USP) tem vindo a elaborar procedimentos, protocolos, guias e métodos padrão que poderão ser aplicados em testes para o estudo da compatibilidade [51].

A Tabela I.1 apresenta uma lista de características que poderão ter impacto numa resposta biológica.

Tabela I.1 – Biomateriais e os componentes relevantes nos testes de biocompatibilidade [51].

Material de fabrico
Aditivos, contaminantes, resíduos do processo
Substâncias lixíviáveis
Degradação de produtos
Outros componentes e suas interacções com o produto final
Propriedades e características do produto final

Os testes da compatibilidade do biomaterial ou de um dispositivo com um tecido são baseados na composição química dos materiais, incluindo as condições em que o tecido está exposto, assim como a sua natureza, grau, frequência, duração de exposição do dispositivo dos seus constituintes no local a ser utilizado. No entanto, é necessário ter o conhecimento dos seus componentes no dispositivo biomédico final.

Embora os dispositivos médicos na sua forma definitiva e condição são comummente implantados em modelos animais cuidadosamente seleccionados para determinar a função, assim como biocompatibilidade, pode não ser adequado para realizar todos os testes recomendados necessários para a aprovação regulamentar, sobre o dispositivo final.

Nestas situações, alguns testes pode ser efectuados aos componentes dos dispositivos que tenham sido preparados sob condições de fabrico e de esterilização e de outros processos utilizados no desenvolvimento do produto final [50], [51].

I.6.1 Degradação dos materiais

Os materiais usados em contacto com o sangue ou outros tecidos necessitam de ser criteriosamente escolhidos e testados, resistentes aos impactos, para evitar rupturas ou fracturas durante o uso, não devendo reagir quimicamente com os componentes do sangue nem libertar resíduos químicos na corrente sanguínea. O coeficiente de absorção de água é também um factor importante a ser seleccionado, devendo ser muito baixo ou nulo, ou seja, impermeável à água e gases.

O vidro e a borracha, entre os materiais disponíveis, foram considerados como atóxicos e pouco reactivos ao sangue. Estes materiais seriam portanto, menos traumáticos ao sangue contendo certas propriedades em comum, tais como, elevada inércia química, ou seja, sendo incapazes de reagir quimicamente com os componentes do sangue, grande resistência à corrosão e elevado grau de impermeabilidade [50], [52]. Apesar de aqueles não serem susceptíveis à corrosão, as cerâmicas e os vidros são susceptíveis a outras formas de degradação quando expostos a um ambiente fisiológico.

As grandes desvantagens do uso de cerâmicas e vidros como implantes são o facto de serem quebradiços e terem pobre tracção. No entanto estes tem grande força quando submetidos a cargas de compressão [53].

Diversos métodos são utilizados para o teste dos materiais. Alguns testes avaliam as propriedades físicas e mecânicas dos materiais, tendo em vista as suas possíveis aplicações, enquanto outros, avaliam a compatibilidade dos materiais com o sangue e os tecidos biológicos.

Os testes mecânicos e físicos avaliam a resistência dos materiais, a dureza, resistência à corrosão, durabilidade, estabilidade térmica, a natureza da superfície e suas cargas eléctricas, flexibilidade e elasticidade, a porosidade e impermeabilidade,

bem como a susceptibilidade à acção dos adesivos ou colas para a união de diferentes partes ou diferentes materiais.

Com frequência diversas formulações de um mesmo material são estudadas, para verificar as características mais adequadas de cada formulação. A biocompatibilidade dos materiais é estudada pelo emprego de testes de natureza hematológica, biológica e física.

Citam-se na tabela I.2 os tipos de testes usualmente feitos a biomateriais, dependendo da sua aplicabilidade.

Tabela I.2 – Testes aos biomateriais [50].

Testes aos materiais	Descrição
hematológicos	visam estabelecer a existência e a extensão de alterações do sangue causadas pelo contacto com o material.
biológicos	visam estabelecer a existência e o grau de toxicidade dos materiais para os tecidos.
físicos	permitem a correlação das propriedades físicas das superfícies e seus eventuais efeitos no sangue.

Alguns testes têm de ser acompanhados a médio e longo prazo, para detectar eventuais efeitos tardios do contacto com os materiais. Estes, por sua vez, serão ainda submetidos a outros rigorosos testes de eficiência e compatibilidade, antes da aprovação para uso clínico [50].

I.7. A importância do pH no organismo

A digestão é uma função primária que fornece ao organismo os nutrientes e a água necessários para o seu bom funcionamento.

Os alimentos ingeridos movem-se ao longo do canal digestivo num ritmo próprio dependente da etapa pela qual se encontram: digestão, absorção, armazenamento e expulsão dos alimentos. Cada órgão tem uma função própria no sistema, assim o esófago age como condutor da passagem da comida para o estômago para uma mistura e trituração posteriores. A comida ingerida é depois eliminada no intestino delgado, que tem o papel principal nos processos de digestão e absorção [54].

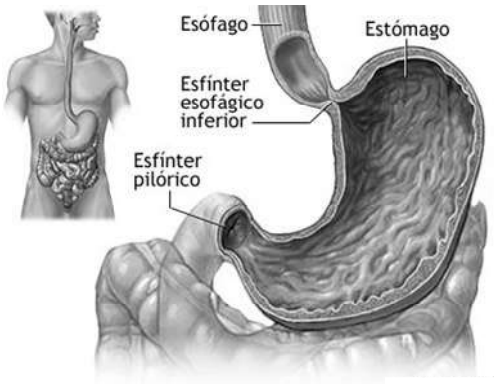


Figura I.21 – Estômago humano [55].

No estômago, o alimento é misturado com a secreção estomacal, o suco gástrico (solução rica em ácido clorídrico e em enzimas). Apesar de estarem protegidas por uma densa camada de muco, as células da mucosa estomacal são continuamente lesadas e mortas pela acção do suco gástrico. O alimento pode permanecer no estômago por até quatro horas ou mais e depois mistura-se ao suco gástrico auxiliado pelas contracções da musculatura estomacal. O bolo alimentar transforma-se em uma massa acidificada e semilíquida, o quimo [56].

O pH exacto de cada órgão é extremamente importante, uma vez que em cada sistema existe um intervalo exacto para o correcto funcionamento de cada um deles.
A medição do pH *in situ*, nomeadamente no sangue e estômago, tem grande importância pelo facto de possibilitar um diagnóstico quase instantâneo, o que não é muitas vezes possível com os métodos tradicionais.
No sistema gástrico, por exemplo, o ácido clorídrico é segregado nas células parietais do estômago podendo o pH deste ser da ordem de 0.9 - 2. O pH ácido do estômago tem importância porque é o pH adequado para a acção das enzimas digestivas que aqui actuam (lípase gástica e pepsina) e para a desnaturação das proteínas da dieta [3] [57] –[59].

Um outro método já desenvolvido é a medição de pH através de sistema óptico reversível por corante. Uma monitorização contínua do pH do sangue é essencial para um tratamento apropriado dos pacientes que tem problemas respiratórios e metabólicos. A gama normal de pH no sangue arterial é de 7.38 a 7.44. O decréscimo no pH (aumento da concentração de iões hidrogénio) ocorre com o decréscimo da excreção de CO_2 (respiração acidosis) e/ou com o aumento da produção de ácido fixo (tal como ocorre na diabetes ketoacidosis) ou nas perdas anormais de bicabornato

(principal tampão do ião hidrogénio no sangue). A acidosis resulta de dois últimos processos denominados acidosis metabólico. O aumento no pH (decréscimo da quantidade de iões de hidrogénio) ocorre com um aumento da razão de excreção de CO_2 (alcalosis respiratória) e/ou da anormal perda de ácido (que resulta do vómito prolongado). É de salientar que uma medida de pCO_2, ou do nível de bicarbonato no sangue ao longo de uma medição de pH, deve ser feito com o intuito de classificar o tipo de anormalidade ácido-base [6], [57]-[60].

Pequenas sondas de pH têm sido desenvolvidas para medidas intravasculares de pH do sangue. Estes instrumentos cobrem a gama de 7.0 a 7.6 unidades de pH com uma resolução de 0.01 unidades de pH.

As medições exactas e rápidas de pO2, pCO2, pH nos níveis de sangue são vitais no diagnóstico e tratamento de muitas patologias. Anormalidades significativas destas quantidades podem rapidamente serem fatais quando não tratadas apropriadamente. Estas medidas são usualmente feitas em espécies do sangue arterial [6]..

Tabela I.3 – Exemplos de diferentes situações clínicas dos gases do sangue arterial [6].

Exemplo	P_{CO2} (mm Hg)	pH	P_{O2} (mm Hg)	Interpretação
1	40±3	7.40±0.03	90±5	Sangue normal
2	44±3	7.34±0.03	88±5	Sangue normal durante o sono
3	22	7.57	106	Hiperventilação
4	68	7.10	58	Hipoventilação
5	58	7.21	39	Hipoventilação e hipoxemia

Relativamente à medição de pCO_2, baseia-se no facto de a relação entre log CO_2 e o pH ser linear ao longo da gama de 10 a 90 mm Hg (1.3 a 12 kPa), o que inclui basicamente toda a gama de valores relacionada com o interesse clínico. Este resultado pode ser estabelecido pela observação de algumas relações químicas fundamentais entre H^+, H_2CO_3, HCO_3^- e pCO_2 [6]. Estas três primeiras quantidades são enunciadas pela equação de equilíbrio I.11,

$$H_2O + CO_2 \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3^- \qquad \text{(I.10)}$$

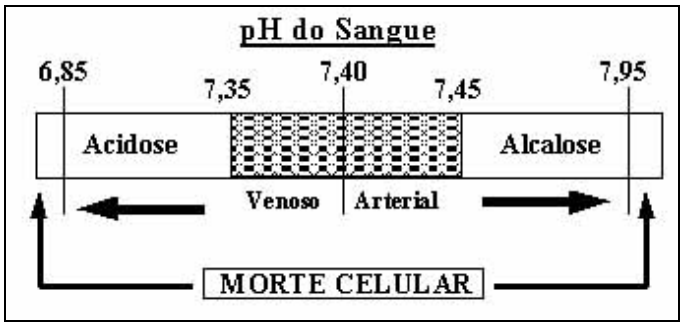


Figura I.22 – Esquema representativo da escala de pH do sangue [59].

I.8. A função de alguns sais minerais no organismo

Os minerais possuem papéis essenciais, como constituintes estruturais dos tecidos corpóreos, por exemplo, o cálcio e o fósforo que formam os ossos e dentes; como reguladores orgânicos que controlam os impulsos nervosos, actividade muscular e o balanço ácido-base do organismo; como componentes ou activadores/reguladores de muitas enzimas. Além disso, muitos minerais estão envolvidos no processo de crescimento e desenvolvimento corporal. Como componentes dos alimentos, os minerais participam no sabor, activam ou inibem as enzimas e outras reacções que influem na textura dos alimentos.

Os minerais são divididos em macrominerais (necessários em quantidades de 100 mg ou mais por dia) que são: cálcio, fósforo, sódio, potássio, cloro, magnésio e enxofre, microminerais (necessários em pequenas quantidades - miligramas ou microgramas por dia) que são: ferro, cobre, cobalto, zinco, manganês, iodo, molibdénio, selénio, flúor e cromo. Há ainda outros minerais que são tóxicos como chumbo, cádmio, mercúrio, arsénio, bário, estrôncio, alumínio, lítio, berílio e rubídio. Cada mineral é requerido em quantidades específicas, numa faixa que varia de microgramas a gramas por dia. Dessa maneira, é importante dizer que o excesso na ingestão de um pode acarretar prejuízos na absorção e utilização de outro. Por exemplo, a absorção de zinco pode ser afectada por suplementação de ferro, enquanto a ingestão em excesso de zinco pode reduzir a absorção de cobre [60] [62].

Seguidamente serão feitas algumas abordagens relativas à presença (excessiva ou não) ou ausência de alguns sais minerais encontrados no processo biológico do ser humano.

I.8.1 A importância do Ferro

Devido a seu potencial redox, o ferro tornou-se o metal mais comummente utilizado na maioria dos sistemas biológicos. Nos seres vivos, exerce função essencial como cofactor nas reacções de transferência e conservação de energia, além de participar de vários outros processos como o transporte de oxigénio e síntese de biomoléculas. Assim, tanto a deficiência quanto o excesso de ferro no organismo são responsáveis por um amplo espectro de doenças, variando desde a anemia até a sobrecarga.
O ferro é um elemento fundamental para várias funções metabólicas da maioria dos seres vivos, com excepção de alguns microrganismos da família *Lactobacillus*, participa no transporte de oxigénio, síntese de DNA, reacções redox na cadeia de transporte de electrões, além de fazer parte da estrutura molecular de diversas proteínas e enzimas. Portanto, o ferro é um elemento essencial para as transformações de energia que ocorrem nos sistemas biológicos, sem o qual, a vida não seria possível. Os valores de referência diários de ferro para indivíduos saudáveis foram recentemente revistos pelo *Institute of Medicine's and Food and Nutrition Board*. Para homens e mulheres, acima de 13 anos de idade, nos quais os valores de referência variavam de 10 a 12 mg/dia e 10 a 30 mg/dia, hoje apresentam variação de 8 a 11 mg/dia e 15 a 27 mg/dia, respectivamente [63].

O problema de excesso de ferro no corpo deve-se frequentemente a uma alta taxa de absorção, via dieta alimentar, pelo sistema gastrointestinal, como acontece com os portadores de hemocromatose, causada justamente pelo excesso da absorção intestinal de ferro, resultando em danos nos tecidos e prejuízo funcional dos órgãos envolvidos, especialmente fígado, pâncreas, coração e hipófise e evoluindo para cirroses, diabetes *Mellitus*, alterações na pigmentação da pele, artritea, cardiomiopatias e atrofia das gônadas. Outra causa de excesso de ferro é repetida transfusões de sangue, em geral destinada a pacientes que sofrem de anemia crónica do tipo Talassemia Beta Maior e intermediária, e Anemia Falciforme, entre outras.

O ferro em excesso, armazenado no organismo, apresenta-se numa forma química (ferro trivalente) que não pode ser absorvida pelo organismo. Esse ferro trivalente, em excesso, pode se reduzir e se apresentar na forma bivalente, que é altamente reagente. Uma pequena parte do ferro absorvido é reaproveitada pelo organismo. Mas quando o fígado está sobrecarregado de ferro, os hepatócitos (células do fígado que

mais armazenam ferro) são bombardeados por uma espécie de oxigénio reactivo, que os leva à morte.

Os principais órgãos em que o ferro se acumula são o fígado, o coração e o baço. O fígado é o principal órgão estudado para a avaliação da quantidade de ferro no organismo por apresentar grande volume e maior armazenamento. O diagnóstico do nível de ferro dos portadores das doenças citadas (hemocromatose e anemias) é de fundamental importância para o controle médico, principalmente para pacientes aos quais são administradas drogas (denominadas quelantes) que visam excretar o excesso de ferro do corpo. O método comummente usado na maioria dos centros médicos para a avaliação da sobrecarga no organismo é a estimativa do nível de ferro no plasma sanguíneo. Mas existem certos quadros clínicos em que os resultados não coincidem com o verdadeiro nível de ferro do corpo.

Para isso, existem outros dois métodos de quantificação do ferro no corpo: a biopsia da agulha e a susceptibilidade magnética. No primeiro, uma pequena porção do fígado é removida e analisada. Mas trata-se de técnica invasiva e de risco, que não pode ser repetida com frequência. Já o segundo método tem chamado a atenção dos especialistas por ser uma técnica não invasiva que vem apresentado bons resultados. A única desvantagem é o alto custo, que impede muitos centros de adquirirem o equipamento adequado [64].

I.8.2 A importância do Cálcio

O cálcio é um elemento essencial nos organismos vivos. Nos animais, o cálcio é o elemento inorgânico mais abundante, e está localizado principalmente nos ossos e nos dentes sob a forma de fosfato de cálcio. Também o sangue é um reservatório importante do ião cálcio. De um modo geral, encontramos cálcio em todos os tecidos animais, com diversas funções como a de controlar a transmissão de impulsos nervosos, a acção muscular, a coagulação do sangue e a permeabilidade celular.

A deficiência de cálcio pode provocar raquitismo, falhas no mecanismo de coagulação do sangue, distúrbios nervosos e contracções musculares convulsivas. A ingestão de vitamina D aumenta bastante a absorção do ião cálcio: daí o seu emprego no tratamento do raquitismo. Um excesso de cálcio também é prejudicial, pois pode provocar calcificações excessivas nos ossos ou nos rins (pedras nos rins).

As necessidades diárias de ingestão variam conforme a faixa etária, sendo maior nos adolescentes. A recomendação diária para adultos (homens e mulheres) é de 1,000 mg/dia, já para os adolescentes é de 1,300 mg/dia [65] – [69].

I.8.3 Doenças causadas por falta ou excesso de Cobre

O cobre é um elemento mineral essencial amplamente distribuído na natureza. Nas suas variadas formas, continua a ser sobejamente usado na nossa sociedade, sendo os sais (sulfato de cobre) utilizados na agricultura como pesticidas, fungicidas e herbicidas.

A deficiência severa em cobre é normalmente associada à anemia, neutropenia (redução da recontagem de neutrófilos nos leucócitos) e anormalidades ósseas, incluindo fracturas. Entretanto, seres vivos com uma deficiência marginal de cobre, isto é, com níveis que não são tão severos, terão propensão para que tenham uma saúde deficitária em formas tão subtis como: menor resistência às infecções, problemas no sistema reprodutor, fadiga geral ou fraqueza e impedimentos na função cerebral.

Uma das doenças conhecidas pela deficiência de cobre é a doença de Menkes. Esta doença é um transtorno hereditário do metabolismo do cobre que produz uma deficiência de cobre e, finalmente, um dano irreversível.

Por outro lado, o excesso do nível de cobre dá envenenamento agudo que só é ocasionado por ingestão acidental de soluções de nitrato de cobre ou sulfato de cobre. Historicamente, o sulfato de cobre foi utilizado com fins terapêuticos como emético, tendo sido abandonado devido à sua potencial toxicidade sistémica. Esta também foi observada após o desbridamento de queimaduras cutâneas com soluções contendo cobre e após a sua introdução inadvertida no sangue durante a hemodiálise. A maioria dos dados da intoxicação aguda com doses elevadas é baseada em casos com intuito suicida (sulfato de cobre) ou consumo acidental de bebidas ou alimentos contaminados por cobre, sendo um tipo de intoxicação raro em Portugal.

No organismo humano o cobre é um componente de vários metaloenzimas importantes no metabolismo das catecolaminas e do ferro, síntese da hemoglobina, colagénio e elastina e remoção de radicais livres. A ingestão média diária de cobre dos adultos é de cerca de 1mg, sendo a dieta a sua fonte primária. É absorvido no estômago e duodeno e transportado pela albumina até ao fígado.

Nos hepatócitos é captado, armazenado (metalotioneína) e segregado para o plasma ou excretado para a bílis. O conteúdo hepático normal varia entre 18 e 45 mg por g de peso seco. Na circulação pós-hepática, a cerulo plasmina (90-95%), a albumina (5-10%), a transcupreína e certos aminoácidos liga dores do cobre são responsáveis pelo seu transporte e distribuição para todos os tecidos com nível sérico normal de 0,120 a 0,145 mg/L. A bílis é a via de excreção normal, desempenhando um papel fundamental na sua homeostase, enquanto a excreção renal é mínima (3% da dose total do cobre absorvido).

Os agentes quelantes são recomendados para a intoxicação grave (complicações hepáticas ou hematológicas), porém a aplicação dos dados da literatura é complexa na ausência de estudos terapêuticos controlados. O CaNa2-EDTA (edetato de cálcio dissódico) são os agentes de escolha na intoxicação grave [70] - [75].

I.8.4 O papel do zinco em processos biológicos

O zinco é um mineral essencial nos processos biológicos, sendo componente de mais de 200 enzimas, e funcionando como parte das reacções enzimáticas mais do que qualquer outro mineral.

Este mineral é facilmente absorvido na parte superior do intestino delgado. O corpo só absorve a quantidade que precisa e descarta o resto através das fezes. No entanto, o zinco é armazenado no fígado, pâncreas, rins, ossos, músculos voluntários, partes dos olhos, próstata, sémen, pele, cabelo e unhas [76].

Existem estudos recentes que relatam a relação dos níveis de zinco com a doença de Alzheimer, em que a sua suplementação é favorável em pacientes idosos para melhorias na memória, comunicação e contacto social [77]. Foi já demonstrado que doses elevadas de magnésio (>/= 0,85 milimoles L^{-1} versus 0,76 milimoles L^{-1}) no sangue correlacionavam-se negativamente com a mortalidade: menos 40% na totalidade de causas de morte, doenças cardiovasculares e 50% nas mortes por cancro. Em indivíduos com magnésio em concentração elevada no sangue, em associação com baixas concentrações de zinco, havia uma diminuição de mortalidade por todas as causas e devido a cancro [78].

Mais estudos parecem ser necessários para demonstrar que as variações no stress oxidativo, e as consequentes inflamações, devidas à variação na concentração de iões metálicos no sangue pode afectar a saúde humana.

A deficiência severa de zinco ocorre com maior frequência em doenças como a cirrose alcoólica e acrodermatite enteropática, sendo que as manifestações clínicas classicamente descritas são: alterações neuropsiquiátricas, dermatite perioral e de extremidades, diarréia e alopecia [79]. Por outro lado a deficiência em zinco pode ocorrer associada á ingestão insuficiente ou à baixa biodisponibilidade desse mineral na dieta alimentar. Estudos referentes á deficiência deste mineral em estereótipos determinaram a existência da melhoria da resposta imune com a suplementação de zinco em pacientes obesos, em crianças com Síndrome de Down e em idosos [95]. Também no Egipto e no Irão o hipogonodismo, com desenvolvimento retardado dos caracteres sexuais secundários foi demonstrado em adolescentes com nanismo nutricional e deficiência de zinco, cuja suplementação desse mineral foi administrada, apresentando posteriormente melhoras na recuperação de peso [79] [80].

I.9. Enquadramento do Trabalho Desenvolvido

O objectivo desta dissertação consiste na investigação e desenvolvimento de sensores em fibra óptica para determinação de espécies químicas envolvidas no organismo humano. As espécies químicas aqui estudadas são oligoelementos, sais minerais, cujas quantidades existentes são determinantes no bom funcionamento dos sistemas circulatório, neurológico, gástrico, etc. tal como foi anteriormente referido na secção I.8. Além destas, outros elementos, cujos níveis detectados no fluido sanguíneo implicam alta toxicidade, provocam sérios riscos para a saúde humana ou até mesmo podendo tornar-se letais. Assim, são estudadas diversas matrizes químicas em sol-gel dopadas com componentes cuja capacidade de reagir e quantificar aquelas espécies é bem conhecida em bibliografia existente.

A configuração dos sensores consiste num interferómetro baseado numa cavidade Fabry-Perot com redes de Bragg.

Desta forma os objectivos específicos pretendidos com este trabalho são os seguintes:

1. Preparação de matrizes químicas em sol-gel, dopadas com componentes capazes de detectar as espécies pretendidas.

2. Caracterização química do(s) filme(s) obtido(s) através de técnicas convencionais de caracterização, dentre as quais destaca-se: Microscopia

electrónica de varrimento (SEM) associada a técnicas de microanálise por Espectroscopia Dispersiva (EDS) e análise por Difracção de Raios-X (RDX).

3. Estudo da sensibilidade cruzada das diferentes membranas às espécies acima referidas assim como da sua reversibilidade de resposta.

4. Avaliação do desempenho das membranas desenvolvidas com variação de temperatura e indice de refracção.

5. Comentário final ao trabalho desenvolvido com a indicação de perspectivas futuras.

CAPITULO II

MATERIAIS E MÉTODOS

II. Materiais e Métodos

A parte experimental deste trabalho englobou as seguintes etapas: ***i)*** preparação de cabeças sensoras, ***ii)*** preparação das membranas sol-gel sensíveis, ***iii)*** revestimento das cabeças sensoras e ***iv)*** pesquisa de espécies químicas relevantes no metabolismo do organismo humano através de análise espectrofotométrica óptica.

Foi necessário vários equipamentos, reagentes e soluções que se passam a identificar e descrever de seguida. Os procedimentos envolvidos no decorrer do trabalho experimental são, também, aqui descritos.

II.1 Equipamento e material

Para caracterização da estrutura sensora foram utilizados dois esquemas de interrogação. Inicialmente utilizou-se o analisador de espectros ópticos (OSA – Optical Spectrum Analyzer), e numa fase posterior recorreu-se a uma técnica interferométrica pseudo-heterodina.

Nesta fase inicial foi utilizada uma fonte de espectro largo (1545~1565 nm), um circulador óptico que permite a análise do sinal reflectido pela cavidade, e um OSA Advantest Q8384 com resolução máxima de 10pm.

Na preparação das fibras ópticas foram utilizados diversos equipamentos de uso rotineiro tais como um Stripper CROMWELL, modelo MILLER, CFS-2, para descarnar o revestimento das fibras, máquinas de corte, FITEL, modelo No. S323 de forma a obter-se um corte preciso perpendicular ao eixo da fibra e uma máquina Fusion Splicer, FITEL, modelo S182PM, para unir as fibras após corte.

Devido à sensibilidade da FBG à deformação, e de modo a evitar algum erro de medição pelo manuseamento da cabeça sensora, esta foi estabilizada numa base em plástico que, por sua vez, foi fixada a um suporte na mesa óptica. Para além da estrutura acima indicada, a montagem compreendia um agitador magnético, CRISON, modelo micro ST 2039 de forma a garantir uma mistura homogénea das amostras. Na preparação das soluções sol-gel utilizou-se um agitador magnético Thermolyne, modelo Climarec 2.

A cura das membranas sol-gel preparadas foi efectuada numa estufa Memmert, modelo U10 854 Schwabach.

As amostras foram submetidas a observação microscópica através da técnica de microscopia de varrimento electrónica (SEM) no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP).

II.2 Reagentes

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas era desionizada, com uma condutividade igual ou inferior a 0.1μS cm^{-1}. Todos os reagentes utilizados, nomeadamente ácido acético (Sigma Aldrich), ácido clorídrico (Merck), ácido sulfúrico (Merck), hidróxido de amónio (Merck), acetato de zinco dihidratado (Panreac), cobre sólido (Sigma-Aldrich), ferro em pó (Sigma-Aldrich), acetato de magnésio tetrahidratado (Sigma Aldrich), nitrato de sódio (Merck), nitrato de potássio (Merck), nitrato de lítio (Merck), cloreto de sódio (Merck), peróxido de hidrogénio (Merck) e etanol (Merck) eram de qualidade *p.a.*, sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

Para a preparação das matrizes sol-gel usaram-se como mediadores: 3-aminopropiltrietoxisilano (APTEOS) (ABCR GmbH & Co.KG), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (BDH Chemicals, Lda.) e 8-quinolinol (QOH) (Sigma Aldrich) e como precursores metacriloxipropriltrimetoxisilano (MAPTMS) (Aldrich), Neodymium (III) trifluoromethanosulfonate (NTFMS) (Aldrich), ácido metacrílico (MAAS) (Merck), etanol (Merck) e ácido clorídrico 0.1 M (Merck).

Foram utilizadas ainda soluções com diferentes percentagens de etileno-glicol (Merck) com o intuito de comparar o efeito do índice de refracção das soluções das espécies químicas preparadas na resposta final. As amostras líquidas foram caracterizadas através do refractómetro de Abbe.

As soluções tampão de pH eram standard e foram adquiridas junto do fornecedor (Panreac). Estas soluções tinham pH compreendido entre 2 e 12 (escala de Sorensen).

II.3 Soluções

Para avaliar o desempenho das diferentes membranas sol-gel, foi necessário a preparação de várias soluções padrão de ácido acético, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, hidróxido de amónio, zinco (II), cobre (II), ferro (III), acetato de magnésio tetrahidratado, nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de lítio, cloreto de sódio, peróxido de hidrogénio e etanol.

As soluções padrão utilizadas no sistema foram preparadas a partir de uma solução *stock*, preparada por pesagem rigorosa do sólido correspondente e posterior dissolução e diluição em água desionizada.

A solução *stock* das soluções acima referidas tinha uma concentração de 1,00 mol L^{-1}, dissolvendo ou diluindo uma quantidade correspondente em água desionizada. Assim para a preparação das soluções *stock* de ácido acético, ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, peróxido de hidrogénio, etanol e hidróxido de amónio diluíram-se respectivamente 5,719 mL, 0,836 mL, 6,920 mL, 5,611 mL, 3,030 mL, 5,831 mL e 3,505 mL dos líquidos correspondentes em água desionizada, perfazendo o volume a 100,00 mL.

As soluções *stock* dos reagentes sólidos, como o acetato de zinco dihidratado, acetato de magnésio tetrahidratado, nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de lítio e cloreto de sódio foram preparadas com uma concentração igual a ≈1,00 mol L^{-1} para nitrato de sódio, nitrato de potássio e cloreto de sódio, de 0,050 mol L^{-1} para acetato de magnésio tetrahidratado, de ≈0,50 mol L^{-1} para nitrato de lítio, dissolvendo respectivamente 2,195 g acetato de zinco di-hidratado, 1,022 g, 8,499 g, 10,111 g, 6,895 g e 1,000 g dos sólidos correspondentes e perfazendo o volume, com água desionizada, a 100,00 mL.

As soluções *stock* de cobre (II), ferro (III) foram preparadas oxidando ferro (0,100 g) e cobre (3,175 g) sólidos em ácido nítrico até à evaporação, diluindo posteriormente em água desionizada a 100,00 mL, obtendo-se uma concentração igual a ≈0,0178 mol L^{-1} e ≈0,500 mol L^{-1}, respectivamente. A partir desta, obtiveram-se as soluções padrão de menor concentração, compreendidas entre $1{,}00\times10^{-4}$ mol L^{-1} e 1,00 mol L^{-1}.

Para isso, procedeu-se à diluição de um volume apropriado da solução *stock*, em água desionizada em balões volumétricos.
Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com diferentes capacidades. Para as medições de volumes rigorosos ou superiores a 5,00 mL foi usada uma pipeta automática Brand GMBH certificada ISO 9001.14001 de volume regulável. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas Gilson, modelos P200, P1000 e P5000, de volume regulável.

As pesagens foram feitas numa balança KERN, modelo ABT 320-4M, com precisão igual a 0,00001 g.

O controlo do valor de pH das soluções tampão utilizadas ao longo do trabalho foi realizado com um eléctrodo de vidro combinado, ligado a um pH meter Cole-Parmer, modelo # 59002-40. De igual forma a temperatura era monitorizada em paralelo com as medições das amostras, submetendo um sensor de temperatura (Cole-Parmer) sendo registadas as temperaturas de 5 em 5 minutos.

II.4 Preparação das cabeças sensoras

A cabeça sensora era constituída por uma rede de Bragg de baixa reflectividade (R≈4%) com comprimento de onda central de $\lambda_B \approx$ 1550nm, inscrita no núcleo de uma fibra SMF-28, a ≈2 cm da ponta da fibra (Figura 1), formando assim uma cavidade de Fabry-Perot com a reflexão da ponta da fibra (reflexão de Fresnel) tal como foi referido anteriormente.

O extremo da fibra teve um corte preciso, perpendicular à direcção de propagação da luz, de modo a obter-se ≈4% da reflexão de Fresnel. A fibra SMF-28 era constituída por um núcleo simples de germanosilicato (diâmetro 8.2 μm), 3% GeO_2 e foi previamente hidrogenada a frio a uma pressão de 100 atm.

A FBG foi fabricada utilizando uma máscara difractiva de fase com 10 mm de comprimento (Λ=1067 nm), iluminada com um laser do tipo KrF (krypton fluoride) a operar no comprimento de onda de 248 nm.

II.5 Preparação das membranas por sol-gel

O objectivo desta etapa incidiu no desenvolvimento de membranas sensíveis a várias espécies químicas existentes no sistema orgânico.
A preparação do sol-gel consistiu no processo básico que envolveu a hidrólise e condensação/polimerização de uma solução de alcóxidos, seguido de um programa de temperaturas que controlou o processo de densificação.

A produção das membranas consistiu em 2 etapas: 1ª etapa, a estabilização, e 2ª etapa, pré-hidrólise, sendo introduzidos diferentes mediadores sensíveis/reactivos às espécies acima referidas. Na 1ª etapa adicionaram-se Etanol (EtOH), o mediador e ácido metacrílico (MAAS) gota a gota e em agitação contínua durante 15 minutos, de acordo com a Tabela II.1. A 2ª etapa, consistiu na adição de Etanol (EtOH), metacriloxipropiltrimetoxisilano (MAPTMS) e ácido clorídrico (HCl) (0.1 $mol.L^{-1}$) gota a gota e em agitação durante cerca de 20 minutos. No final as duas soluções foram misturadas e deixou-se em agitação durante mais 20 minutos à temperatura ambiente.

A razão molar resultante para cada tipo de membrana sol-gel preparada é representada na Tabela II.1.

Tabela II.1 – Razão molar de cada reagente nas diferentes membranas sol-gel.

Mediador	**Matriz sol-gel (%)**		
	FPA	**FPB**	**FPC**
APTEOS	0,27	0,31	0,31
NTFMS	0,05	-	-
EDTA (2%)	-	0,08	-
QOH (1%)	-	-	0,08

As soluções de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e QOH (8-quinolinol) foram preparadas diluindo 0,002 e 0,001 g do sólido respectivo.

II.6 Revestimento das cabeças sensoras

A cabeça sensora foi cortada até cerca de 2 cm do *grating* para se obter um espectro com franjas bem definidas.
A ponta da fibra foi limpa previamente com água desionizada e depois com etanol. Seguidamente foi emergida na solução sol-gel preparada em II.5 durante 1 minuto, retirando da solução e deixando secar durante 2 minutos, efectuando-se a imersão da ponta duas vezes. De seguida foi levada à estufa durante 10 minutos a 120ºC, repetindo-se todo o procedimento mais uma vez.
Finalmente as fibras foram curadas à mesma temperatura durante cerca de 4 horas. No final, o filme apresentava boa transparência e não foram observadas fissuras aparentes.

A Figura II.1 mostra um esquema semelhante ao equipamento para dip-coating utilizado no revestimento da fibra. O substrato é suspenso no suporte do equipamento e imerso na solução sol-gel colocada estrategicamente debaixo do mesmo.

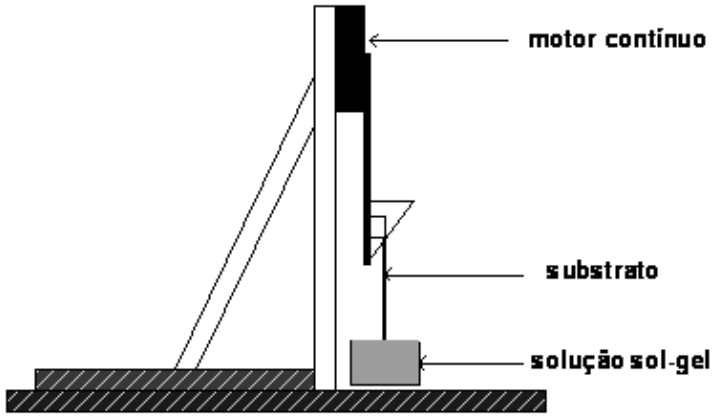


Figura II.1 – Equipamento para dip-coating.

A Figura I.19 representa em pormenor a imersão do substrato na solução de revestimento do sensor, podendo verificar-se a secagem quase instantânea do solvente volátil à temperatura ambiente após a retirada da ponta da fibra.

O aspecto global do sistema utilizado encontra-se representado na Figura II.2

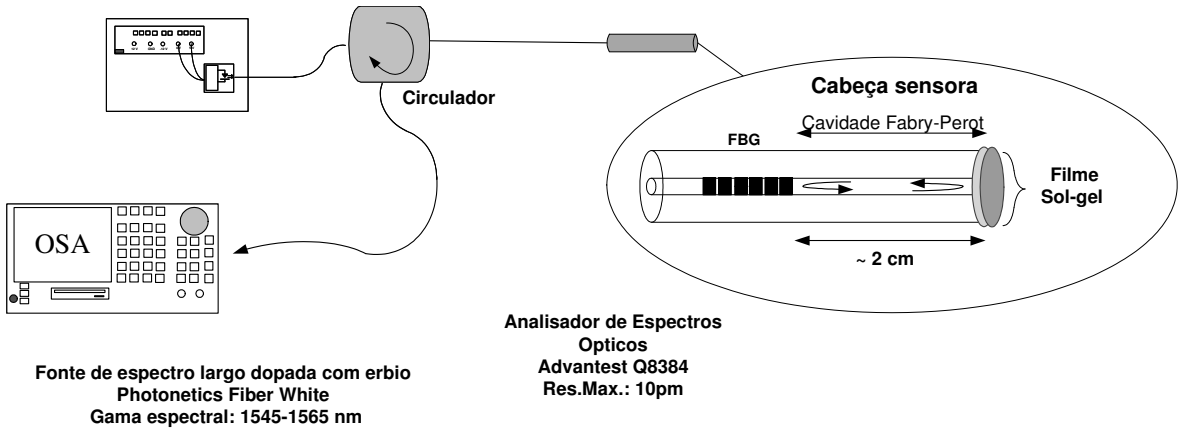


Figura II.2 – Montagem da estrutura sensora.

II.7 Caracterização da membrana sol-gel dopada com APTEOS

Foi utilizada uma combinação de técnicas analíticas na análise da membrana produzida com o precursor APTEOS, FPA, como exemplo das membranas preparadas em II.5. Foram utilizadas neste estudo técnicas convencionais de caracterização, dentre as quais destacamos: Microscopia electrónica de varrimento (SEM) associada a técnicas de microanálise por Espectroscopia Dispersiva (EDS) e análise por Difracção de Raios-X (RDX), permitindo identificar planos preferenciais de cristalização num determinado material. Serão discutidos os resultados obtidos através destas técnicas utilizadas na secção III.1.

II.8 Pesquisa de espécies químicas

As medições efectuadas consistiram de um procedimento sistemático de imersão de diferentes concentrações dos analitos preparados em II.3, resultando na variação de fase e visibilidade no interferómetro de Fabry-Perot. A ponta da fibra (revestida) foi introduzida nas soluções de analito fazendo-se variar a concentração do mesmo. O

tempo de leitura de cada amostra era cerca de 4 minutos de forma a poder atingir-se o equilíbrio da reacção.

A cabeça sensora foi interrogada com um OSA de acordo com a Figura II.3. A cavidade interferométrica demonstrou ter variações de visibilidade e de fase quando as concentrações dos analitos eram modificadas.

As leituras eram controladas ao longo do tempo de modo a garantir exactamente as mesmas condições entre medidas.

A Figura II.3 apresenta a montagem experimental do sistema sensor de fibra óptica para detecção das espécies químicas referidas.

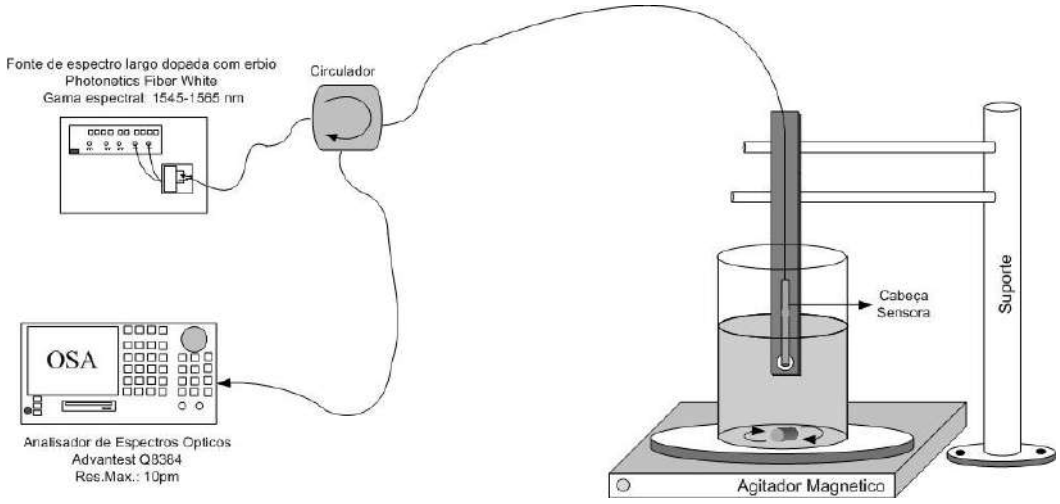


Figura II.3 – Montagem experimental do sistema sensor desenvolvido.

Quando interrogada com o OSA, a cavidade apresenta um padrão de interferência sensível à concentração da espécie estudada. O aumento gradual do volume do analito produzia o deslocamento em comprimento de onda das franjas interferométricas.

Esta variação traduz-se numa alteração na fase do mesmo. Posteriormente será verificado este comportamento de forma ilustrativa através de gráficos na secção III.

II.9 Controlo da variação de temperatura ambiente na medição de amostras

Conforme foi referido na secção I.3, os sensores de Bragg funcionam em face da variação do comprimento de onda de ressonância induzido por factores externos (pressão e temperatura, p.e.) [31], sendo desta forma sensível a estes parâmetros.
Com o intuito de monitorizar a influencia da variação de temperatura ambiente paralelamente à leitura das concentrações das amostras, foi introduzido um segundo sensor de Bragg com comprimento de onda não coincidente com o dos sensores revestidos preparados em II.4, de forma a ser visualizada a variação do comprimento de onda correspondente a oscilações da temperatura ambiente.
A Figura II.4 apresenta o esquema de um acoplador com uma rede de Bragg com comprimento de onda de 1548 nm formando uma cavidade de Fabry-Perot entre a mesma e a ponta da fibra sem revestimento químico.

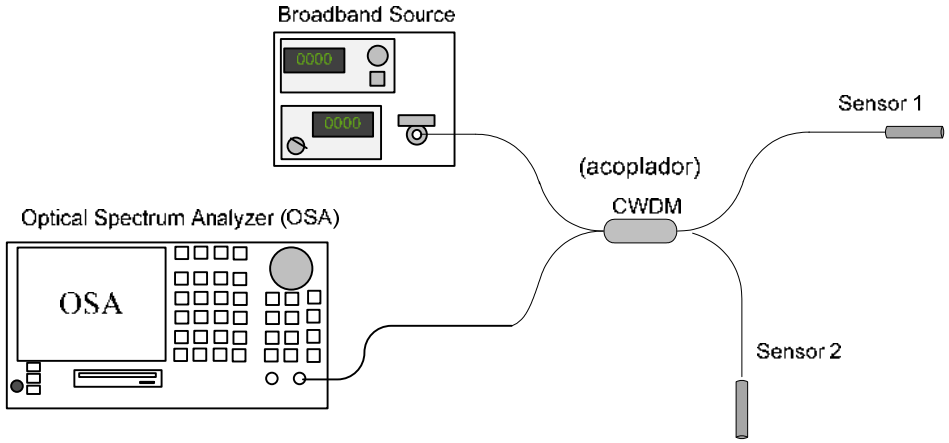


Figura II.4 – Esquema experimental do sistema sensor desenvolvido com uma rede de Bragg (λ=1548 nm) e o sensor químico.

Independentemente do estudo com acoplamento de um FBG sem deposição, foi também investigada a influência da temperatura num dos sensores revestidos. Para isso utilizou-se a mesma estrutura da montagem da Figura II.3, fornecendo calor através de uma placa de aquecimento, com incrementos de temperatura de cerca de ≈ 0,2 ºC. Foi ainda associado um termómetro com resolução 0,1ºC de forma a monitorizar a variação de temperatura durante o estudo.

CAPITULO III

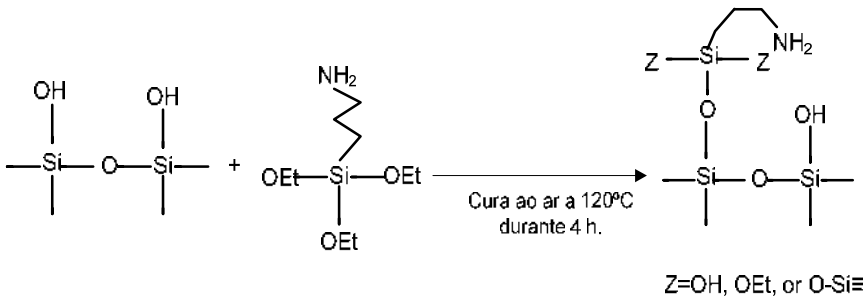
RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. Resultados e Discussão

No sentido de implementar um sistema sensor em fibra óptica para a determinação espectroscópica óptica de diferentes espécies químicas, foram construídos vários sensores em fibra óptica através da técnica sol-gel. Estes distinguiam-se pelas matrizes mediadores que continham (secção II.5). A inclusão destes mediadores teve por objectivo aumentar a sensibilidade e a selectividade das determinações, para que as análises originassem valores exactos.

Cada uma das membranas em estudo foi avaliada em separado, tendo-se efectuado ensaios de caracterização/optimização do sistema proposto. A montagem utilizada ao longo deste trabalho era a apresentada no esquema da secção II.7 (Figura II.4).

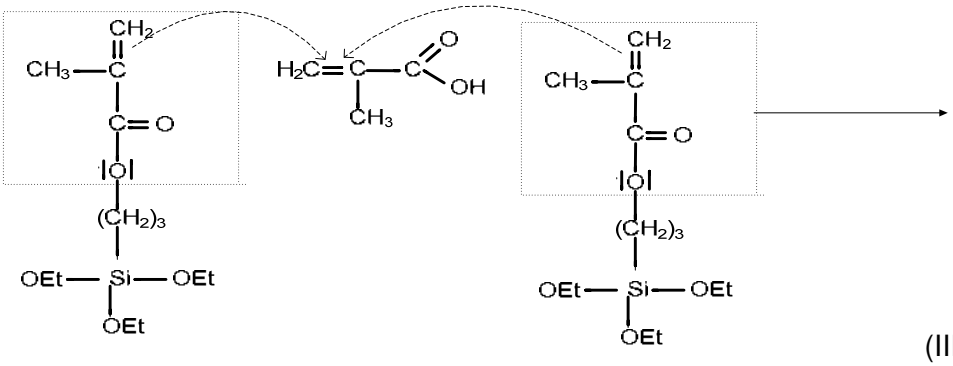
A modificação química da sílica pelo 3-aminopropiltrietoxisilano (APTEOS) foi anteriormente descrita [81], e envolve duas etapas sucessivas que são representadas nas equações seguintes. Durante a primeira etapa, o APTEOS reage com a superfície de sílica, os grupos hidroxilo na superfície da sílica (grupos silanol) condensam com os grupos etoxi do APTEOS, libertando etanol no meio. Esta reacção é esquematicamente representada no esquema abaixo (III.1).



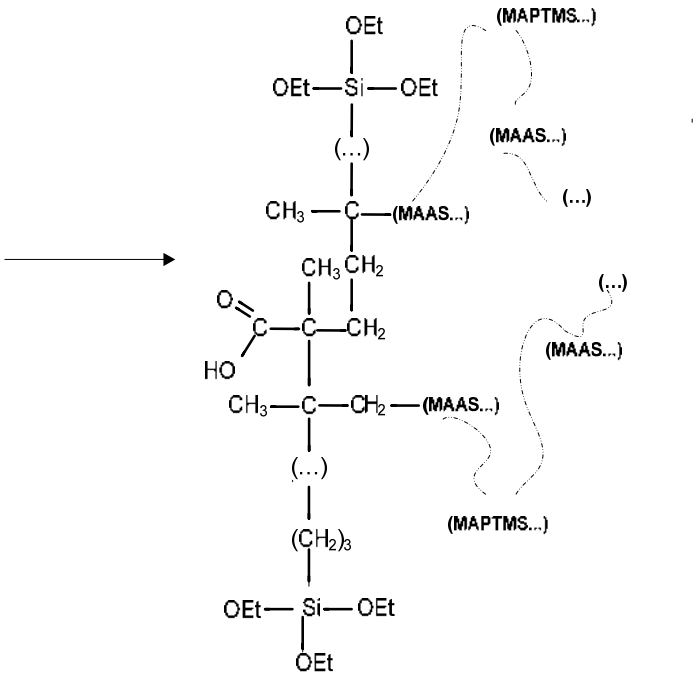
(III.1)

Simultaneamente, a presença dos grupos acrílato do MAPTMS e do ácido metacrílico irão garantir a formação de outra rede com grupos carboxílicos (Esquemas III.2 e III.3). Esta etapa trouxe um aumento significativo à estabilidade da camada depositada. Os iões carboxílicos são mais estáveis do que a dissociação dos álcoois.

A carga negativa que fica quando os protões deixam os grupos carboxílicos é partilhada entre os dois átomos de oxigénio numa estrutura ressonante. Esta rede formada entre os grupos acrílicos do MAPTMS e do ácido metacrílico é rapidamente expandida em todas as direcções da superfície revestida.

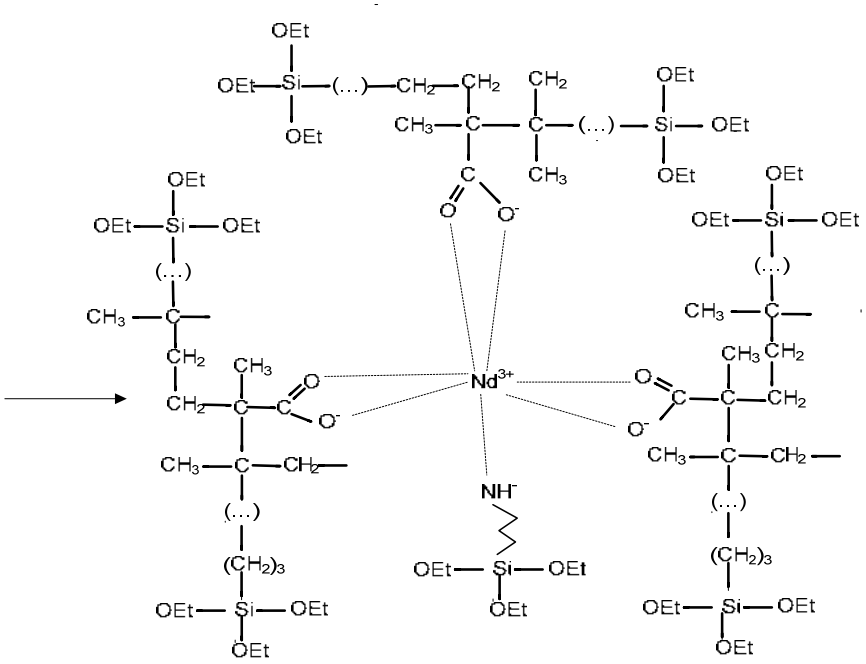


(III.2)



É esperado que ambos os grupos amino e carboxílico mantenham os átomos de neodímio ligados à superfície da fibra através da interacção com as orbitais metálicas. Os poros resultantes em toda a matriz são pequenos, mas permitem a difusão do neodímio (Esquema II.3). Esta contribuição introduziu características na matriz de forma a melhorar a densidade e as propriedades mecânicas e fotoluminescentes da camada devido às ligações estabelecidas entre as próprias moléculas.

Apesar do neodímio normalmente produzir cor no vidro, a pequena quantidade deste elemento na composição final, permitiu a obtenção um vidro transparente a baixas temperaturas.



(III.3)

III.1 Membrana sol-gel dopada com APTEOS

O parâmetro químico mais investigado com fibras ópticas é indubitavelmente o pH. Este tipo de sensor contém muitas vantagens sob o tradicional eléctrodo de pH, tal como imunidade ao campo electromagnético, ausência de contacto eléctrico e alta capacidade de miniaturização, tal como mencionado no capitulo I. Estas características fazem deste tipo de sensor um sensor muito promissor para a aplicação biomédica. Por outro lado, a abordagem óptica para detecção de pH tem sido caracterizada por certas desvantagens, tais como gamas de trabalho limitadas e a presença de interferências provenientes da força iónica.

Para a determinação da acidez do sangue, para a qual existem sensores já disponíveis no mercado, a gama de pH que tem que ser aplicada é muito estreita (gama de pH=7.0-7.5), sendo pois limitadas as variações de força iónica.

O componente 3-aminopropiltrietoxisilano (APTEOS) contêm grupos amino que permitem o acoplamento de outros grupos funcionais à estrutura base -R-SiO3. Por este facto este composto tem sido um dos mais largamente estudados e aplicados. O APTEOS tem sido empregue em muitas aplicações da química moderna e da tecnologia para modificação química de vários revestimentos superficiais [82].

III.1.1 Difracção Raio-X

Em determinadas situações, a análise por difracção de raio-X é limitada devido ao facto da estrutura conter reduzida área de secção com deposições de filme em pequena quantidade (no caso da ponta da fibra). Como alternativa recorreu-se à deposição numa lâmina de vidro e quantificou-se a percentagem das fases cristalinas presentes na microestrutura da matriz sol-gel. A Figura III.1 ilustra o diafractograma de um substrato de vidro revestido pela matriz tipo FPA. A largura dos três picos observados demonstra a pouca cristalinidade do material [83]. Esta baixa cristalinidade do material é esperada, pois a temperatura aplicada ao tratamento foi muito baixa (≈120ºC) para promover a evaporação da matéria orgânica dos precursores e a cristalização da fase da SiO_2.

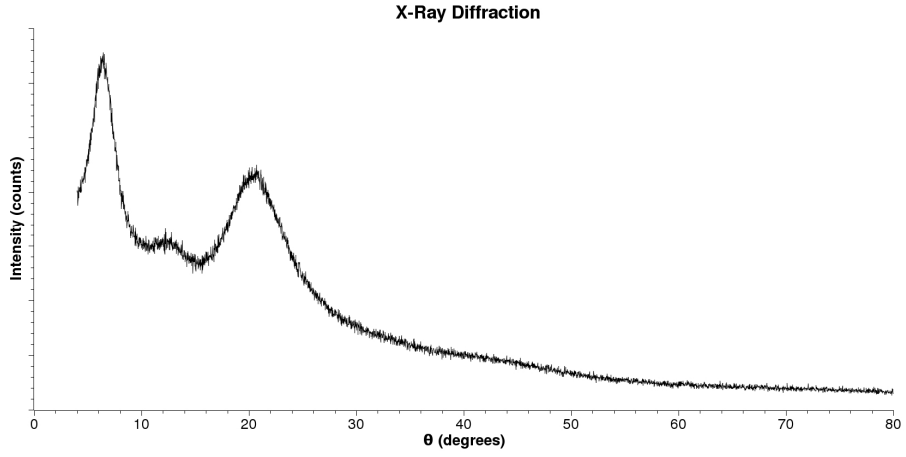


Figura III.1 - Difracção raio-X do substrato em fibra óptica revestido, FPA.

III.1.2 Microscopia de Varrimento Electrónico (SEM) e Espectroscopia dispersiva (EDS)

O aspecto da fibra revestida com a membrana FPA e uma fibra não revestida foi analisado por SEM para a descrição da sua morfologia.

A Figura III.3 mostra as micrografias SEM de uma fibra de vidro não revestida (a) e de uma revestida pela solução sol-gel precursora e tratada a 120ºC durante cerca de 4 horas (b). Como se pode verificar, a superfície da segunda, apresenta uma rugosidade apreciável quando comparada com a que não foi revestida. Este facto pode revelar algum sucesso relativamente à deposição do sol-gel na fibra, uma vez que esta tem apenas uma espessura correspondente a 150 μm e a rugosidade apesar de irregular não ultrapassa mais que 1-2 μm acima da superfície.

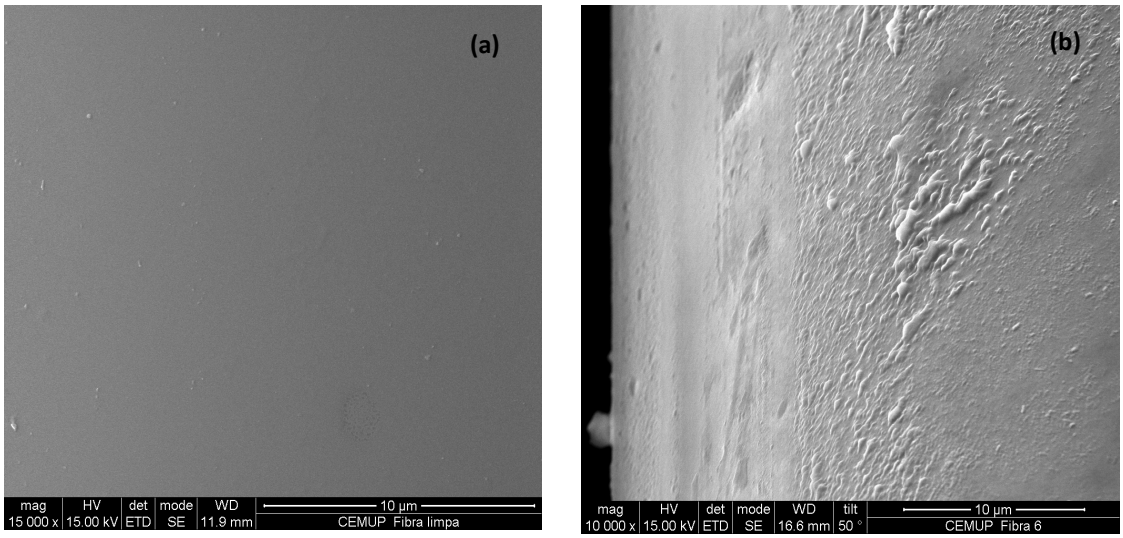


Figura III.2 – Microscopia de varrimento electrónico da fibra sem revestimento (a) e da matriz sol-gel dopada com APTEOS, FPA (b).

Observando os mesmos espectros SEM, verificou-se a não existência de microporos observáveis no interior da matriz de vidro densa, o que afecta a densidade e transparência do vidro. Durante a etapa de condensação, os grupos hidroxilos da sílica (grupos silanol) condensam com os grupos etoxi do APTEOS, libertando etanol. Por outro lado, na segunda etapa da síntese, durante o aquecimento, em que é desejado um aumento do grau de condensação, os grupos hidroxilo são libertados na rede na forma de vapor de água (evaporação de água).

A água absorvida na superfície da sílica muitas vezes leva a um aumento do grau da extensão da condensação entre as moléculas adjacentes de APTEOS e pode paralelamente gerar uma polimerização hierárquica do agente. Isto poderá contribuir para um aumento da estabilidade da camada depositada. Através da análise de dispersão electrónica poder-se-á identificar os elementos químicos elementares presentes na amostra dos materiais. Analisando os espectros da Figura III.2, verifica-se a presença predominante do silício, oxigénio e carbono, sendo os picos subjacentes ao silício e oxigénio responsáveis pela presença de sódio, potássio, magnésio e cálcio, correspondentes apenas à composição do vidro. O ouro detectado no espectro EDS resulta da deposição de uma camada deste elemento para facilitar a observação das superfícies estudadas por SEM.

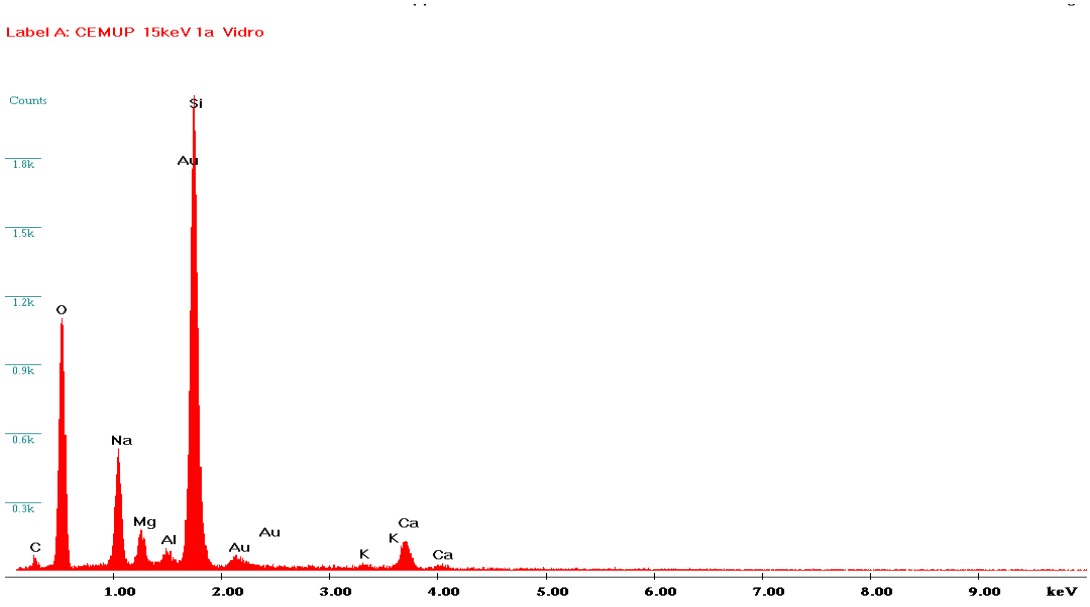


Figura III.3 - Espectro de EDS da matriz sol-gel dopada com APTEOS (FPA).

III.1.3 Desempenho da membrana sol-gel dopada com APTEOS

As experiências foram feitas em condições de temperatura controlada a ≈ 25 ± 2 ºC. A variação com a temperatura é analisada posteriormente. Foram comparados os espectros de análise óptica da fibra revestida e da fibra não revestida, resultando

numa mudança importante de comprimento de onda das franjas interferométricas da cavidade de Fabry-Perot, conforme Figura III.4.

Esta variação foi consequência da alteração do coeficiente de reflexão óptica na interface da membrana depositada na ponta da fibra, o que era esperado uma vez que a interface membrana-ar tem agora um índice de refracção diferente do que tinha anteriormente sem revestimento da mesma.

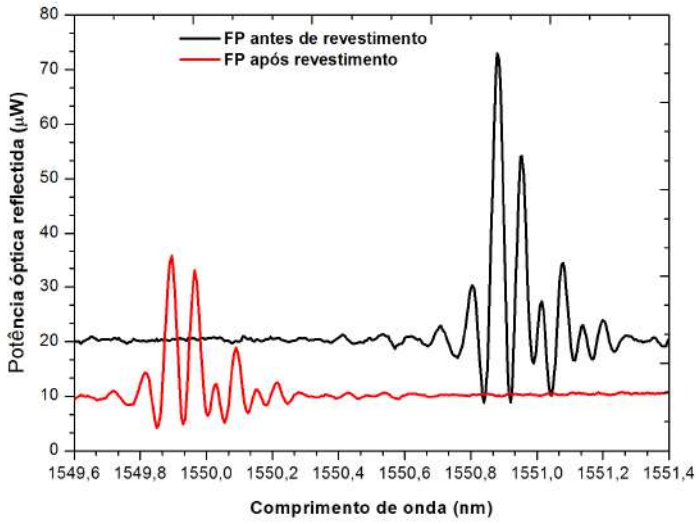


Figura III.4 – Espectro da cavidade de Fabry-Pérot antes e após revestimento com a membrana sol-gel.

Da mesma forma o comportamento de uma cavidade de Fabry-Perot sem revestimento (FP1) adquirirá um resultado em valores de resposta de $\Delta\lambda$ praticamente constantes, na ordem de 2,5 picometros quando submerso nas soluções de analito, como por exemplo soluções de ácido acético, conforme é ilustrado na Figura III.5. A variação de visibilidade resultante, também de pequena amplitude, deve-se à modificação do índice de refracção externo quando alteradas as concentrações de ácido.

A resposta resultante, conforme seria esperado, indica uma inércia e impermeabilidade da superfície de sílica ao meio externo contendo protões H^+. Por outro lado, foram comparadas as respostas com o mesmo ácido para a fibra contendo revestimento, FPA.

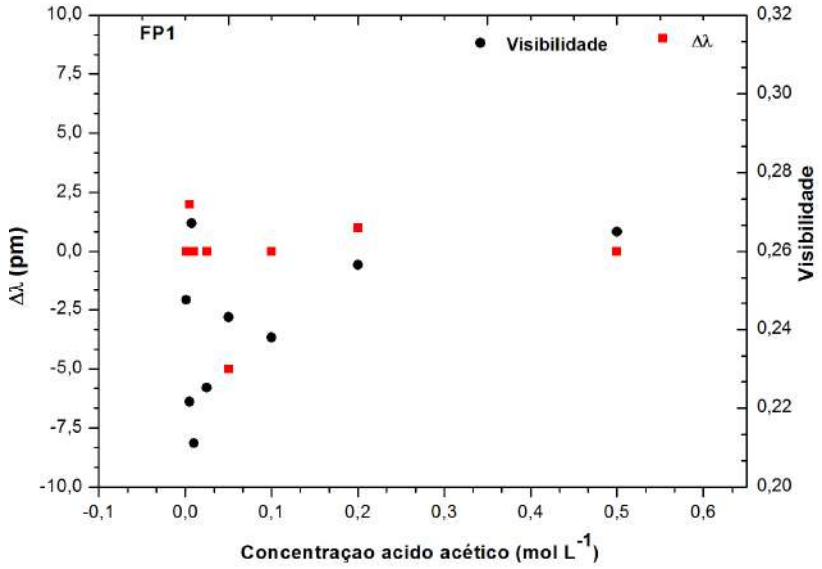


Figura III.5 - Fibra sem revestimento: sensibilidade em comprimento de onda e visibilidade quando submergida a ponta da fibra FP1 em soluções de ácido acético.

Para caracterizar o comportamento da cabeça sensora, FPA (membrana sol-gel dopada com APTEOS), em função da concentração de ácidos, submergiu-se a ponta da fibra em soluções com concentrações compreendidas entre 0,10 e 1,00 mol L^{-1} de forma periódica de modo a variar gradualmente a concentração de analito.

A Figura III.6 mostra um espectro típico da membrana FPA, quando submergida em ácido acético, em duas concentrações distintas (0,60 e 1,00 mol L^{-1}).
Como se pode observar a influência do analito provoca um desvio no espectro na ordem de alguns nanómetros; este parâmetro ($\Delta\lambda$), assim como a variação de visibilidade foram as quantidades mensuráveis usadas para caracterizar as soluções em termos de concentração do ácido.

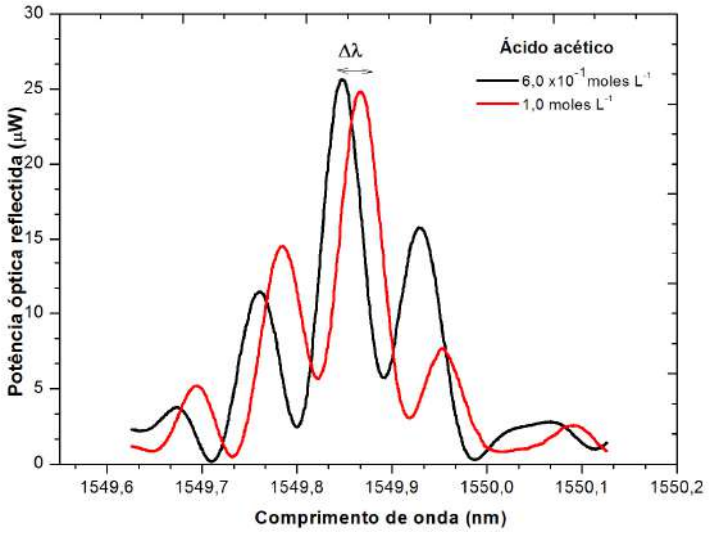


Figura III.6 - Franjas interferométricas resultantes da imersão da estrutura sensora em duas concentrações distintas (0,6 e 1 mol L^{-1}).

Quando interrogada com o OSA, a cavidade apresenta um padrão de interferência sensível à concentração do ácido. O aumento gradual da concentração do analito produz o deslocamento em comprimento de onda das franjas interferométricas. Esta variação traduz-se numa alteração na fase do mesmo. O aumento da concentração dos ácidos produz expansão da matriz sol-gel, que é proporcional à concentração do analito. Este fenómeno conduz à alteração do índice de refracção da membrana, alterando consequentemente o percurso óptico do sinal.

Como já foi referido anteriormente na secção I.3.3 [37], esta configuração, é sensível a variações de índice de refracção. Para uma avaliação mais rigorosa da resposta a este parâmetro e, com recurso a um refractómetro de Abbe, foi medido o índice de refracção de cada concentração. As diferentes soluções apresentam uma gama de variação entre 1.33 e 1.35 RIU (RIU – Refractive Índex Unit).

Com esta finalidade, foi estudado o comportamento do sensor à variação do índice de refracção externo. Para tal foram preparadas soluções de água com etileno glicol previamente caracterizadas em índice de refracção, como foi descrito na secção II.2.

A Figura III.7 ilustra o resultado obtido referente à mudança de visibilidade das franjas quando a cabeça sensora, FPA, é submersa nas amostras de água combinadas com diferentes percentagens de etileno glicol. Foi observado que as alterações efectuadas no índice de refracção externo para as concentrações de ácido preparadas não tiveram efeito no comprimento de onda dos picos e apenas foi visível um efeito residual na visibilidade do padrão das franjas interferométricas.

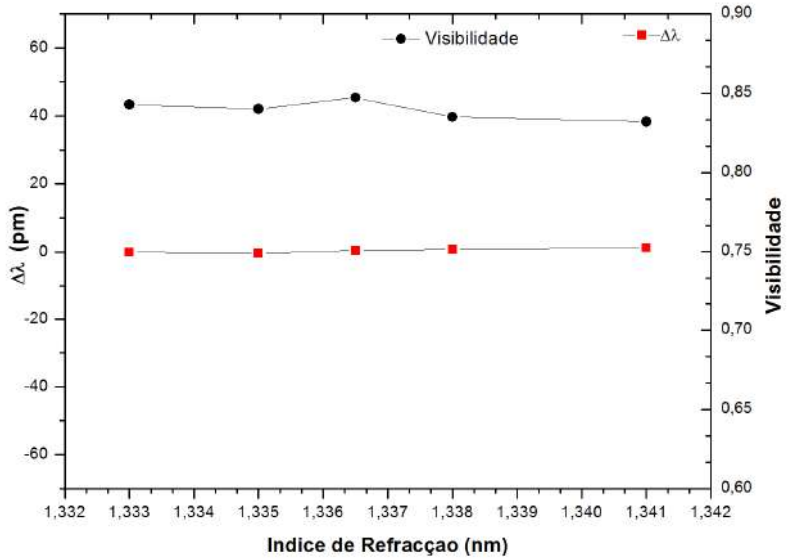


Figura III.7 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas em função do índice de refracçãodo meio externo externo (soluções de etileno-glicol).

A cabeça sensora, FPA funcionará como transdutor de uma resposta química específica, neste caso, detecta modificações da concentração de hidrogénio em soluções aquosas e, consequentemente, na escala ácida de pH. Evidencia-se, desta forma uma resposta que parece ser selectiva, devido ao facto de quando a cabeça sensora é colocada em água com diferentes percentagens de etileno glicol correspondentes a índices de refracção diferentes e na gama dos índices de refracção das soluções ácidas preparadas, não se obter o mesmo tipo de resposta. O mesmo comportamento foi obtido com soluções de outros elementos químicos, como por exemplo lítio, sódio e potássio, limitando desta forma a selectividade da membrana a H^+ do grupo dos alcalino metálicos estudados neste trabalho.

Analisando a Figura III.7, verifica-se que $\Delta\lambda$ e a visibilidade não sofrem variação significativa quando a membrana é colocada em meio aquoso com índices de refracção diferentes (≈1,33 a ≈1,34). Isto significa que a resposta obtida na Figura III.6, é independente do índice de refracção externo.

Todas as soluções preparadas na secção II.3 e utilizadas em medições posteriores enquadravam a gama de valores de índice de refracção anteriormente referida uma vez que as soluções se encontravam num estado muito diluído.

Posteriormente são ilustrados através das Figuras III.8 a III.10, as respostas obtidas quando utilizadas para análise os ácidos mencionados na secção II.3. Tal como era esperado e foi referido previamente, a presença das diferentes concentrações dos ácidos, introduziram uma variação significativa na interface da estrutura da membrana, provocando uma mudança no comprimento de onda e no padrão das franjas interferométricas, observando-se igualmente uma influência na visibilidade das mesmas. Este comportamento possibilitou uma forma de quantificação das concentrações dos analitos.

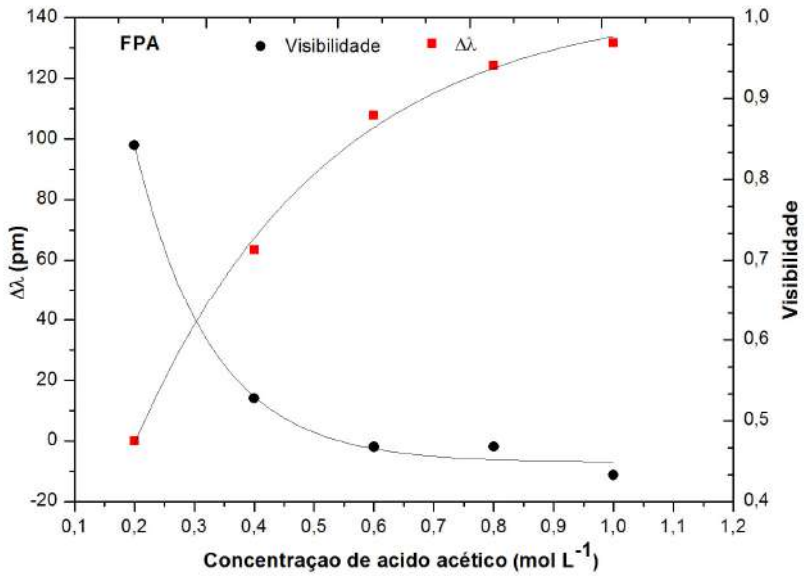


Figura III.8 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Ácido Acético.

No gráfico da Figura III.8 encontra-se representada a variação de comprimento de onda e da visibilidade dos espectros para uma gama de concentrações de ácido

acético entre 0,2 e 1,0 mol L^{-1}. A tendência da curva representando $\Delta\lambda$ é uma função logaritímica e a função da visibilidade segue uma exponencial decrescente.

A Figura III.9 apresenta o desvio em comprimento de onda e variação de visibilidade quando são adicionadas diferentes concentrações de ácido clorídrico; tal como se pode verificar, enquanto o desvio de comprimento de onda aumenta com a concentração de ácido clorídrico, a visibilidade comporta-se de forma aleatória.

A função que representa a variação da concentração com o deslocamento do comprimento de onda do pico de máxima intensidade ($\Delta\lambda$) é exponencial. Este facto salienta a alteração do percurso óptico da luz. Neste caso o mensurando, ou a variação de concentração de analito especifico (H^+), tal como já foi dito anteriormente, actua sobre a ponta da fibra (um dos espelhos da cavidade de Fabry-Perot), provocando um deslocamento interferométrico, mas mantendo a forma do espectro. Este comportamento é diferente ao observado para o ácido acético.

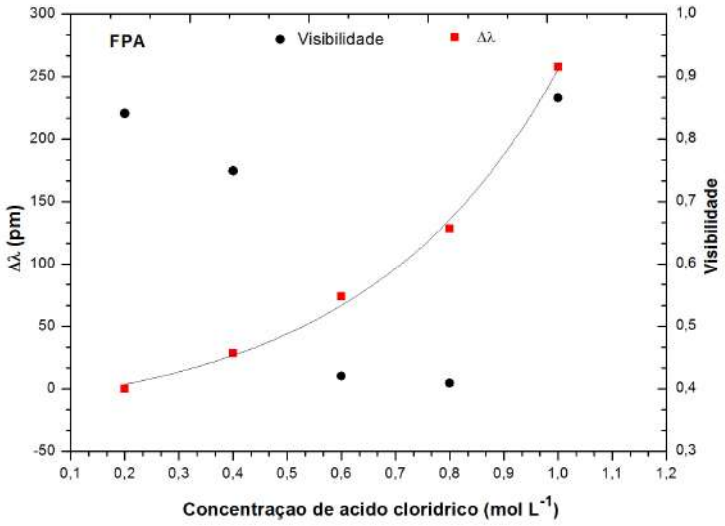


Figura III.9 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Ácido Clorídrico.

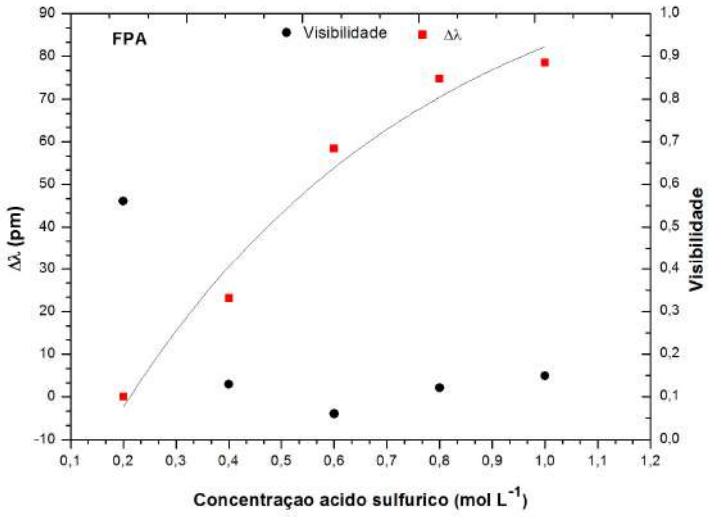


Figura III.10 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Ácido Sulfúrico.

Salienta-se, mais uma vez, o facto de quando a ponta da fibra é imersa numa nova solução ácida com concentração diferente (ácido clorídrico ou sulfúrico) o comprimento de onda das franjas interferométricas varia novamente, como que se existisse um diferente coeficiente de reflexão óptico. Este comportamento deve-se à mudança da permissividade dieléctrica de cada tipo de matriz sol-gel que, por sua vez, altera o percurso óptico da luz, quer por expansão da membrana sensora quer por modificação da estrutura química da mesma quando o analito (H^+) entra em contacto com a membrana.

A Figura III.10 mostra a resposta da visibilidade das franjas e da variação do comprimento de onda em função da concentração de ácido sulfúrico, neste caso, a evolução de ambas as curvas é semelhante às observadas no caso das medições com o ácido acético. A diferença da tendência da curva para o caso do ácido clorídrico não é bem entendida no momento, devendo ser estudada futuramente, sendo uma possivel explicação para este comportamento a formação de diferentes estruturas dependentes da geometria do anião.

Tabela III.1 Características de funcionamento da membrana sol-gel dopada com APTEOS, FPA para ácidos.

Características	**Ácido Clorídrico**	**Ácido Acético**	**Ácido Sulfúrico**
Equação da função	$y = A_1 \times \exp(-x/t_1) + y_0$		
Y_0	-28,181 ± 17,120	145,924 ± 7,585	110,974 ± 36,7972
A_1	18,286 ± 8,194	-274,184 ± 17,322	-159,858 ± 22,1249
t_1	-0,3647 ± 0,05338	0,3203 ± 0,04382	0,5826 ± 0,3466
$R^2_{ajustado}$	0,9939	0,9938	0,9516

Tendo por objectivo comparar o desempenho da membrana sol-gel dopada com APTEOS, apresentam-se de seguida as características gerais de funcionamento (Tabela III.1). Os resultados obtidos revelam uma relação $R^2_{ajustado}$ que representa o coeficiente de determinação ajustado da aproximação exponencial calculada. Este coeficiente foi sempre superior a 0,99 para o ácido clorídrico e acético, sendo inferior quando o analito correspondia ao ácido sulfúrico.

Por outro lado, com o intuito de abranger a escala total de pH, para as medidas alcalinas, foram estudadas dois tipos de soluções básicas. Soluções de amónia e de hidróxido de sódio, tal como se pode analisar através das Figuras III.11 e III.12.

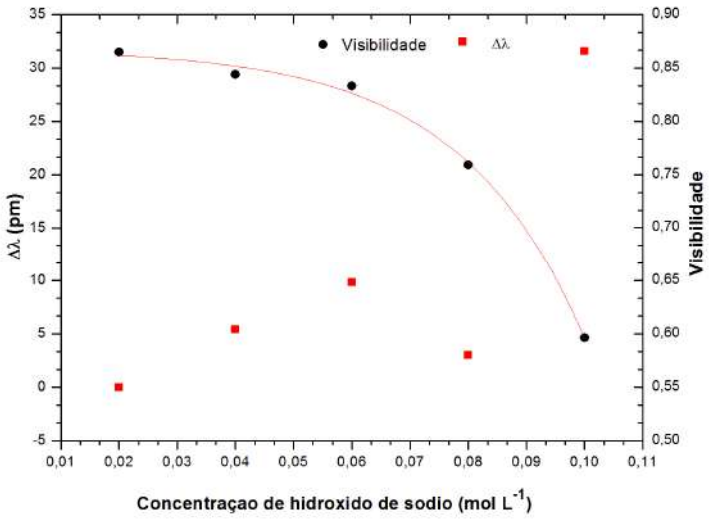


Figura III.11 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Hidróxido de Sódio.

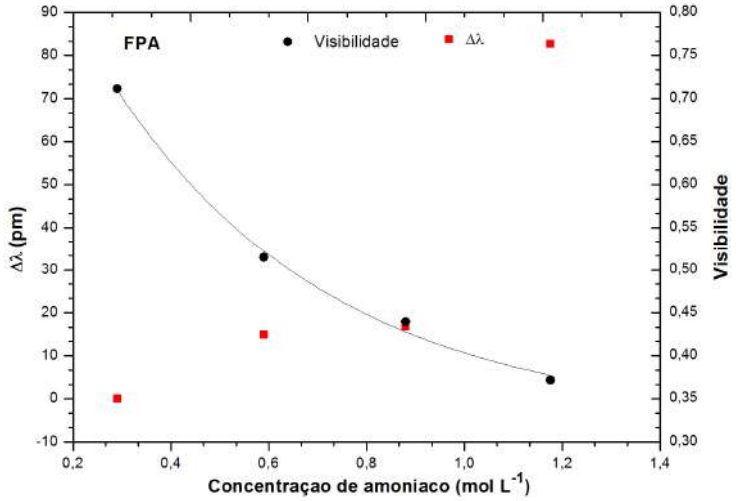


Figura III.12 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas quando o meio exterior é o Amoníaco.

Observando as medidas alcalinas, o comportamento é bastante diferente do ácido. Quando a cabeça sensora era submergida nas soluções alcalinas, obtinha-se de igual forma uma evidente variação de visibilidade, mas não de $\Delta\lambda$. Este facto poderia estar relacionado com a introdução das propriedades alcalinas na estrutura sol-gel, modificando o índice de refracção interno da camada da matriz e variando consequentemente a resposta de visibilidade.

Da mesma forma não existiram variações consideráveis de índice de refracção na gama de soluções alcalinas utilizadas, quando foram caracterizadas com um refractómetro de Abbe.

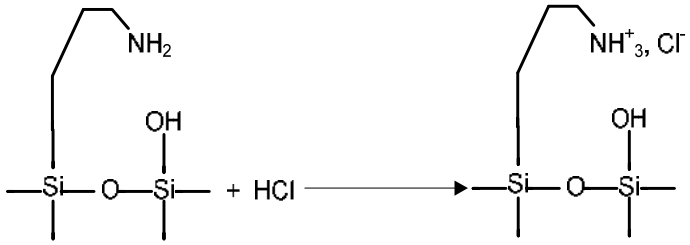
As características relativas ao desempenho da membrana sensora em questão são apresentadas na Tabela III.2. para as soluções aquosas alcalinas.

Tabela III.2- Características de funcionamento da membrana sol-gel dopada com APTEOS, FPA para bases.

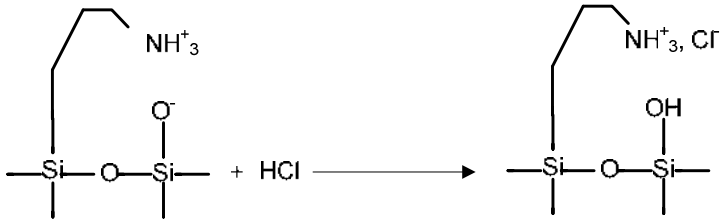
Características	**Hidróxido de Sódio**	**Amoníaco**
Equação da função	$y = A_1 \times \exp(-x/t_1) + y_0$	
$\mathbf{Y_0}$	$0{,}8681 \pm 0{,}0082$	$0{,}3229 \pm 0{,}04232$
$\mathbf{A_1}$	$-0{,}00252 \pm 1{,}3 \times 10^{-3}$	$0{,}7353 \pm 0{,}06664$
$\mathbf{t_1}$	$-0{,}02136 \pm 2{,}27 \times 10^{-3}$	$0{,}4518 \pm 0{,}1119$
$\mathbf{R^2}$ **ajustado**	0,9949	0,9895

De uma forma geral, o mecanismo presente poderá ser descrito em termos de variação da permitividade dieléctrica, o que conduz a uma variação de comprimento de onda das franjas interferométricas tal como foi mencionado anteriormente. Os mecanismos seguintes elucidam este mesmo comportamento.

1) A protonação dos grupos amina (Esquema III.4) ou a protonação das espécies ≡ SiO, $^{+}H_3NC_3H_6$-Si≡ (Esquema III.5) que se conhece existir nos materiais contendo APTEOS.



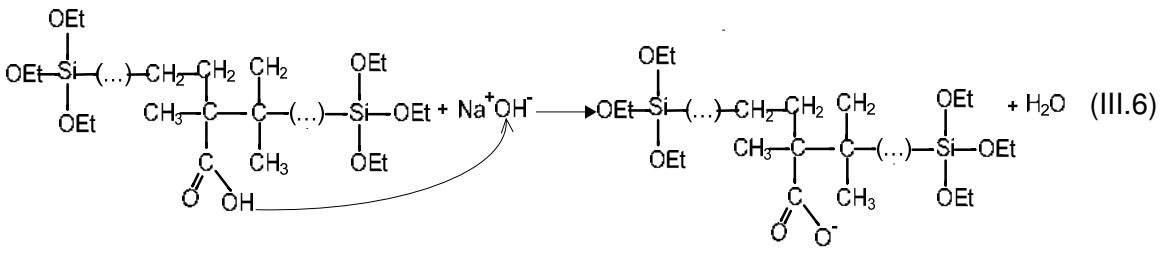
(III.4)



(III.5)

2) A interacção dos grupos acrilato com as bases,

3)



(III.6)

A mudança de carga na proximidade dos átomos de silício na camada depositada parece gerar uma variação de índice de refracção da interface por transferência de carga para os átomos de silício da superfície do vidro. Tal como foi mencionado anteriormente, esta transferência de cargas causa uma mudança na permitividade dieléctrica do meio, isto é da interface fibra/filme. No caso do contacto com as soluções básicas esta influência acontece em gamas mais longas, sendo que é mais evidente na visibilidade.

Para avaliar a adequabilidade deste tipo de material para as medidas de pH, foram testadas várias soluções tampão de pH que foram submetidas à ponta da fibra usando a mesma técnica referida anteriormente (secção II.7).

A Figura III.13 mostra dois resultados medianamente adaptáveis à resposta pretendida. O ajuste Sigmoidal poderá adequar-se com coeficiente de correlação R^2 ajustado.
Aparentemente a presença desta membrana sensível provavelmente poderá alterar a selectividade da superfície modificada para vários iões, por exemplo, os tampões preparados, a fim de medir o pH que contêm as seguintes composições: pH de ~ 4 – biftlato de potássio, para o pH ~ 3; biftlato potássio + ácido sulfámico, para pH ~ 8, 7 e 6 incluindo soluções de fosfato de sódio dibásico e fosfato de potássio monobásico.

O equilíbrio acima descrito envolvendo protões e grupos hidroxilo parece competir com equilíbrio entre a capacidade dos iões complexantes (como alguns destes utilizados na preparação dos tampões de pH) na solução e pelos átomos constituintes da rede sol-gel. O fato de não ser encontrada uma correlação linear para o caso das medições de pH com tampões não é uma desvantagem. De fato, a tecnologia dos sensores em fibra óptica possibilita a multiplexagem de sensores, com selectividades e desempenho adequado funcionando todo o conjunto com elevada fiabilidade.

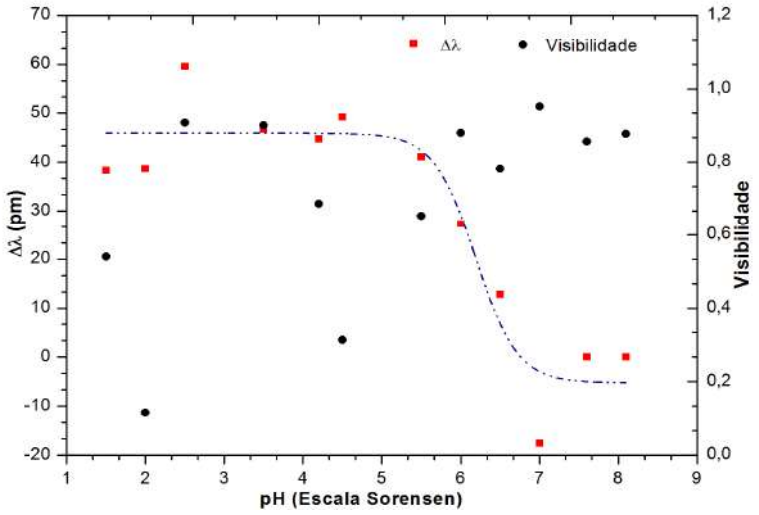


Figura III.13 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPA e visibilidade das franjas interferométricas em função do pH do meio exterior.

A interrogação pseudo-heterodina permite medir pequenas variações de fase do interferómetro, possibilitando também a detecção de pequenas alterações no volume de ácido. De modo a evidenciar este facto, repetiu-se a experiência incrementando concentrações de ácido clorídrico. A Figura III.14 apresenta a resposta do estudo em que foi colocada a estrutura submetida a vários incrementos de ácido clorídrico por um período controlado de (275 s). Os tempos de resposta e recuperação estimados foram de aproximadamente de 5 s.

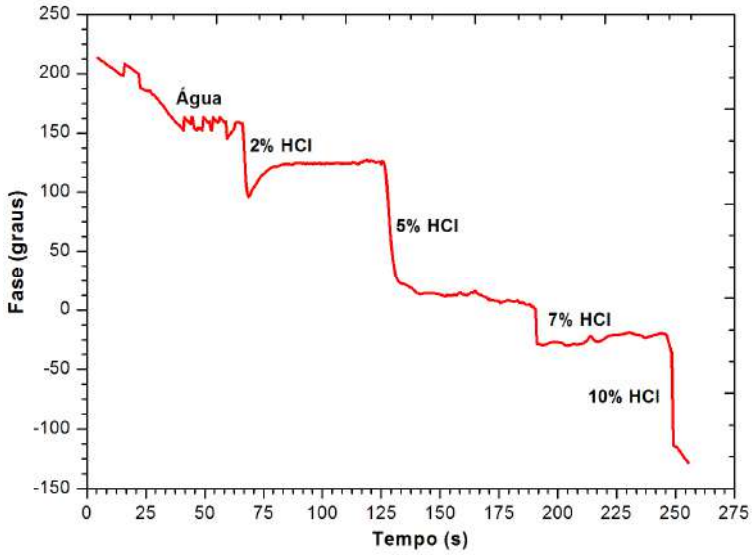


Figura III.14 – Resposta da membrana sensora FPA ao ácido clorídrico quando o interferómetro é interrogado utilizando interrogação pseudo-heterodina.

III.1.3.1 Reversibilidade e Reprodutibilidade da membrana sol-gel dopada com APTEOS

Foi estudada a reversibilidade da resposta do sensor. Para isso, a ponta da fibra FPA foi inserida alternadamente em água desionizada e numa solução acidificada com ácido acético durante cerca de 5 minutos, novamente, de forma a estabelecer o equilíbrio com o meio circundante para cada interacção.

A Figura III.15 mostra a sobreposição dos espectros visualizados através do OSA ao longo da experiência. O padrão de interferência desloca-se para a direita quando a ponta sensora entra em contacto com a água.

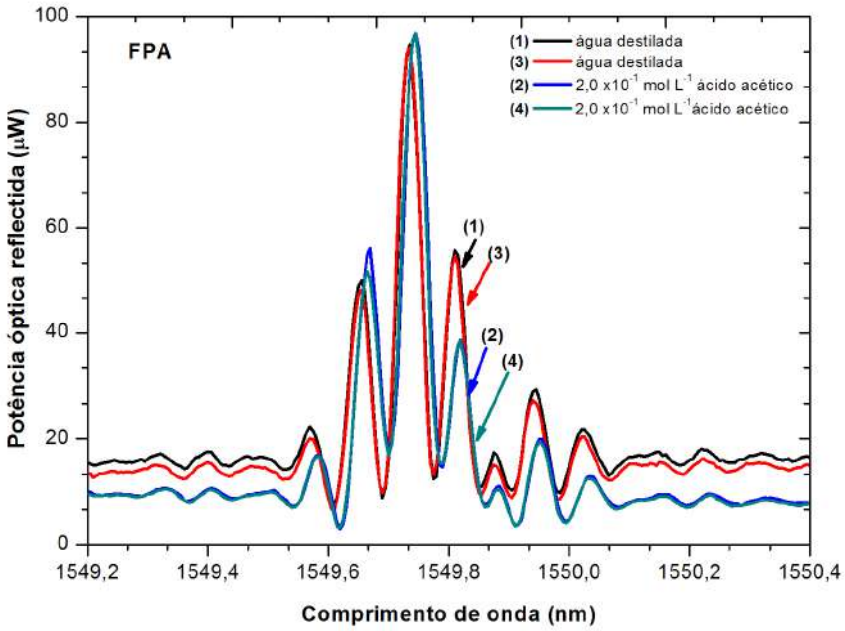


Figura III.15 - Espectros sobrepostos para concentrações de água e ácido acético (2,0 x10^{-1} mol L^{-1}) que mostram a reversibilidade da resposta da estrutura sensora ao ácido.

Os espectros correspondentes ao ácido estão perfeitamente sobrepostos, sendo que a visibilidade decresce na presença do ácido e o comprimento de onda varia, apresentando um deslocamento em relação ao espectro da água.

Da mesma forma, foi estudada a reprodutibilidade da membrana sensora FPA. Para isso foi fabricada uma outra cabeça sensora com as mesmas características e procedimento de fabricação. A resposta obtida foi equiparada à cavidade previamente estudada, quando se efectuaram os mesmos procedimentos para as medições dos analitos ácidos. A Figura III.16 apresenta o deslocamento em comprimento de onda em função da concentração de ácido clorídrico para os dois sensores, FPA e FPA.1.

As cavidades foram testadas na mesma gama de concentrações, apresentando um $R^2_{ajustado}$ à função exponencial de 0,9939 e 0,9889 para as cabeças sensoras FPA e FPA.1 respectivamente.

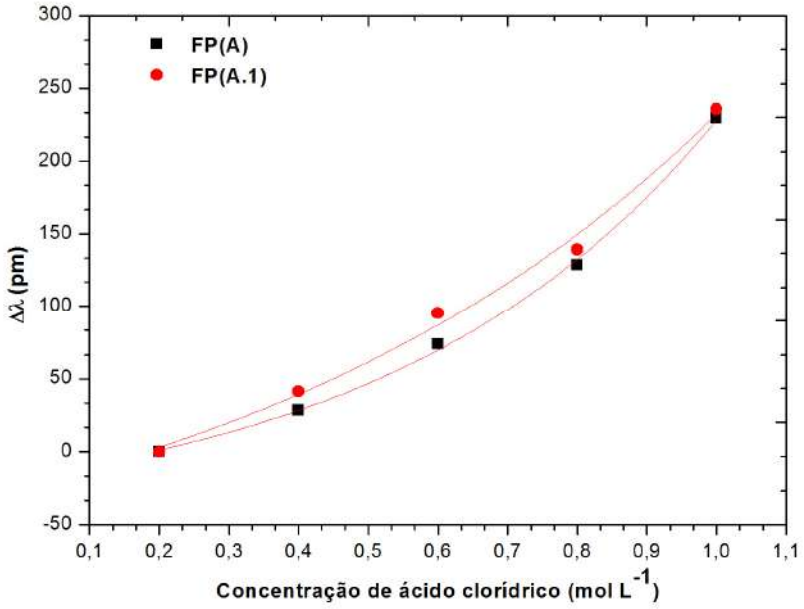


Figura III.16 - Reprodutibilidade da cabeça sensora com ácido clorídrico (FPA e FPA.1).

Frequentemente pacientes debilitados necessitam de uma avaliação do pH gástrico [27] e a medição de pH *in situ*, nomeadamente no sangue e estômago, sendo de grande importância este facto uma vez que o processo facilitaria o diagnóstico e tratamento de forma quase instantânea. Os métodos tradicionais são baseados na amostragem do líquido gástrico através de um cateter inserido pela garganta, em que para além de serem demorados, provocam desconforto na garganta, principalmente durante a deglutição, devido a passagem do cateter neste local. Os pacientes sujeitos a

monitorização contínua têm dificuldades para comer, dormir, enfim realizar suas actividades diárias.

Um sensor em fibra óptica, pouco invasivo, preciso e versátil através de um sistema electrónico desenvolvido especificamente para o tratamento dos dados, facilita o diagnóstico rápido e tratamento.

No sistema gástrico, por exemplo, o ácido clorídrico é segregado nas células parietais do estômago podendo o pH deste ser da ordem de 0.9 - 2. O pH ácido do estômago tem importância, uma vez que é nesta gama de acção que as enzimas digestivas actuam (lipase gástrica e pepsina) e desnaturam as proteínas da dieta.

A gama aqui estabelecida para as medições de concentração de hidrogénio é enquadrada nos requisitos necessários, conforme Figura III.17, o que significa que este tipo de sensor poderia mesmo ter aplicação directa para a gama de pH do estômago por períodos medianamente longos, pois este, conforme foi demonstrado anteriormente, contem resistência suficiente quando sujeito a valores extremos de pH.

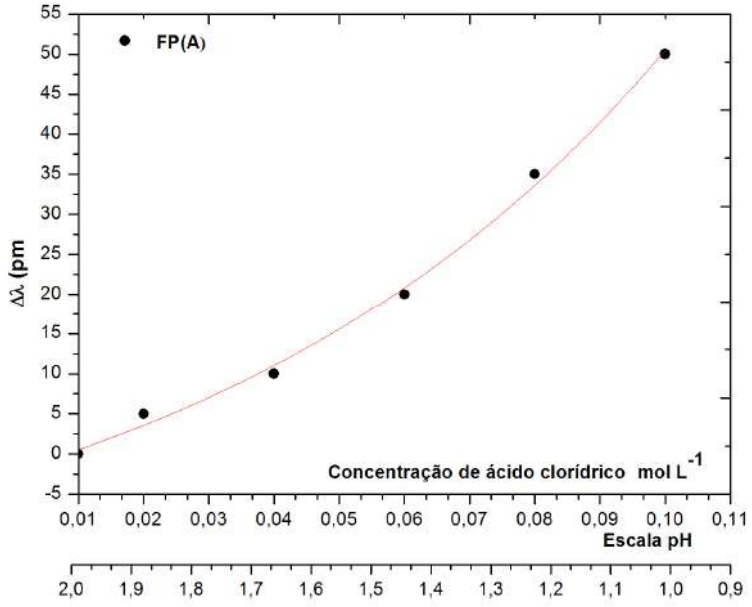


Figura III.17 - Gama de pH do estômago para o sensor FPA.

A definição de pH é uma medida é directa e proporcional à concentração de H^+. Uma outra situação específica de aplicação é o caso da monitorização contínua de concentração ácida no esófago em que é muitas vezes necessária uma pHmetria esofágica prolongada.

Esta medida indica a frequência com que os fluidos ácidos do estômago fluem para o esófago ou na regurgitação, medindo assim o grau de acidez num período de 12 a 24 horas [84]. A pHmetria esofágica prolongada convencional muitas vezes requer um cateter composto por 2 partes, o cateter propriamente dito, constituído por um

eléctrodo de antimónio ou de vidro, no caso de cateter de um canal e um eléctrodo de referência externa, que é fixo no tórax do paciente. O pH do esófago abrange a escala de pH de ≈4 até perto de ≈7 [85], [86].

Um sensor óptico, como é o caso do FPA poderá ser útil como sensor de alarme dos níveis limite quando o pH do esófago começa a ser inferior a 4 [87].

O mesmo acontece com a monitorização contínua do pH do sangue, em que é essencial um tratamento apropriado dos pacientes que tem problemas respiratórios e metabólicos. Estes instrumentos cobrem a gama de 7,0 a 7,6 unidades de pH com uma resolução de 0,01 unidades de pH. Como indicado no gráfico III.17, o sensor de fibra óptica apresenta sensibilidade nesta gama, donde ser viável esta aplicação, o que poderá ser considerado em desenvolvimentos futuros.

III.1.4 Membrana sol-gel dopada com APTEOS como sensor de NO_3^-, H_2O_2 e NH_3

Com o intuito de aferir a sensibilidade cruzada da membrana FPA a outras espécies químicas para determinação de radicais livres envolvidos nos sistemas mutagénicos do organismo como peróxidos, compostos de nitrosos entre outros, foram preparadas soluções de nitrato, peróxido de hidrogénio e amóniaco para as quais foram repetidos os mesmos procedimentos descritos na secção II.

Contrariamente aos resultados obtidos do mesmo sensor com ácidos, a membrana FPA parece não ter a mesma sensibilidade para estas espécies uma vez que as variações do comprimento de onda de Bragg têm um comportamento muito flutuante. Por este motivo, a membrana sensora torna-se selectiva a espécies químicas que libertam protões H^+, conforme foi referido (Figura III.18). O tamanho reduzido do átomo de hidrogénio e as tensões de carga modificadoras das características físico-químicas da matriz, e consequentemente do índice de refracção, permitem uma reacção mais rápida e selectiva da parte daquele através dos poros do filme sol-gel.

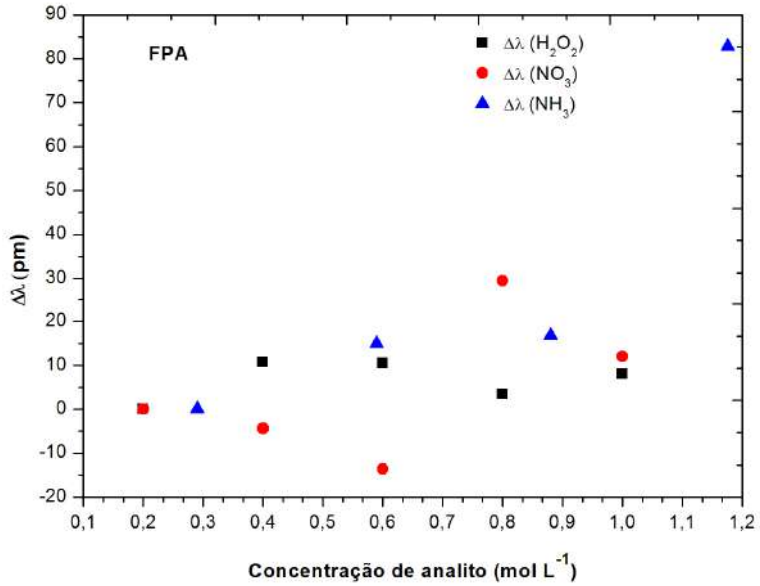


Figura III.18 - Resposta do sensor FPA ao peróxido de hidrogénio, nitratos e amónia.

III.2 Membrana sol-gel dopada com APTEOS e EDTA

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um composto orgânico que age como agente quelante e forma complexos muito estáveis com iões metálicos. Contem seis posições de coordenação com as quais pode estabelecer ligações com catiões metálicos através de dois grupos amino e quatro grupos carboxílicos.

É usualmente aplicado na indústria alimentar, sendo também usado durante tratamento endogénico por ter uma função quelante e retirar iões cálcio (Ca^{2+}). Essa afinidade com o cálcio faz com que seja utilizado como anticoagulante.

Quando o EDTA é dissolvido em água, o ligando comporta-se como um aminoácido com carácter anfóterico, carga total nula, mas que contem carga positiva e negativa em diferentes átomos do composto (*zwitterion*). O EDTA forma quelatos estáveis com iões metálicos na razão 1:1 independentemente da carga do catião. Esta estabilidade resulta das várias posições dentro do ligante que dão origem a uma estrutura robusta em que o catião é eficazmente cercado e isolado pelo meio circundante [87] - [89].

O agente quelante forma complexo com Cu(II), Ni(II), Fe(III), Ca(II), etc. A matriz de vidro serve como suporte para os materiais reactivos na qual são dopadas moléculas capazes de responder quimicamente ao ambiente através dos poros na matriz.

Tal como foi dito anteriormente, a matriz de silicato nos materiais sol-gel é normalmente formada por hidrólise de um precursor alcóxido, seguido de uma condensação para se obter uma matriz polimerizada com pontes SiO_2. Esta matriz é capaz de impregnar reagentes tal como o EDTA e estabelecer ligações covalentes de forma barata e generalizada. Esta matriz porosa e opticamente transparente tem sido já usada em sensores químicos e bioquímicos e tem demonstrado bastante sucesso em géis dopados para a química analítica. Os encapsulamentos de vários agentes químicos que são sensíveis ao analito seleccionado num filme de vidro xerogel foram já estudados anteriormente através de fluorescência para monitorização das características da cor do gel dopado, que se vão manifestando na presença de catiões metálicos tais como Fe(III), Al(III), Co(II), Ni(II), Cu(II),e Pb(II) assim como numa mudança de pH que pode ser detectada [88] [89].

A preparação de um filme sensível dopado com EDTA foi estudada neste trabalho, adaptando a mesma configuração que na secção III.1 para a detecção de alguns iões metálicos com relevante importância em aplicações biomédicas.

O aspecto final da matriz de revestimento da fibra óptica era igualmente transparente e semelhante à membrana FPA. A detecção dos metais acima referidos foi feita de acordo com os procedimentos demonstrados na secção II.7, ou seja pela imersão da ponta da fibra revestida com o sol-gel dopado com EDTA nas diversas soluções de catiões metálicos preparadas.

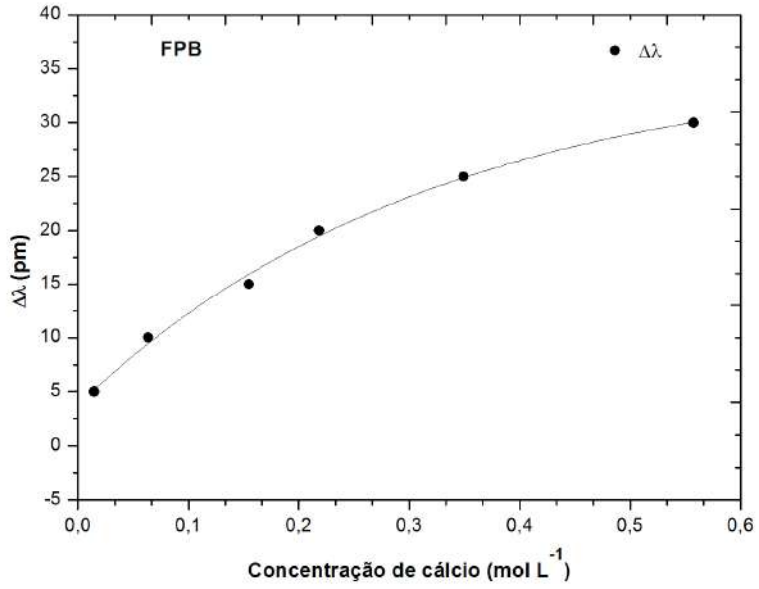


Figura III.19 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função da concentração de cálcio.

A difusão dos catiões metálicos através dos microporos da matriz sol-gel resultou na formação de um complexo M^{n+}/EDTA no gel (Esquema III.8), obtendo-se uma variação de comprimento de onda e de visibilidade, quando se introduziam soluções com concentrações diferentes daqueles metais (Figuras III.20 e III.21), tal como a resposta obtida na secção III.1 aos ácidos.

O EDTA tem como fórmula simplificada, H_4Y e forma complexos na razão 1:1 com a grande parte dos catiões metálicos. Frequentemente é usado o sal dissódico do EDTA, Na_2H_2Y (ou H_2Y_2) em reacções analíticas. A complexação de M^{n+}/EDTA em solução segue a seguinte reacção [88],

$$M^{n+} + H_2Y^{2-} \Leftrightarrow MY^{(n-4)} + 2\mathrm{H}^+ \qquad \text{(III.7)}$$

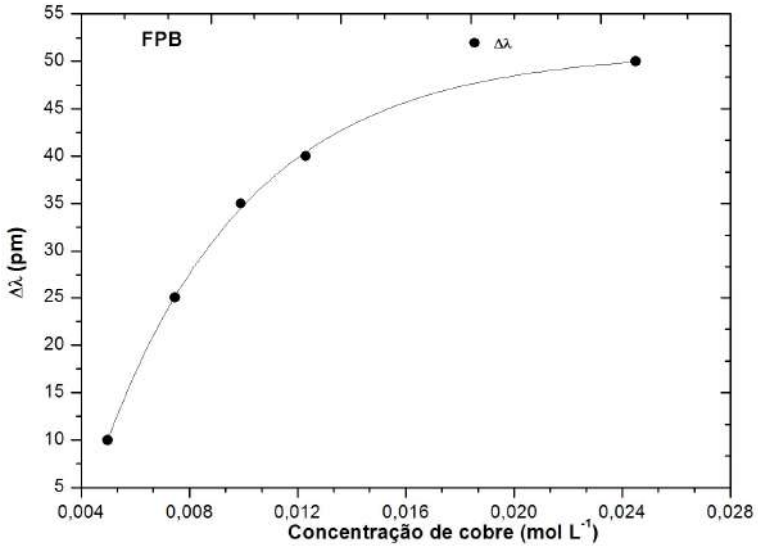
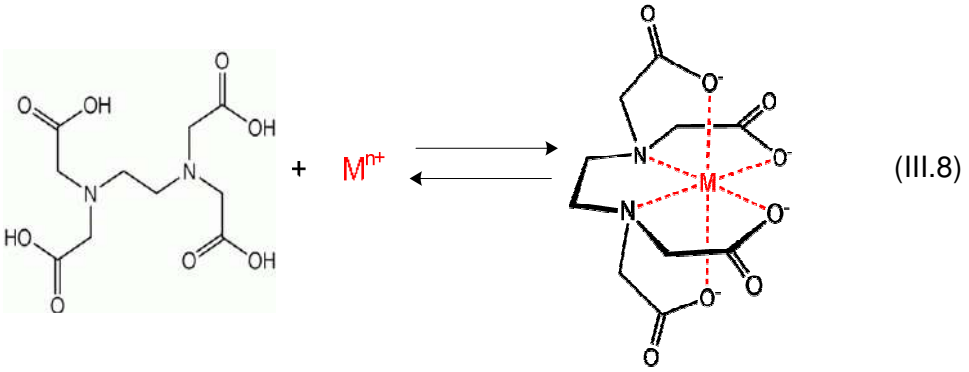


Figura III.20 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função da concentração de cobre.

Por outro lado, o EDTA quando é encapsulado na solução sol-gel, de acordo com *Oka et al* [89], [90], não estabelece uma ligação directa ou de hidrogénio entre a molécula e a matriz sol-gel. Poderão existir forças de *Van der Waals* entre o EDTA e os poros da superfície, estando a molécula estritamente dentro dos poros [89], [90].



(III.8)

Devido à capacidade quelante do EDTA para retirar cálcio, este composto é muitas vezes utilizado como um anticoagulante [91] - [94]; por este facto, a existência de um sensor de cálcio por via intravenosa poderá ser interessante na monitorização dos níveis de concentração de cálcio no sangue ou até mesmo em cálculos renais localizados nos rins e bexiga devido à formação de cristalizações de alguns sais minerais, como por exemplo o oxalato de cálcio.

A gama de concentração de valores de cálcio na corrente sanguínea é essencial para várias funções do corpo, incluindo a contracção muscular, a condução nervosa e o funcionamento apropriado de muitas enzimas. A hipercalcemia, que é a existência de concentração de cálcio no sangue superior a 10,5 mg dL^{-1}, é um problema comum em muitos pacientes [95]. A hipercalcemia pode ser causada pelo aumento da absorção gastrointestinal ou por um aumento da ingestão de cálcio. Frequentemente não existem sintomas e o quadro geralmente descobre-se pela primeira vez através de análises sistemáticas ao sangue. Podem formar-se cálculos renais que contêm cálcio em pessoas com hipercalcemia crónica. Se a hipercalcemia é importante e prolongada, podem-se formar cristais de cálcio nos rins, provocando lesões permanentes.

Por outro lado a hipocalcemia é uma situação em que a concentração de cálcio no sangue é inferior a 8,8 mg dL^{-1} no sangue, ou seja, o patamar considerado normal de concentrações será 8,8 – 11,5 mg dL^{-1} [95]. A resposta da configuração FPB para a gama de interesse na detecção de cálcio no sangue, ou seja a partir do valor de concentração de cálcio em que é detectada a hipercalcemia é observada na Figura III.21.

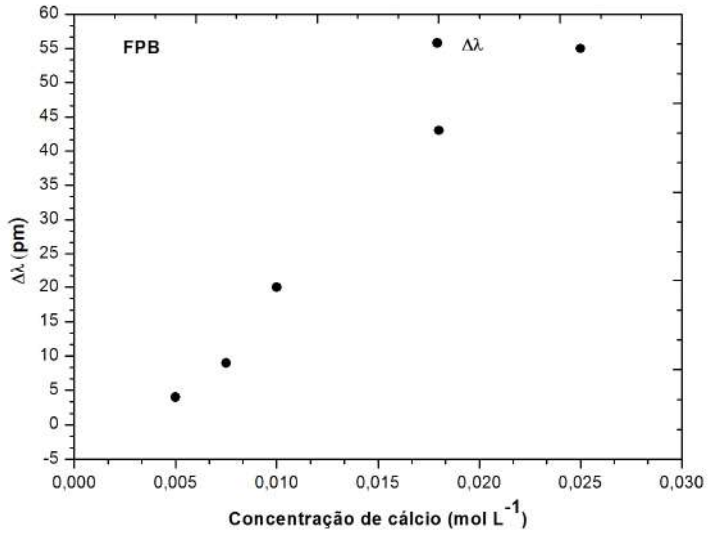


Figura III.21 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função das concentrações de cálcio existentes no sangue.

Os iões de cálcio devem ter maior estabilidade em meio ácido, uma vez que em meio básico precipitam como hidróxido de cálcio, $Ca(OH)_2$. Devido à existência de pequenas quantidades de cálcio nas soluções preparadas, não é perceptível a precipitação do mesmo sólido.

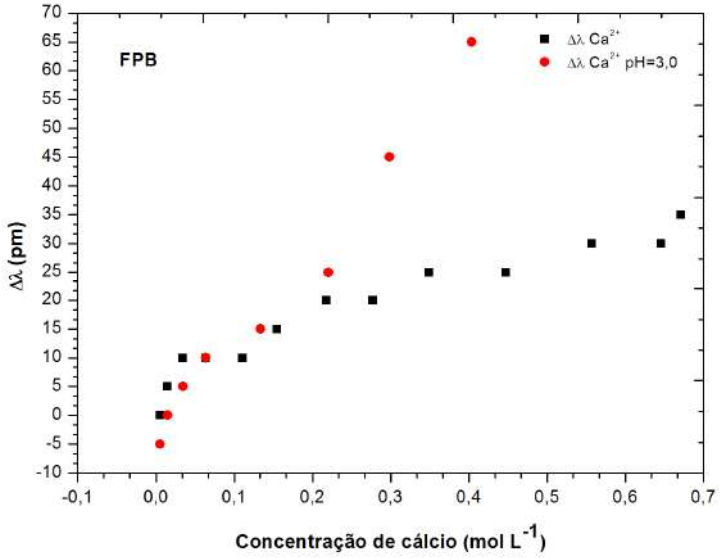
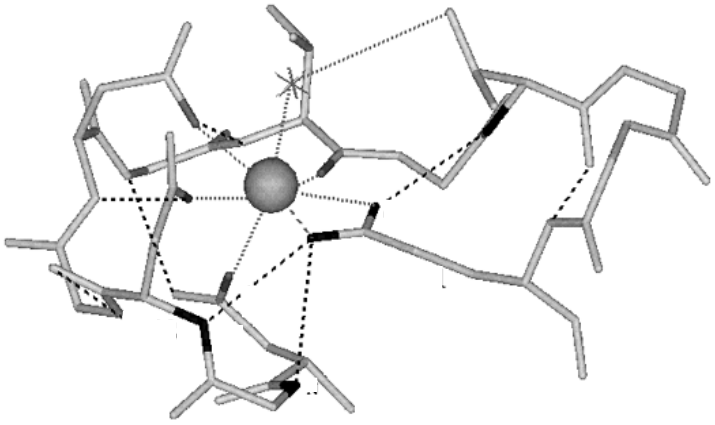


Figura III.22 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em solução acidificada e neutra

O caso do Calmodulin (**Cal**cium **Modul**ated Prote**in**) é um exemplo análogo de comparação de semelhança das interligações em rede estabelecidas à volta do átomo de cálcio através de pontes de hidrogénio que estabilizam toda a estrutura molecular [98].



(III.9)

Figura III.23 – Estabilização de pontes de hidrogénio na esfera de coordenação do ião cálcio [97].

O catião metálico Cu(II) quando não se encontra ligado a uma proteína é tóxico [75]. O consumo de quantidades relativamente pequenas de cobre livre pode provocar náuseas e vómitos. Os alimentos ácidos ou as bebidas que estão em contacto prolongado com recipientes, tubos ou válvulas de cobre podem estar contaminados com quantidades pequenas deste metal. Caso se ingiram involuntariamente grandes quantidades de sais de cobre não ligado a proteínas, ou caso se usem compressas saturadas com uma solução de sal de cobre para curar grandes zonas de pele queimada, pode absorver-se uma quantidade suficiente para lesar os rins, inibir a produção de urina e causar anemia devido à destruição de glóbulos vermelhos (hemólise) [99]. A detecção deste metal foi obtida através da membrana FPB a partir de 2,0 mg/L de Cu (II), conforme a Figura III.20. O enfraquecimento neurofisiológico apresenta-se como um dos severos resultados potenciais da deficiência deste micronutriente, pois esse elemento é um metal de transição, essencial para a actividade e o controle neuronal de doenças neuronais, tendo sido relatado em várias doenças humanas neurodegenerativas [79].

Desta forma enfatiza-se a importância dos níveis de concentração deste metal nos processos vitais, em particular na monitorização dos níveis intracelulares, uma vez que permitem uma melhor compreensão das condições de desenvolvimento de doenças

degenerativas como a doença de Alzheimer [100]. Este tipo de sensores foi já estudado por *Rosenzweig Zeev* em que se utilizou lamelas de vidro aplicando-se a técnica da fluorescência para monitorizar zinco libertado das células beta do pâncreas [101].

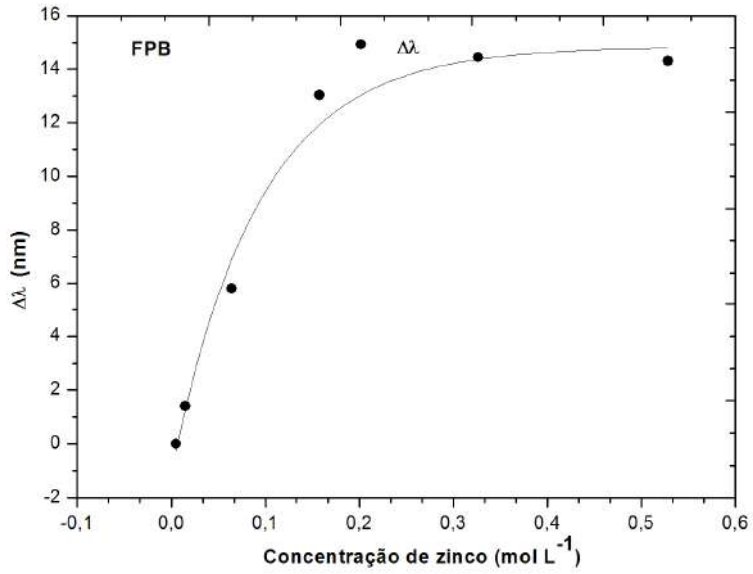


Figura III.24 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em soluções de zinco.

O patamar em cuja sensibilidade a Zn(II) por parte de FPB é maior, corresponde à gama mais baixa de concentração na Figura III.24, o que é interessante uma vez que este metal existe na corrente sanguínea em pequeníssimas concentrações, na ordem 9,0–10,5 mg dL^{-1} ou 2,25–2,75 mmol L^{-1} para um adulto saudável [102].

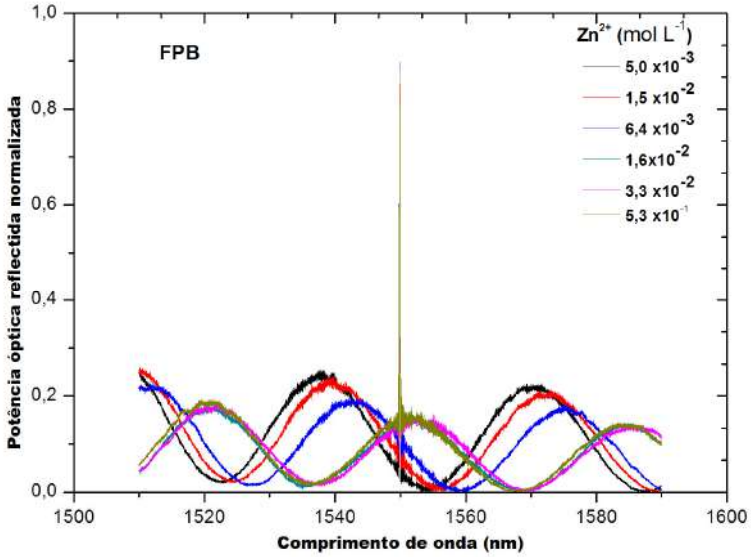


Figura III.25 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPB em função da concentração de zinco.

O comportamento observado na Figura III.25, revela que foi formada uma segunda cavidade de Fabry-Perot no filme sol-gel depositado na ponta da fibra, obtendo-se um interferómetro entre a interface fibra <->sol-gel e sol-gel<->ar, uma vez que o período de variação de comprimento de onda correspondente é bastante maior que o correspondente á cavidade formada entre a FBG e a interface vidro-sol-gel.

A variação de comprimento de onda é da ordem dos nanometros (30 nm). O aspecto dos espectros sobrepostos obtidos para as várias concentrações é demonstrado na mesma Figura III.25.

Nesta situação seria interessante efectuar testes em que a cavidade de Fabry-Perot fosse constituída entre a ponta da fibra com a deposição sol-gel e o meio circundante (onde se encontra o mensurando), isto é, sem a FBG. Este será um aspecto a considerar para um estudo posterior uma vez que permite uma sensibilidade e capacidade de medição para valores de concentração bastante inferiores à gama estudada.

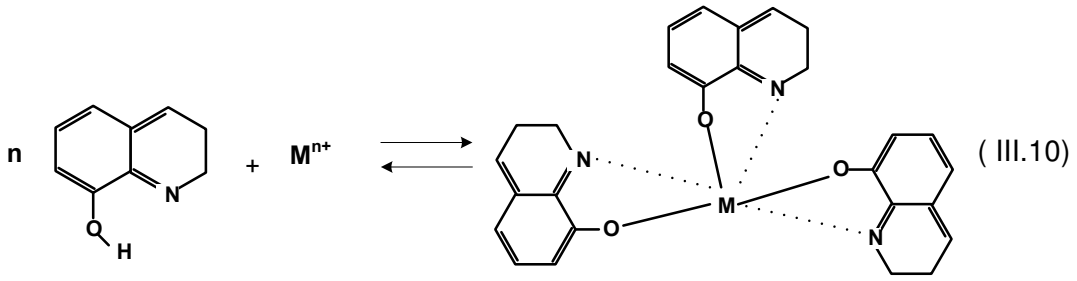
Os coeficientes, R^2_{ajustado} obtidos para esta membrana sensora alcançam valores superiores a 0,99 para a detecção de cobre e cálcio e ≈0,98 para medições ao ião metálico zinco.

Tabela III.3 Características de funcionamento da membrana sol-gel dopada com APTEOS, FPB para cobre, cálcio e zinco.

Características	**Cobre**	**Cálcio**	**Zinco**
Equação da função	$y = A_1 \times \exp(-x/t_1) + y_0$		
Y_0	51,030 ± 0,580	35,786 ± 2,302	14,839 ± 0,768
A_1	-103,023 ± 3,348	-32,064 ± 2,046	-15,922 ± 1,018
t_1	0,00541 ± 2,034 x 10^{-4}	0,3231 ± 0,0481	0,092 ± 0,018
R^2_{ajustado}	0,9991	0,9943	0,9798

III.3 Membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH

A 8-hidroxiquinolina é um composto orgânico com a fórmula empírica C_9H_7NO e é derivado da quinolina heterocíclica pela posição de um hidroxilo na posição 8 da molécula. É um agente complexante bastante utilizado em determinações analíticas devido à sua baixa selectividade e formação de compostos com estequiometria definida e de baixa solubilidade. Este quelante e os seus nitro-derivados têm sido estudados na obtenção de coprecipitados para preparação de óxidos cerâmicos [103] [104].



(III.10)

A QOH usada em sol-gel funciona como um modelo com pontos de ligação numa estrutura porosa de sílica com iões metálicos. Apesar de ser imobilizada sobre vários substratos, as sílicas ligadas têm mostrado potencial reconhecido para a pré-concentração de elementos ou isolamento de matriz, sendo que a sua imobilização sobre esta matriz tem provado ser um material particularmente útil para a detecção de iões metálicos (Esquema III.10) [104], [105]. A aplicação da QOH imobilizada sobre a sílica para a pré-concentração e determinação de Cd, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Ni e Co em água do mar foi relatada por *Sturgeon et al* [104].

III.3.1 Desempenho/Detecção da membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH

O comportamento da membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH (FPC) é similar ás cabeças sensoras previamente estudadas, com resposta de amplitude inferior em variação de comprimento de onda comparativamente às membranas FPA e FPB, quando avaliado o seu desempenho na detecção das espécies cálcio e cobre.

As Figuras III.26 e III.27 demonstram que a tendência das curvas é logaritímica, tal como foi obtido para as membranas químicas anteriormente preparadas.

A gama de concentrações estuda foi de 32 a 1200 mg L^{-1} para o cálcio e cobre. Em ambas as respostas dos catiões obteve-se uma curva exponencial.

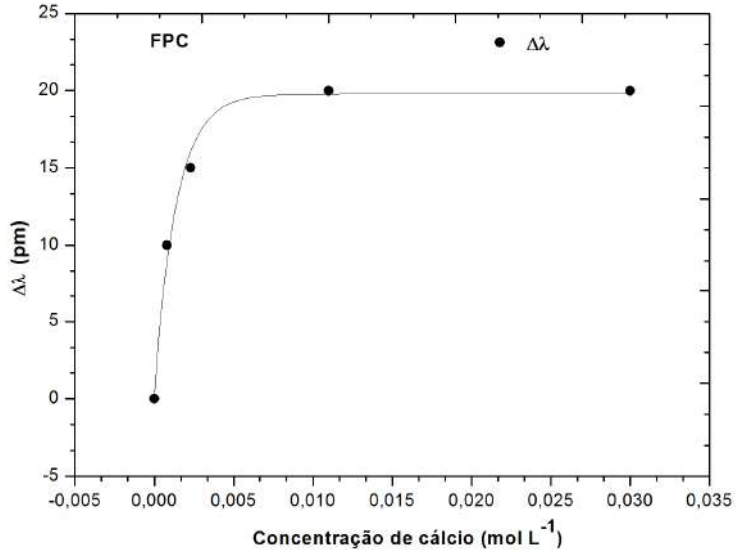


Figura III.26 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC em função da concentração de cálcio.

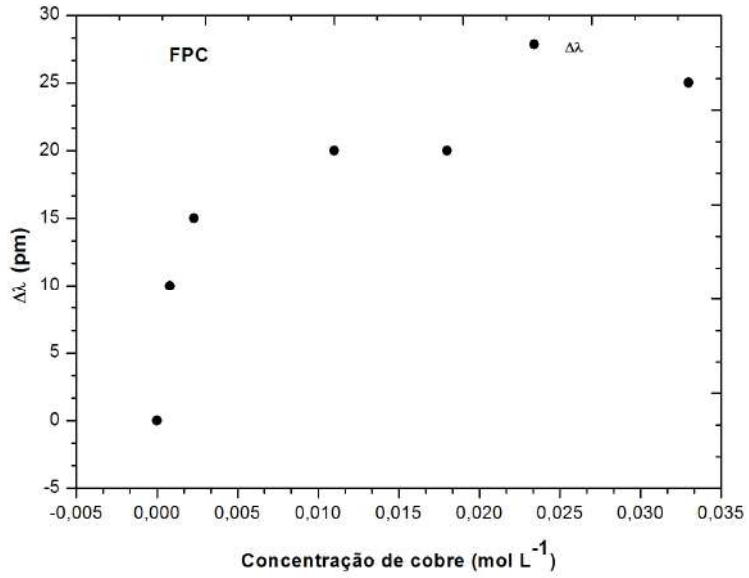


Figura III.27 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC em função da concentração de cobre.

Com o intuito de evitar precipitação do Fe (III) sob a forma de $Fe(OH)_3$ em solução aquosa pH>5, prepararam-se as soluções de Fe (III) tamponizadas a pH≈4,5. O intervalo de concentrações de Fe(III) estudado, 0,56 a 8,4 mg L^{-1}, correspondente ao gráfico da Figura III.28, demonstrou ter uma amplitude de $\Delta\lambda$ superior em relação aos catiões Ca(II) e Cu(II). A tendência exponencial reflecte-se no facto de existir pouca sensibilidade a partir de 0,1 mmol/L de concentração mesmo efectuando-se lavagens entre leituras. A membrana FPC tal como as membranas sensoras FPA e FPB demonstram ter reversibilidade, necessitando de um período de remoção da forma complexada longo (>3horas), que é obtido após lavagem com água desionizada. Isto não será propriamente desvantajoso uma vez que a velocidade de reacção de formação de complexos metálicos é bastante superior à oposta. Este tipo de sensores será importante quando se pretende usar dispositivos descartáveis.

Tendo em conta o intervalo de concentrações do catião Fe(III) no sangue, ou seja 12,0 x10 $^{-3}$ a 25,0 x10 $^{-2}$ mg L^{-1}, foram feitas algumas medições nesta gama, não se detectando no entanto variações significativas de comprimento de onda ou visibilidade. O desenvolvimento de um sensor com um limite de detecção inferior ao encontrado para este seria interessante, podendo ser estudado futuramente, através da modificação de determinados parâmetros característicos da membrana sol-gel, como por exemplo a espessura da camada do filme ou a porosidade.

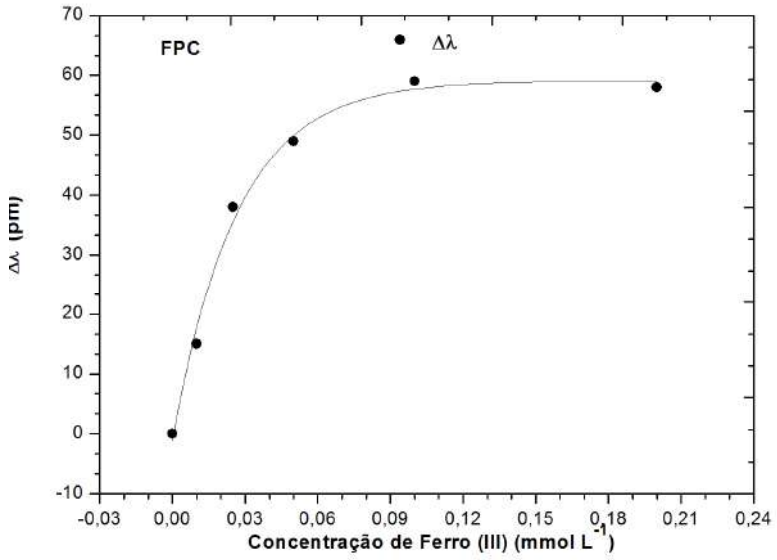


Figura III.28 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC em função da concentração de ferro.

As características resumo de funcionamento da membrana FPC são apresentadas na Tabela III.4.

Tabela III.4 Características de funcionamento da membrana sol-gel dopada com APTEOS, FPC para cobre, cálcio e ferro.

Características	**Cobre**	**Cálcio**	**Ferro**
Equação da função	$y = A_1 \times \exp(-x/t_1) + y_0$		
Y_0	$21{,}564 \pm 1{,}514$	$19{,}788 \pm 0{,}804$	$59{,}096 \pm 1{,}888$
A_1	$-20{,}956 \pm 2{,}876$	$-19{,}393 \pm 1{,}346$	$-60{,}188 \pm 2{,}765$
t_1	$0{,}00169 \pm 5{,}799 \times 10^{-4}$	$0{,}00138 \pm 2{,}359 \times 10^{-4}$	$0{,}0265 \pm 3{,}11 \times 10^{-3}$
$R^2_{ajustado}$	0,9142	0,9810	0,9895

De acordo com os resultados das características de funcionamento da membrana FPC para os catiões metálicos estudados e expressos na tabela III.4, verifica-se que a função exponencial é a que melhor se ajusta ao comportamento do sensor, obtendo-se um coeficiente de determinação ajustado próximo de 0,99 para o Fe(III) e para as espécies estudadas Cu(II) e Ca(II) um $R^2_{ajustado}$ relativamente baixo, inferior a 0,99.

III.3.2 Estudo do desempenho do sensor com membrana sol-gel dopada com APTEOS e QOH com variação de temperatura

De acordo com o citado na secção I.3.3, uma FBG é sensível a variações de pressão e temperatura, pelo que foi estudado o desempenho de uma FBG revestida, FPC, sujeita a variações de temperatura no decorrer da medição das amostras nas diversas concentrações preparadas. Foram acopladas duas FBG com comprimentos de onda diferentes, λ_1 de 1548 nm e λ_2 de 1550 nm (FPC) (Figura II.5 da secção II.6) obtendo-se o espectro da Figura III.30 quando efectuadas leituras para as concentrações de $2{,}5 \times 10^{-2}$ e $5{,}0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} em cálcio respectivamente. Após submersas as pontas das fibras nas duas soluções preparadas verificou-se uma variação de comprimento de onda no espectro correspondente à membrana sensora FPC (2), o mesmo não acontecendo na FBG sem deposição de filme sol-gel (1).

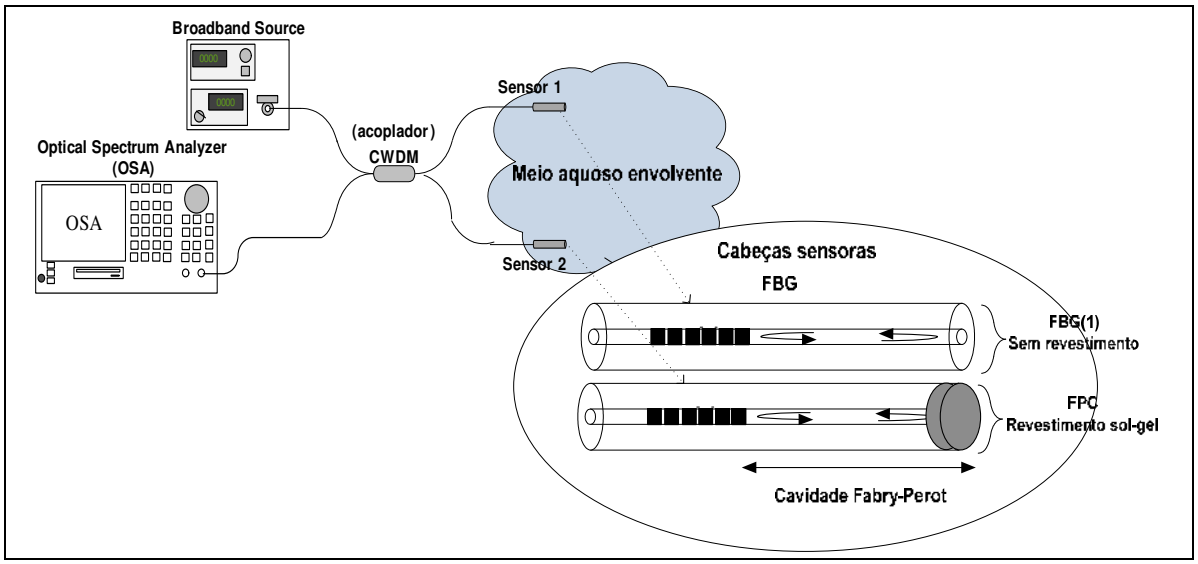


Figure III.29 – Esquema das configurações para a estrutura sensora sem (1) e com (2) membrana sensora.

A variação de comprimento de onda para a cavidade FPC deve-se à diferença química do meio, sendo a influência da temperatura nesta experiência não muito significativa uma vez que FBG(1) não obteve a mesma ordem de grandeza de deslocamento de λ. Pode afirmar-se então que a deslocação observada referente à FPC é implicita à modificação de concentração de cálcio em que a cabeça sensora dopada com QOH estava submergida (Figura III.31).

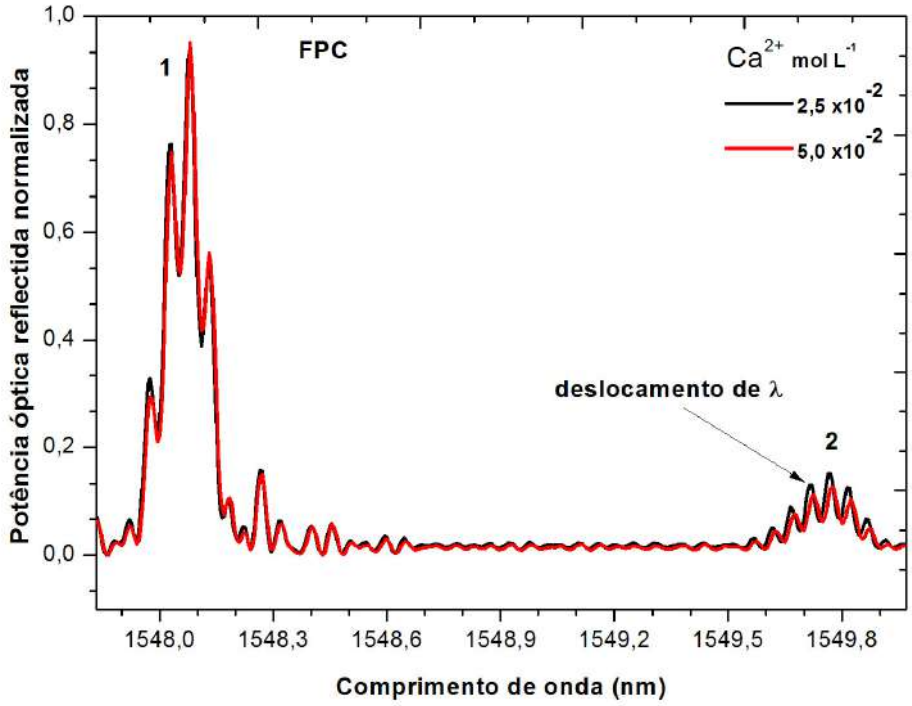


Figure III.30 - Espectro obtido para o caso das configurações indicadas na figura anterior.

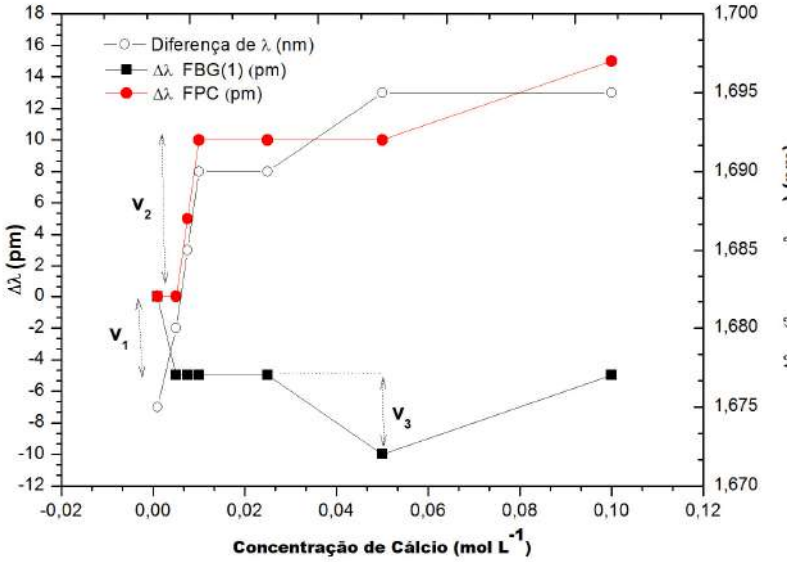


Figure III.31 - Desempenho das configurações indicadas na Figura III.29 em função da concentração de cálcio.

A variação inicial v_1 correspondente à cabeça sensora FBG(1) poderá estar relacionada com a alteração do indice de refracção externo quando a ponta da fibra foi imediatamente mergulhada nas soluções contendo catiões de cálcio, isto porque a mesma, não continha qualquer tipo de revestimento e não estava inicialmente ambientada ao meio aquoso envolvente. Por outro lado, já a mudança abrupta, v_2 de $\Delta\lambda$ da cabeça sensora FPC, poderá ser devida à variação de concentração inicial do meio, quando esta varia de 0 a 0,01 mol L^{-1} de cálcio, uma vez que a força iónica também aumenta proporcionalmente permitindo que as propriedades físico-químicas da membrana sensivel sejam alteradas. A alteração verificada para v_3, apenas num ponto de concentração de cálcio de ≈0,05 mol L^{-1} parece ter sido sujeito a uma temperatura ou pressão muito diferentes das da cabeça sensora FPC, não existindo uma explicação óbvia para a situação.

A Figura III.31 revela a tendência de comportamento da membrana FPC quando submetida a um estudo do efeito da temperatura isoladamente. Foram incrementados intervalos de temperatura de cerca de ≈0,2 ºC quando a ponta da fibra era mergulhada em água desionizada.

Conforme se verifica, a curva, com R^2 = 0,9981 apresenta uma tendência linear para um intervalo de temperatura ambiente de cerca de 4,5 ºC correspondente a um desvio de comprimento de fase de 80 pm. Este facto significa que as respostas tendem a ser diferentes quando existe a presença de catiões metálicos respondendo de forma

logaritímica. Esta variação pode ser corrigida através de configurações tais como as apresentadas em III.32.

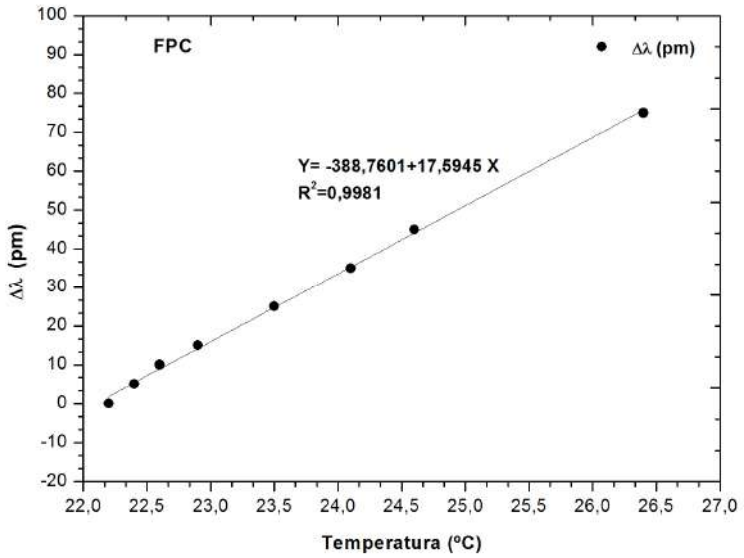


Figure III.32 - Estudo do efeito da temperatura no desempenho da membrana sensora FPC.

A FPC acusa uma resposta flutuante às soluções tampão de pH, quando se mergulhou a ponta da fibra nas soluções tampão para a gama 4,0-8,1, de acordo com a Figura III.33.

As moléculas com dimensões superiores aos átomos metálicos testados anteriormente, parecem não se difundirem através dos poros da matriz sol-gel preparada, confinando desta forma as matrizes preparadas a elementos de pequenas dimensões tais como iões metálicos.

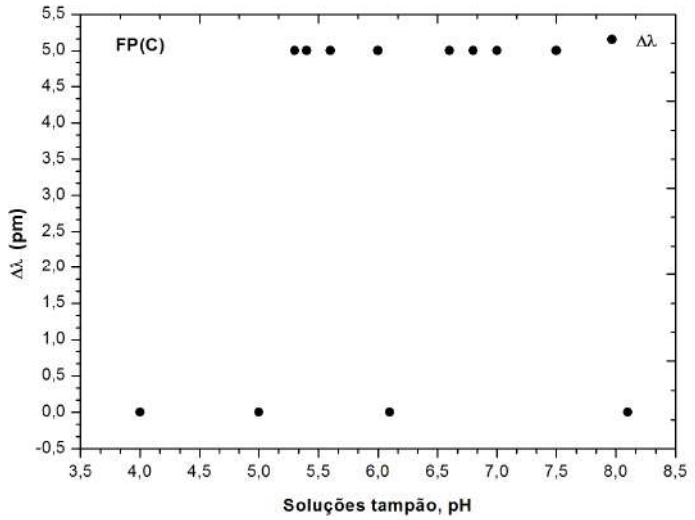


Figure III.33 - Desempenho em comprimento de onda da membrana sensora FPC para soluções tampão de pH.

CAPITULO IV

CONCLUSÕES

IV. Conclusões

Foram preparados sensores em fibra óptica para aplicação na medição de espécies químicas em fluídos como o sangue, urina, suor, etc. Para isso foram desenvolvidos sensores usando uma FBG revestida na ponta da fibra com uma matriz sol-gel sensível às espécies químicas acima referidas através da técnica dip-coating. A configuração demonstrou comportar-se como uma cavidade de Fabry-Pérot. As matrizes preparadas obtiveram diferentes respostas.

O sensor, FPA, revestida com solução sol-gel dopada com APTEOS, não apresentava sensibilidade ao índice de refracção do meio quando medido o índice de refracção de cada concentração para diferentes soluções numa gama de variação entre 1.33 e 1.35 RIU (RIU – Refractive Índex Unit). Isto permitiu concluir que a resposta obtida não é dependente do índice de refracção externo, mas dos iões presentes no meio envolvente que interagem com matriz sol-gel. Este sensor apresentava sensibilidade superior a protões comparativamente a hidroxílos. O aumento gradual da concentração do analito produz o deslocamento em comprimento de onda das franjas interferométricas e consequentemente na fase do mesmo. Isto é devido à alteração do índice de refracção da membrana e das suas propriedades físico-quimicas (permitividade eléctrica do meio), alterando consequentemente o percurso óptico do sinal.

A repetibilidade da membrana sensora FPA foi estudada, apresentando um R^2_{ajustado} à função exponencial de 0,9939 e 0,9889 para as cabeças sensoras FPA e FPA.1(réplica) respectivamente. A reversibilidade da resposta do sensor é observável quando são testadas amostras contendo uma determinada concentração de analito e água; fazendo medições alternadas verifica-se sobreposição de espectros para o mesmo tipo de amostra. Para outras espécies químicas, como por exemplo lítio, sódio e potássio e outras, tais como, radicais livres envolvidos nos sistemas mutagénicos do organismo como peróxidos, compostos de nitrosos entre outros, não se obteve qualquer variação de $\Delta\lambda$ ou obtem-se um comportamento bastante flutuante, limitando desta forma a selectividade da membrana a H^+ do grupo dos alcalino metálicos estudados neste trabalho.

O sensor, FPB, dopado com EDTA e APTEOS, mostrou sensibilidade a alguns catiões metálicos, tais como o Ca(II), Cu(II) e Zn(II). A difusão dos catiões metálicos através dos microporos da matriz sol-gel resultou na formação de um complexo M^{n+}/EDTA no gel obtendo-se um comportamento semelhante ao da matriz FPA, quando se introduziam soluções com concentrações diferentes daqueles metais. Um exemplo de aplicação prática será na detecção de cálcio no sangue, ou seja a partir do valor de concentração de cálcio em que é detectada a hipercalcemia 11,5 mg dL^{-1} funcionando como um sensor de alarme de níveis.

O sensor, FPC, dopado com QOH e APTEOS, tal como o sensor anterior, FPB, demonstrou igualmente sensibilidade a catiões metálicos, Ca(II), Cu(II) e ainda ao Fe(III). Esta cavidade exibe também reversibilidade, necessitando de um período de remoção da forma complexada longo (>3horas), que é obtido após lavagem com água desionizada. Este tipo de sensores será importante quando se pretende usar dispositivos descartáveis por periodos de tempo curtos.

Os tempos de resposta e recuperação estimados para os sensores referidos, foram aproximadamente de 5 s.
Da mesma forma, o comportamento de uma cavidade de Fabry-Perot sem revestimento (FP1) adquirirá um resultado em valores de resposta de $\Delta\lambda$ praticamente constantes na ordem de 2,5 picometros quando submerso nas soluções de analito. A resposta resultante, conforme seria esperado, indica uma inércia e impermeabilidade da superfície de sílica ao meio aquoso externo contendo os analitos estudados.

Os sensores desenvolvidos têm comportamento logarítmico ou exponencial. Para FPA, os coeficientes de determinação ajustados são iguais a 0,9939, 0,9938 e 0,9949 para as soluções ácidas de ácido clorídrico, ácido acético e ácido sulfúrico respectivamente. Em meio alcalino, o sensor FPA, obteve um $R^2_{ajustado}$ de 0,9949 e 0,9895 para as soluções de hidróxido de sódio e amoníaco. O sensor, FPB, obteve como $R^2_{ajustado}$ 0,9991, 0,9943 e 0,9798 para soluções de Cu(II), Ca(II) e Zn(II) respectivamente , enquanto que para o sensor dopado com QOH, FPC aqueles valores foram 0,9142, 0,9810 e 0,9895 para soluções de Cu(II), Ca(II) e Fe(III) respectivamente.

Os resultados obtidos indicam que acoplar uma segunda cavidade de Fabry-Pérot sem qualquer tipo de revestimento para controlar a temperatura pode ser utilizado para fazer correcções de temperatura quando o meio envolvente sofre oscilações da mesma.

Finalmente, as medições do estado fisiológico através deste tipo de dispositivos são atractivas devido à sua simplicidade, serem minimamente invasivas, e possibilitarem medição em tempo real numa condição médica. A monitorização óptica não invasiva toma um lugar de importância devido ao uso de luz visível e no infravermelho próximo, operando no interior do organismo de uma pessoa sem ser necessário extrair sangue ou uma amostra de tecido, ou ainda usar um cateter.

Em termos de perspectivas futuras para dar continuidade a este trabalho desenvolvido, apresenta-se de seguida as seguintes sugestões:

- Realização de um maior número de ensaios para determinar a sensibilidade cruzada a outros mensurandos, particularmente temperatura.
- Efectuar testes de toxicidade dos materiais e posteriormente ensaios pré-clinicos e clínicos com amostras reais.
- Ensaios de tempo de vida dos sensores para averiguar com exactidão a melhor aplicabilidade dos mesmos em situações reais.
- Adaptação de equipamento portátil apropriado no que diz respeito ao sistema de interrogação utilizado para este método para minimizar a utilização de equipamentos volumosos.
- O sensor FPA, poderá servir de plataforma para ser utilizado como sensor cuja gama de pH seja adaptável em aplicações de medição de pH em refluxos gastricos continuo na pHmetria esofágica prolongada, assim como na monitorização do pH do sangue.
- O sensor FPB, revelou a existência de uma segunda cavidade de Fabry-Perot no filme sol-gel depositado na ponta da fibra, obtendo-se um interferómetro entre a interface fibra <->sol-gel e sol-gel<->ar, uma vez que o período de variação de comprimento de onda correspondente é bastante maior que o

correspondente á cavidade formada entre a FBG e a interface vidro<->sol-gel. Por este facto seria interessante fazer um estudo de sensores em que é apenas feito o revestimento na ponta da fibra sem FBG. Neste caso não seria necessário introduzir no sensor a escrita laser de uma FBG, o que conduziria a dispositivo de maior simplicidade e menos dispendioso.

CAPITULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

V. Referências Bibliográficas

1 Katzir A., "Laser and Optical Fibers in Medicine", School of Physics and Astronomy Tel Aviv university, Tel Aviv, Israel, ***1993***.

2 Van den Bergh H., "On the evolution of some endoscopic light delivery systems for photodynamic therapy.", Endoscopy.,30(4):392-407, Maio, **1998**.

3 Fang Y., "Non-Invasive Optical Biosensor for Probing Cell Signaling", Review, 7, 2316-2329, Sensors, **2007**.

4 F. Baldini, R. Falciai, A. Mencaglia ,"Miniaturised optical fibre sensor for dew detection inside organ pipes" Journal of sensors Volume 2008 (2008), Article ID 321065, 2-3,**2008**.

5 A. Gomes, A. Lage, Apontamentos da cadeira, "Equipamento Médico e Biosensores – Sensores de Fibra Óptica" do Mestrado em Engenharia Biomédica, **2007**/**2008**.

6 Webster J. G., "Medical instrumentation – Application and design", 3ª edição, **1998**.

7 http://www.rp-photonics.com/optical_fiber_communications.html,"Encyclopedia of Laser Physics and Technology", R.Paschotta, **2008**, (acedido no dia 03-05-08).

8 http://www.eng2.bham.ac.uk/metallurgy/people/Kukureka_Files/FibreOpticsMaterials.pdf, S.Kukureka,, "Fibre Optic Materials", The University of Birmingham, **2007**, (acedido no dia 21-10-08)

9 http://www.clubedohardware.com.br/br/artigos/371, C. Lima, "Introdução às Fibras Ópticas", **2002**, (acedido no dia 12-06-08).

10 http://www.rnp.br/newsgen/0203/fibras_opticas.html, A. L. G. Campos, "Fibras Ópticas- uma realidade reconhecida e aprovada", Boletim Bimestral Rede Nacional de Ensino e Pesquisa, vol. 6, nº2, 1-5, **2002**, (acedido no dia 22-05-08).

11 http://www.wiley-vch.de/berlin/journals/op/08-02/OP0802_S52-S55.pdf, R. Paschota, "Optical Fiber Technology Physical Principles and Applications of Different Types of Optical Fibers", Optik & Photonik, 1, June, **2008**, (acedido no dia 02-05-08).

12 H. G. Limberger, T. Volotinen, W. Griffioen, M. Gadonna, H. G. Limberger, "Reliability of Optical Fibres and Components", Fiber Bragg grating components, Eds. London: Springer Verlag, Cap. 10,**1999.**

13 Araújo, F., "Redes de Bragg em Fibra Óptica, in Physics", Porto, **2000**.

14 K. O. Hill, Y.F., D. C. Johnson, and B. S. Kawasaki, "Photosensitivity in optical waveguides: Application to reflection filter fabrication", Applied Physics Letters, 32, **1978**.

15 G. Meltz, W.W.M., e W. H. Glenn, "Formation of Bragg gratings in optical fibers by a transverse holographic method" Optic Letters, 14, **1989**.

16 http://www.deetc.isel.ipl.pt/jetc05/JETC99/pdf/art_53.pdf, "Sensores de Bragg em Fibra Óptica", O. Frazão, F. M. Araújo, I. Dias, L. A. Ferreira, J. L. Santos 1-3, **2005**, (acedido no dia 21-04-08).

17 http://www.av.it.pt/pandre/pdfs/eng2001_fbg.pdf, "Redes de Bragg para

Telecomunicações", M. Lima, A. Teixeira, O. Frazão, P. André, J. R. Rocha, 1, **2001**, (acedido no dia 13-08-08).

18 A.D. Kersey, M.A. Davis, H.J. Patrick, M LeBlanc, K.P. Koo, C.G. Askins, M.A. Putnamand, E.J. Friebele, "Fiber Grating sensors", Lightwave Technol., 15, **1997**.

19 W.W. Morey, G. Meltz, W.H. Glenn, "Fibre optic Bragg grating sensors", in Fiber Optic and Laser Sensors VII, SPIE, Editor., SPIE: Boston, USA, **1989**.

20 O. Frazão, L. Ferreira, I. Dias, J. Santos, "Sensores de Bragg em Fibra Óptica", in Jornadas de Engenharia de Telecomunicações e Computadores, Lisboa, 4, **2005**.

21 Y.J. Rao, D.J. Webb, D.A. Jackson, L. Zhang, I. Bennion, "In-fiber Bragg-grating temperature sensor system for medical applications", Lightwave Technology, 15, **1997**.

22 F. Yu, S.Y., "Fiber Optic Sensors", Marcel Deker, **2002**.

23 L. Ferreira, "Interrogação de Sensores de Bragg em Fibra Óptica", in Física, Porto, **2000**.

24 X. Wang, J. Xu, Y. Zhu, B. Yu, M. Han, K. L. Cooper, G. R. Pickrell and A. Wang, "An Optical Fiber Tip Pressure Sensor for Medical Applications", Quantum Electronics and Laser Science Conference, **2005**.

25 M.J. Heath, J.D. Owen, S.W. Sanders and K.G. Tolman, "Intragastric pH measurement using a novel disposable sensor", Intensive Care Medicine, 14:232-235, **1988**.

26 A. Leung, P.M. Shankar, R. Mutharasan, "A review of fiber-optic biosensors", Sensors and Actuators B, **2007**.

27 M. Meharab, C. Bis, M. J. Scharer, M. Moo-Young, "Fiber-optic Biosensors – Trends and Advances", Analytical Sciences, 1-4, **2000**.

28 S. A. M. Marzouk, S. Ufer, R. P. Buck, T. A. Johnson, L. A. Dunlap, and W. E. Cascio, "Electrodeposited Iridium Oxide pH Electrode for measurement of Extracellular Myocardial Acidosis during Acute Ischemia", Analytical Chemistry, **1998**.

29 F. Baldini, A. Giannetti, "Optical chemical and biochemical sensors: new trends", Proc. SPIE, Vol: 5826, pp. 485-499, **2005.**

30 F. Baldini, A. Falai, A. R. De Gaudio, D. Landi, A. Lueger, A. Mencaglia, D. Scherr, W. Trettnak, "Continuous monitoring of gastric carbon dioxide with optical fibres", Sensors and Actuators B, Vol: 90, pp. 132-138.

31 M. G. Shylyagin, Pieter L. Swart, S. v. Miridonov, Anatoli A. Chtcherbakov, I. Marquez Borbón, "Static strain measurement with sub-micro-strain resolution and large dynamic range using a twin-Bragg-grating Fabry-Perot sensor", **2002**.

32 C. Yang, C. Zhao, L. Wold, K. R. Kaufman, "Biocompatibility of a physiological pressure sensor", Biosensores & Bioelectronics, **2003.**

33 A. B. L. Ribeiro, J.L.S., J. M. Baptista, L.A. Ferreira, F. M. Araujo, A. P. Leite, "Optical Fiber Technology in Portugal", in Fiber and Integrated Optics, Taylor & Francis, **2005**.

34 A.B.L. Ribeiro, "Esquemas de Multiplexagem de Sensores de Fibra Óptica", in Física, FCUP, Porto, **1996**.

35 S. Silva, "Fibre Bragg Grating Based Structures for Optical Sensing and Filtering", in Physics, FCUP, Porto, **2007**.

36 J.C.C. Carvalho, J. C. W. A. Costa, M.J. Sousa, C. S. Sales, C.R.L. Francês, "Optimização de redes de Bragg em Fibra usando algoritmos genéticos", Journal of Microwaves and Optoelectronics, **2005**.

37 S. F. O. Silva, O.F., P. Caldas, J. L. Santos, F. M. Araújo, L. A. Ferreira, "Fibre Refractometer based on a Fabry-Pérot Interferometer", in OFS - 19th International Conference on Optical Fiber Sensors: Pert – Austrália, **2008**.

38 J. Elster, "Long Period Grating-Based pH Sesnors for Corrosion Monitoring", The Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University Virginia, **1999**.

39 http://www.micronoptics.com/uploads/library/documents/Micron%20Optics%20Optical%20Sensing%20Guide.pdf, "Optical Fiber Sensors Guide Fundamentals & Applications", micron Optics, 3-5, (acedido no dia 12-05-08).

40 www.bdtd.ufscar.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=463, "Dispersão Dieléctrica em Materiais Ferroeléctricos", **2004**.

41 E. J. Nassar, K. J. Ciuffi, "Filmes de Titânio–Silício preparados por "Spin" e "Dip-coating"", Química Nova, **2003**.

42 F. Baldini, A.N.C., J. Homola and S. Martelucci, "Optical Chemical Sensors" N. Science Springer. ed., **2006**.

43 P. C.A. Jerónimo, M. Conceicão, B.S.M. Montenegro, "Optical sensors and biosensors based on sol–gel films Talanta", 72, **2007**.

44 C. Huber, C. Krause, T. Werner, T. Mayr, O. S. Wolfbeis, "Optical sensor for seawater salinity", Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 368(196), **1999**.

45 D. MacCraith, C. McDonagh, "Enhanced Fluorescence Sensing Using Sol-Gel Materials Brian", Journal of Fluorescence, Vol. 12, Nos. 3/4, December, **2002**.

46 N. A. Carrington, Z. Xue, "Inorganic Sensing using Organofunctional Sol-gel Materials", Acc. Chem. Res., 40, 343-350, **2007**.

47 C. McDonagh, P.B., K. Mongey and B. D. MacCraith, "Characterisation of porosity and sensor response times of sol-gel-derived thin films for oxygen sensor applications", Journal of non-crystalline solids, 306(2), **2002**.

48 Xi Chen, et al., "Characterization of ormosil film for dissolved oxygen-sensing", Sensors and Actuators B, 87, 233-238, **2002**.

49 L. L. Hench, J. K. West, "The Sol-Gel Process Chem. Rev.", 90, 33-72, **1990**.

50 K. C. Dee, D. A. Puleo, R. Bizios, "An Introdution To Tissue-Biomaterial interactions", A John Wiley & Sons, Inc., Publication, **2002**.

51 J. M. Anderson, "Biological Responses to Materials", Annu. Rev. Mater, 97-100, Res. **2001**.

52 http://perfline.com/livro/download/Fdm_CEC_cap_00.pdf, "Fundamentos da Circulação Extracorpórea", Maria Helena L. Souza, 2º ed., 148-151, **2006**, (acedido em 03-09-2008).

53 A. L. Andrade, R. Z. Domingues, "Ceramicas Bioactivas – Estado da Arte", Química Nova, 101, **2006**.

54 http://www.enchantedlearning.com/subjects/anatomy/digestive/, "Human Digestive System", (acedido em 24-10-2008).

55 http://www.umm.edu/graphics/images/es/19223.jpg, (acedido em 13-11-2008)

56 "ABC do Corpo Humano", Selecções do Reader's Digest, S.A, versão portuguesa, 242-245, **1989**.

57 http://users.med.up.pt, R. Fontes, "Digestão e absorção de lipídeos e proteínas", **2007**, (acedido em 14-07-2008)

58 R. Chang, " Química", 5ª edição, McGrawHill, 738-739, **1994**.

59 http://www.notapositiva.com/trab_estudantes/trab_estudantes/fisico_quimica/fisico_quimica_trabalhos/ph.htm, A. Baptista, Escola Secundária de Póvoa de Lanhoso, **2007**, (acedido em 12-12-2008)

60 S. A. M. Marzouk, L. A. Dunlop, S. Ufer, R. Buck, T. Johnson, W. Cascio, " Electrodeposited Iridium Oxide pH Electrode for Measurement of Extracellular Myocardial Acidosis during Acute ischemia", Anal. Chem., 70, 5054-5061, **1998**.

61 http://cyberdiet.terra.com.br/cyberdiet/colunas/030725_nut_saisminerais.htm,"A Importância dos Sais Minerais para o Organismo", (acedido em 12-12-2008).

62 Enciclopédia Geográfica Selecções Reader´s Digest, vol.5, 76, **1988**.

63 http://www.fepecs.edu.br/revista/artigo7_3.pdf, "Papel adverso do ferro no organismo", artigo de revisão, E.M.A. Siqueira, S. G. Almeida, S. Arruda, 230, **2006**, (acedido em 08-07-2008).

64 http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisas/pesquisa.php?ref_pesquisa=137, "Pesquisa estuda uso de Imagens por Ressonância Magnética para determinar o excesso de ferro nos tecidos ", (acedido em 15-09-2008).

65 M. B. Zemel, "Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management", American Journal of Clinical Nutrition, Vol 79. No 5, 9078-912S, **2004**.

66 M. B Zemel, H. Shi, B. Greer, D. DiRienzo, P.C. Zemel, "Regulation of adiposity by dietar calcium", 14: 1132-8FASEB J, **2000**.

67 M.S. Buchowski, J. Semnya, A.O. Johnson, "Dietary calcium intake in lactose maldigesting intolerant and tolerant African-American women". J Am Coll Nutr 21:47-54, **2002**.

68 E.L. Melanson, T.A. Shart, J. Schneider et al., "Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans", Int J Obes Relat Metab Disord 27:196-203, **2003**.

69 M.A. Pereira, D.R. Jacobs, L. Van Horn et al., "Dairy consumption, obesity, and the insulin resístanse syndrom in young adults", The CARDIA study. JAMA 287:2081-9, **2002**.

70 http://www.procobre.org/pr/pdf/01_saude04_pr.pdf, "Doenças causadas por falta ou excesso de cobre", PRO Cobre, Connects Life, (acedido em 16-12-2008).

71 Casarett, Doull's., "The Basic Science of Poisons", 6th edition. New York: McGraw-Hill, 840-841, **2001**.

72 L.S. Nelson, "Toxicologic Emergencies", 7th edition. New York: McGraw-Hill 1262-1271, **2002**.

73 D.G. Barceloux, "Copper. J Toxicol Clin Toxicol", 37 (2): 217-230, **1999**.

74 www.nap.edu/openbook/0309069394 , "Health effects of excess copper. Copper in DrinKing Water", The National Academy of Sciences, (acedido em 01-07-2008).

75 L.P. James, C.D. Stowe, E. Argao, "Gastric Injury Following Copper Sulfate Ingestion", Pediatric Emerg Care, 15 (6): 429-431, **1999**.

76 L. J. Dunne, "Nutrition Almanac", 3rd ed. New York, McGraw-Hill, 91, **1990**.

77 J. Constantinidis, "Treatment of Alzheimer's disease by zinc compounds", Drug Develop Res, 27, 1-14, **1992**.

78 http://www.epidem.com/pt/re/epidemiology/abstract.00001648-200605000-00017.htm;jsessionid=JDzZCQftXvNJGGHVG1n2MP1ZvsynHQGJC31JyTyc92Wnq94KFb6K!-348297060!181195629!8091!-1, "Epidemiology", 17 (3): 308-314, Maio **2006**, (acedido em 19-09-2008).

79 "Níveis plasmáticos de zinco e antropometria de crianças da periferia de centro urbano no Brasil", Rev. Saúde Pública v.24 n.1 São Paulo, Fev., **1990**.

80 R. L. Dutra, "Determination of Zinc in Blood Serum by FAAS and Its Correlation with the Stress Condition", Saúde Rev., Piracicaba, 6(14): 31-37, **2004**.

81 K.C. Vrancken, P. Van Der Voort, K. Possemiers' E.F. Vansant**,** "Surface and Structural Properties of Silica Gel in the Modification with γ-Aminopropyltriethoxysilane ",Journal of Colloid and Interface Science, Volume 174, Issue 1, 1 September, 86-91, **1995**.

82 G. Herlem, O. Segut, A. Antoniou, C. Achilleos, D. Dupont, V. Blondeau-Patissier, T. Gharb, "Electrodeposition and characterization of silane thin films from APTES", **2007**.

83 Kamiya, A.; Oka, A.; Nasu, H.; Hashimoto, T., *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 19, 495-499, **2000**.

84 (http://www.lifecuritiba.com.br/phmetria.htm) (acedido em 06-11-2007).

85 http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000428032008000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en, "Posicionamento do sensor de pHmetria esofágica prolongada, Roberto Oliveira Dantas", Arq. Gastroenterol.vol.45, no.4, São Paulo, Oct./Dec., **2008**, (acedido em 21-03-2008).

86 http://www.gidoctors.com/Emanometry/Emanometry.htm," Esophageal Manometry and Ambulatory Esophageal pH Testing", (acedido em 14-11-2008).

87 J.Lee, I. Yeo, C. H. Pyun, "Pulsed Amperometric Detection of Metal Ions Complexing with EDTA in a Flow Injection System", Corean Chem. Soc., Vol. 18, No.3, **1997**.

88 M. A. Zaitoun and C. T. Lin, "Chelating Behavior between Metal Ions and EDTA in Sol-Gel Matrix", J. Phys. Chem. B, 101, 1857-1860, **1997**.

89 T. Nishide, M. Sato, H. Hara, "Crystal structure and optical property of TiO2 gels and films prepared from Ti-Edta complexes as titania precursors", Journal of Materials Science, 35, 465-469, **2000**.

90 K. S. Oka, J.D. Mackenzie, A.K. Cheetham, C. J. Brinker, M. L. Mecartney, C. Sanchez, "Proceedings of the Materials Research Society Symposium 346", Materials Research Society: Pittsburgh, PA, 323, **1994**.

91 http://www.biotecnicaltda.com.br/uso/instuso_anticoagulante.pdf, "Instruções de uso – anticoagulantes", Biotécnica, Biotecnologia avançada, **2007**, (acedido em 03-23-2008).

92 http://www.portalmedico.org.br/pareceres/cfm/1987/14_1987.htm, "CMF -PARECER CFM Nº. 014/87", **1987**, (acedido em 11-11-2008).

93 E. J. Yamada, A. F. P. Souto, E. E. O. Souza, C. A. Nunes, C. P. Dias, "Pseudothrombocytopenia in a Patient Undergoing Splenectomy of an Accessory Spleen. Case Report", Rev Bras Anestesiol, Informação Clínica, 58, 5, 485-491, **2008**.

94 J. C. Biernat, F. Santos, A. M. G. Santos, Á. A. Raubach, M. E. L. Souza, M. S. S. Demin, D. Kochhann, M. S. Biernat, "Contamination of Dialysis Catheter Lumen :Prevention and Treatment with M-EDTA", J Bras Nefrol;30(2):105-12, **2008**.

95 http://www.manualmerck.net/?url=/artigos/%3Fid%3D163%26cn%3D1287, "Altas concentrações de cálcio", Manual Merck, (acedido em 05-12-2008).

96 "ABC do Corpo Humano", Selecções do Reader's Digest, 264 -265,**1987**.

97 M.R. Nelson, W.J. Chazin, "Calmodulin as a calcium sensor" in Calmodulin and Signal Transduction L.J. Van Eldik and D.M. Watterson, eds. Academic Press, San Diego, 17-64, **1998**.

98 http://www.structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/pic_gallery/ca_coord/cam_chapter4.html ,"Hydrogen Bond Network in Calcium-Binding Loops of Calmodulin", (acedido em 16-04-2008).

99 R. Lebre, V. Ruiz, S. Leitão, A. Santos, R. Santos, A. Porto, "Acute poisoning with Copper Sulphate: a clinical case", Medicina Interna – Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna, Vol.12, Nº 4, **2005**.

100 S. J. A. Pope, R. H. Layeb, "Design, synthesis and photophysical studies of an emissive, europium based, sensor for zinc", The Royal Society of Chemistry 3108–3113, **2006**.

101 Z. Rosenzweig, N. Rosenzweig, G. Crivat, "Advances in zinc sensors for studying zinc release events from pancreatic cells", Smart Medical and Biomedical Sensor Technology IV. Edited by Cullum, Proceedings of the SPIE, Volume 6380, 638002, **2006**.

102 http://www.webmd.com/a-to-z-guides/calcium-ca-in-blood?page=2**,** (acedido em 29-09-2008).

103 http://jcsp.org.pk/contents/Volume27-ISSUES/jcsp-v27-5-a5.pdf, "8- Hydroxyquinoline as a Complexing Reagent for the Determination of Cd(II) in Micellar Medium", G. A. SHAR, G. A. SOOMRO, Jour.Chem.Soc.Pak. Vol. 27, No. 5, **2005,** (acedido em 21-12-2008).

104 L. C. Azevedo, M. A. A. Azeredo, "Utilização da 8-Hidroxiquinolina em Técnicas de Pré-concentração de iões Metálicos em Colunas", Química Nova, 19 (4), **1996**.

105 R. H. Uibel, J. M. Harris, "Templating of multiple ligand metal ion complexation sites in 8-hydroxyquinoline-modified silica sol-gel materials investigated by in situ Raman spectroscopy" , Anal Chem.;77(4):991-1000, Feb 15, **2005**.

106 L. B. Gerson, G. Triadafilopoulos, P. Sahbaie, W. Young, S. Sloan, M. Robinson, P. B. Miner, J. D Gardner, "Time esophageal pH < 4 overestimates the prevalence of pathologic esophageal reflux in subjects with gastroesophageal reflux disease treated with proton pump inhibitors", BMC Gastroenterology 8:15, **2008**.