

GRAÇA MARIA HENRIQUES MINAS

**MICROSSISTEMA LABORATORIAL PARA
ANÁLISE DE FLUIDOS BIOLÓGICOS**

Tese submetida na Universidade do
Minho para obtenção do grau de
Doutor em Electrónica Industrial

Universidade do Minho
2004

Tese realizada sob a orientação científica do Doutor José Higinio Gomes Correia e co-orientação do Doutor Júlio Manuel de Sousa Barreiros Martins, ambos Professores Associados do Departamento de Electrónica Industrial da Universidade do Minho.

Este trabalho de Doutoramento foi apoiado financeiramente pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) com uma bolsa de Doutoramento (SFRH / BD / 1281 / 2000) no âmbito do Programa Operacional Ciência, Tecnologia e Inovação (POCTI – Formar e Qualificar – Medida 1.1).

RESUMO

Os médicos prescrevem análises a fluidos biológicos que são realizadas em laboratórios de análises clínicas. Todo este processo é moroso em termos de tempo, não permitindo ao médico um diagnóstico fidedigno na hora da consulta. Para além da demora, existem ainda problemas de possíveis enganos logísticos, tais como a etiquetagem errada ou a perda de amostras, o que pode atrasar significativamente o diagnóstico. Para analisar fluidos biológicos existem, em ambiente laboratorial, equipamentos sofisticados. Contudo, esses equipamentos utilizam grandes quantidades de reagentes e são economicamente dispendiosos. Fora do ambiente laboratorial existem, comercialmente disponíveis, as chamadas “fitas reagentes”. Porém, são poucas as biomoléculas que permitem analisar e a leitura manual da cor não é precisa.

Esta tese descreve a concepção, fabrico e teste de um microsistema laboratorial, denominado de “Microlab”, para aplicação em análises clínicas, especialmente para análises a fluidos biológicos. Permite medir a concentração de biomoléculas nesses fluidos. A medição baseia-se na detecção colorimétrica por absorção óptica, usando luz branca como fonte de luz, evitando assim o recurso a uma fonte de luz monocromática específica. Esta característica torna-o um dispositivo portátil capaz de efectuar a análise em tempo real, sem recorrer a sistemas complexos e economicamente dispendiosos.

O Microlab combina numa construção modular o sistema de microfluidos fabricado em vidro, o sistema de filtragem óptica fabricado pela deposição de uma estrutura de multicamadas de filmes finos de materiais dieléctricos, e o sistema de detecção e leitura fabricado segundo um processo de microelectrónica *standard* CMOS. Para ser utilizado, um feixe de luz branca é direccionado para microcanais nos quais se encontram as amostras a medir. Esse feixe, com várias componentes espectrais, é filtrado, através de filtros ópticos, obtendo-se uma banda muito estreita com apenas algumas componentes espectrais e centrada no comprimento de onda adequado à biomolécula que se pretende analisar. A intensidade da luz associada às diferentes componentes espectrais é proporcional à concentração das biomoléculas em análise. É medida através de fotodetectores colocados por baixo dos microcanais e alinhados verticalmente com os filtros ópticos. Um conversor luz - frequência foi integrado com os fotodetectores para converter o sinal analógico num sinal digital.

O Microlab foi testado eficazmente na determinação quantitativa de ácido úrico na urina.

ABSTRACT

For diagnostic reasons patients in a hospital are often subjected to biochemical analysis of their biological body fluids. Usually the analyses are carried out in clinical laboratories and the results become available after several hours, sometimes days. As a consequence a reliable diagnosis cannot be performed within the consultation time. Mistakes in the logistics, such as lost samples and mislabeling, may further delay diagnosis. The automated equipment used in a state-of-the-art laboratory reduces errors, but use high sample and reagent volumes, making the analysis systems expensive and does not contribute to patient comfort. Outside the laboratory environment, reagent strips are commercially available. Such strips are available for a limited set of biomolecules to be analyzed and the color readout is merely qualitative.

This thesis describes the concept, fabrication and characterization of a laboratorial microsystem, called “Microlab”, for application in clinical analysis, especially in biological fluid analysis. It allows the measurement of the concentration of biomolecules in those fluids. That measurement is based on colorimetric detection by optical absorption, using a white light source for illumination, thus avoiding the use of a wavelength dependent light source and enabling parallel processing for the simultaneous detection of several biomolecules. This characteristic makes the Microlab portable and ensures that the analysis can be performed at any location with instantaneous results, without the use of complex and expensive analysis systems.

The Microlab combines in a multichip module the microfluidic system fabricated in glass, the optical filtering system fabricated using a dielectric thin-films multilayer and the detection and readout system fabricated in a CMOS micro-electronic process. Operation is based on a white light beam guided through the microchannels containing the samples to analyze. The impinging light is filtered by the optical filters, to a narrow spectral band centered at the wavelength for which the biomolecule being analyzed has its absorption maximum. The intensity of the selected spectral component transmitted through the fluid is measured using underlying photodetectors, vertically aligned with the optical filters. This optical intensity is proportional to the biomolecule concentration. A light-to-frequency converter was integrated with the photodetectors to convert the analog signal into a digital signal. The Microlab’s performance was demonstrated in the quantitative measurement of uric acid concentration in urine.

SAMENVATTING

Om diagnostische redenen worden bij patiënten in een ziekenhuis vaak de biologische vloeistoffen van het lichaam (bloed, urine, etc.) biochemisch onderzocht. In het algemeen worden deze analyses in klinische laboratoria uitgevoerd en de resultaten komen pas na geruime tijd beschikbaar. De diagnose kan daardoor niet in de consultatietijd worden gesteld. Fouten in de logistiek, zoals zoekraken van buisjes en verwisseling van labels geeft aanleiding tot verdere vertraging. Geautomatiseerde apparatuur is algemeen beschikbaar en kan deze problemen aanzienlijk reduceren, maar in het algemeen is een relatief groot volume aan lichaamsvocht en testvloeistof nodig voor een analyse, wat de kosten van de analyse en het ongemak van de patiënt doet toenemen. Buiten de laboratoriumomgeving zijn testkaartjes commercieel beschikbaar. Deze kaartjes zijn slechts beschikbaar voor een beperkt aantal biomoleculen en het meetresultaat is kwalitatief.

Dit proefschrift beschrijft het basisprincipe, fabricage en karakterisatie van een biochemisch microsysteem (microlab) voor klinische analyse van met name biologische vloeistoffen. De meting van de concentratie van biomoleculen in deze vloeistof blijkt mogelijk op basis van colorimetrische detectie, via optische absorptie van licht van een goed gedefinieerde golflengte en bepaald door het soort biomolecuul. De optische filters in het microlab maken het gebruik van een simpele witte (breedbandige) lichtbron mogelijk en bieden potentieel voor de parallelle detectie van de concentratie van een aantal biomoleculen. De afmetingen van het microlab zijn zodanig, dat een portabel systeem mogelijk is en het resultaat van de analyse direct beschikbaar komt, zonder tussenkomst van complexe apparatuur.

Het microlab combineert in een multi-chip systeem het "microfluidic" systeem, gefabriceerd in glas, het optische filter, gefabriceerd met gestapelde dielektrische dunne films en de detector en uitleesschakeling in CMOS. De microkanalen met vloeistof worden beschenen met wit licht. Het licht wordt gefilterd door de biomoleculen, de dielektrische interferentiefilters en de intensiteit wordt gedetecteerd in een onderliggende fotodetector. Door de doorlaatband van het dielektrische filter gelijk te kiezen aan de absorptiepiek van een gekozen biomolecuul, kan de concentratie van dat betreffende biomolecuul worden bepaald. Een lichtintensiteit-naar-frequentie omzetting wordt in de uitlezing uitgevoerd om op eenvoudige wijze de fotostroom om te zetten naar een digitaal signaal. De werking van het microlab is aangetoond via de kwantitatieve meting van de concentratie van "uric acid" in urine.

Agradecimentos

A autora deseja manifestar o seu mais sincero agradecimento a todas as instituições e pessoas que, com a sua valiosa colaboração, contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao Doutor José Higinio Gomes Correia e ao Doutor Júlio Manuel Barreiros de Sousa Martins, tenho a agradecer a orientação científica, o incentivo, as sugestões e discussões sempre tão oportunas, a confiança e o apoio constantes ao longo de todo o trabalho. Tenho ainda a agradecer-lhe as sugestões feitas durante a escrita da tese e revisão final.

Ao Doutor Reinoud F. Wolffenbuttel, pelas discussões técnicas que em muito contribuíram para a execução do trabalho.

Aos colegas da Delft University of Technology, Fac. ITS Dept. Microelectronics, que pelas suas competências técnicas sugestões e amizade contribuíram significativamente para este trabalho. Especialmente ao Eng.º Ger de Graff, pelas discussões e aspectos práticos sobre a microelectrónica, ao Doutor Davies William de Lima Monteiro pela valiosa colaboração e disponibilidade na realização de algumas experiências em Delft, ao Eng.º LuKasz Paluka que dispôs do seu tempo para efectuar as fotografias no SEM e ao Eng.º Peter Turmezei pela sua disponibilidade na demonstração das técnicas de SU-8.

Agradeço à Doutora Susana Freitas do INESC-MN pelo fabrico dos filtros ópticos. Ao Doutor Paulo Freitas e Doutor João Pedro Conde pelas condições materiais postas à disposição no fabrico dos filtros ópticos. Tenho ainda a agradecer à Eng.ª Filipa Fixe pela disponibilidade e apoio nas medições dos filtros ópticos no INESC-MN.

É meu desejo expressar o meu reconhecimento pela valiosa colaboração e ajuda do Doutor João Pedro Alpuim nas deslocações e trabalhos no INESC-MN.

À Doutora Cristina Pereira e Cristóvão Lima, agradeço o entusiasmo e empenho demonstrados nas medições por espectrofotometria. Ao Doutor Mário Rui agradeço a utilização do espectrofotómetro nos ensaios macroscópicos.

Agradeço ao Doutor José Carlos Fernandes Teixeira as condições materiais postas à disposição na caracterização dos fluidos biológicos e à Eng.^a Amélia Costa pela ajuda na obtenção dessas características.

À Doutora Filomena Oliveira Soares agradeço a colaboração prestada durante a escrita da tese e revisão crítica da mesma.

Ao Eng.^o José Carlos Ribeiro agradeço a parceria nos trabalhos realizados.

Aos restantes colegas, técnicos e secretárias do Departamento de Electrónica Industrial o meu sincero agradecimento pela amizade, paciência, bom ambiente e trocas de impressões no decorrer do meu trabalho. Em particular ao Doutor José Gerardo Rocha pela valiosa colaboração na realização de algumas experiências e pelo apoio quando da estadia em Delft.

À Eng.^a Isabel Maria Ferreira da Costa Soares de Barros, ao Doutor João Luiz Afonso, à Dr. Bárbara Joana Henriques e ao Eng.^o Vítor Arnaldo Freitas Vieira, agradeço as sugestões, disponibilidade e a palavra amiga que sempre dispensaram. À Ruth Stephanie Berger agradeço o apoio e amizade que em muito contribuíram para superar os momentos de aperto em Delft.

Aos meus pais, agradeço o carinho e o apoio constante que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de uma forma directa ou indirecta, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero obrigado.

Índice

Lista de figuras	xxi
Lista de tabelas	xxix
Lista de símbolos	xxxii
Lista de acrónimos e termos.....	xxxv
1 Introdução	1
1.1 Análise de fluidos biológicos	1
1.1.1 Conceito de fluido biológico	1
1.1.2 Biomoléculas medidas nos fluidos biológicos	2
1.1.3 Laboratórios de análises clínicas	3
1.1.4 Microssistemas de análise de fluidos biológicos.....	6
1.1.5 Microssistemas de análise de fluidos biológicos: estado da arte.....	8
1.2 Motivação e objectivos.....	21
1.2.1 Conceito de microssistema de fluidos biológicos	21
1.2.2 Microssistema laboratorial para análise de urina: Microlab.....	22
1.3 Organização da tese	25
Bibliografia	26
2 Detecção colorimétrica na quantificação de biomoléculas na urina.....	31
2.1 Urina.....	31
2.1.1 História	31
2.1.2 Formação da urina	32

2.1.3	Composição da urina.....	32
2.1.4	Importância clínica da proteinúria e albuminúria	33
2.1.5	Importância clínica do ácido úrico na urina.....	34
2.2	Biomoléculas em pequenos volumes de urina.....	35
2.2.1	Dimensão de uma molécula de albumina	35
2.2.2	Dimensão de uma molécula de ácido úrico	36
2.3	Deteção por espectrofotometria.....	36
2.3.1	Espectro electromagnético	36
2.3.2	Análise quantitativa na gama da luz visível.....	38
2.3.3	Absorção na gama da luz visível.....	40
2.3.4	Cálculo da Concentração	41
2.4	Conclusão	42
	Bibliografia.....	42
3	Sistema de microfluidos.....	45
3.1	Análise das características dos sistemas de microfluidos	45
3.1.1	Propriedades dos fluidos num microsistema e num sistema macroscópico	45
3.1.2	Misturadores	46
3.1.3	Cinética química	46
3.1.4	Caracterização do fluxo	47
3.1.5	Difusão.....	48
3.2	Método dos elementos finitos.....	48
3.2.1	Rede de elementos finitos	49
3.2.2	Fundamentos do FEM.....	50
3.2.3	Uso de programas de elementos finitos	50
3.3	Modelo computacional da dinâmica do fluido.....	51
3.3.1	Geometria do misturador	51
3.3.2	Simulação numérica.....	52
3.3.3	Propriedades dos fluidos	53
3.4	Resultados da simulação	54
3.4.1	Concentração de 80 mg/l de ácido úrico na urina	55
3.4.2	Concentração de 1200 mg/l de ácido úrico na urina	57

3.4.3 Aumento da velocidade de fluxo.....	59
3.4.4 Diminuição da largura dos canais.....	60
3.5 Conclusão.....	61
Bibliografia	61
4 Filtros ópticos	63
4.1 Filtros ópticos baseados em filmes finos	63
4.2 Fundamentos da propagação da onda	65
4.2.1 Amplitude da onda	66
4.2.2 Polarização	68
4.2.3 Condições de fronteira.....	70
4.3 Propriedades das estruturas com filmes finos.....	70
4.3.1 Notação.....	70
4.3.2 Caminho óptico	71
4.3.3 Equações na interface entre dois filmes	72
4.3.4 Coeficientes de reflexão e transmissão.....	73
4.3.5 Coeficiente de absorção.....	75
4.4 Aplicação do método a uma interface	76
4.5 Aplicação do método a um único filme num substrato.....	78
4.5.1 Filme dieléctrico	78
4.5.2 Filme metálico	80
4.6 Aplicação do método a uma estrutura multicamada de filmes finos dieléctricos	82
4.7 Projecto do filtro óptico.....	84
4.7.1 Selectividade de um filtro passa-banda	84
4.7.2 Canal óptico.....	85
4.7.3 Requisitos para o espectro de transmissão do filtro óptico	86
4.7.4 Escolha dos materiais	86
4.7.5 <i>Software</i> de simulação de filmes finos	88
4.7.6 Simulações ópticas	88
4.8 Projecto da matriz de filtros ópticos	92
4.8.1 Princípio	92

4.8.2	Requisitos para o projecto da matriz de filtros ópticos.....	93
4.8.3	Simulações ópticas da matriz de filtros ópticos.....	94
4.9	Conclusão	99
	Bibliografia.....	100
5	Fotodetector e electrónica em tecnologia CMOS.....	103
5.1	Tecnologia CMOS <i>standard</i> em silício.....	103
5.2	Fotodetectores em tecnologia CMOS.....	104
5.2.1	Fotodíodos em silício.....	104
5.2.2	Fototransístor em silício.....	109
5.2.3	Fotodíodos <i>versus</i> fototransístor.....	110
5.3	Projecto do fotodíodo em silício	111
5.3.1	Escolha do fotodíodo	111
5.3.2	Estrutura do fotodíodo	112
5.3.3	Simulação da resposta espectral do fotodíodo com as camadas dieléctricas da tecnologia CMOS <i>standard</i>	113
5.4	Electrónica de leitura e de conversão	114
5.5	Conclusão	116
	Bibliografia.....	116
6	Fabrico do Microlab	119
6.1	Sistema de microfluidos	119
6.2	Sistema de filtragem óptica.....	121
6.2.1	Processo de deposição.....	121
6.2.2	Configuração das máscaras.....	122
6.2.3	Sequência de fabrico	123
6.3	Sistema de detecção e leitura	126
6.4	Sistema completo	129
6.5	Conclusão	129
	Bibliografia.....	130

7	Resultados experimentais.....	131
7.1	Detecção da concentração de biomoléculas em pequenos volumes de urina	131
7.1.1	Método utilizado e equipamentos de medida	132
7.1.2	Teste da proteína total	133
7.1.3	Teste do ácido úrico.....	134
7.1.4	Espectro de absorvência da proteína total	136
7.1.5	Espectro de absorvência do ácido úrico	137
7.2	Instalação experimental.....	138
7.3	Sistema de filtragem óptica	141
7.4	Sistema de detecção e leitura.....	143
7.4.1	Fotodetectores.....	143
7.4.2	Electrónica de leitura.....	148
7.5	O Microlab na determinação da concentração de proteína total e ácido úrico na urina	150
7.5.1	Medição da proteína total na urina	151
7.5.2	Medição do ácido úrico na urina	153
7.6	Conclusão.....	158
	Bibliografia	159
8	Conclusões e trabalho futuro.....	161
8.1	Conclusões	161
8.2	Trabalho futuro.....	163
	Bibliografia	165
Anexos		
	Anexo I - Informações essenciais e requisitos das análises por detecção colorimétrica	A - 3
	Anexo II - Índices de refração do SiO₂ e do TiO₂	A - 11
	Anexo III - Especificações técnicas de filtros ópticos passa-banda da Schott	A - 15

Anexo IV - Principais esquemas da electrónica de leitura	A - 21
Anexo V - Sequência de fabrico da estrutura multicamada da Tabela 4.6	A - 25
Anexo VI - Especificações técnicas do fotodíodo comercial S1336-5BQ da <i>Hamamatsu</i>	A - 29
Anexo VII -Constantes físicas, eléctricas e prefixos nas unidades de engenharia	A - 35

Lista de figuras

Figura 1.1:	(a) Clinitek Atlas (cortesia da Bayer Diagnostics, Elkhart, In.); (b) Model 500 Workstation (cortesia da International Remote Imaging Systems, Chatsworth, CA.) [2].	5
Figura 1.2:	Uma fita reagente comercial [5].	6
Figura 1.3:	<i>Chip</i> descartável da Nanogen [17].	10
Figura 1.4:	Imagem SEM (<i>Secondary Electron Microscopy</i>) das micro câmaras em silício para a PCR [19].	10
Figura 1.5:	Esquema do conceito de PCR de fluxo contínuo [20].	11
Figura 1.6:	Vista de topo de parte do <i>chip</i> para amplificação de DNA utilizando a técnica de PCR de fluxo contínuo [21].	11
Figura 1.7:	(a) Esquema dos 96 canais do microssistema para a sequência do DNA; (b) vista em corte; (c) vista pormenorizada da parte de injecção; (d) vista pormenorizada das curvas [22].	12
Figura 1.8:	Suportes e colunas microfabricados para cromatografia. Os pilares mais pequenos têm $5 \times 5 \times 10 \mu\text{m}$, com canais entre pilares de largura de $1.5 \mu\text{m}$ [23].	13
Figura 1.9:	(a) Esquema dos canais; (b) Fotografia do ponto de intersecção dos 4 canais, a largura dos canais é de $30 \mu\text{m}$ [24].	14
Figura 1.10:	(a) Esquema do microssistema fabricado em vidro. Os canais têm $30 \mu\text{m}$ de profundidade. O canal de separação tem $120 \mu\text{m}$ de largura e o de injecção $150 \mu\text{m}$; (b) mecanismo para separar e identificar proteínas [33].	14
Figura 1.11:	(a) Esquema; (b) vista em corte da área de reacção e detecção; (c) fotografia do microssistema e fotografia ampliada das moléculas no microssistema [34].	15
Figura 1.12:	Fotografia do microssistema comparada com uma agulha de seringa [36].	16

Figura 1.13: Desenho esquemático do microsistema em vidro para electroforese capilar: (a) operação de carregamento das amostras; (b) operação de electroforese [37].	17
Figura 1.14: Desenho esquemático do microsistema. Os canais têm uma profundidade de 12.1 μm , e uma largura de 51.0 μm . Os eléctrodos de referência e os auxiliares (não visíveis na figura) estão localizados no reservatório de detecção [38].	17
Figura 1.15: Fotografia do dispositivo completo [39].	18
Figura 1.16: (a) Diagrama esquemático do protótipo do microsistema no qual os sensores ISFET estão incluídos; (b) fotografia do microsistema fabricado [40].	18
Figura 1.17: Configuração do microsistema para electroforese [42].	19
Figura 1.18: Esquema ilustrativo dos canais em PMMA no microsistema [43].	19
Figura 1.19: Fotografia do dispositivo Urisys1100 [44].	21
Figura 1.20: Esquema da estrutura do Microlab para um canal óptico individual, vista em corte.	23
Figura 1.21: Esquema do Microlab.	24
Figura 1.22: Fotografia do Microlab.	25
Figura 2.1: Espectro electromagnético [6].	37
Figura 2.2: Alteração no espectro de absorção: (a) espectro da biomolécula a quantificar; (b) espectro da mistura da biomolécula A com cromóforo para ser quantificado por colorimetria.	39
Figura 2.3: Alteração no espectro de absorção: (a) espectro da biomolécula a quantificar; (b) alteração do espectro para desviar o máximo da absorvência da biomolécula A para C.	39
Figura 2.4: Diagrama de níveis de energia com algumas das alterações de energia que ocorrem durante a absorção, para uma espécie molecular.	40
Figura 2.5: Atenuação da intensidade da luz devido a uma solução absorvente.	41
Figura 3.1: Um esboço das actividades em torno da molécula em análise. A molécula move-se com uma certa velocidade na amostra enquanto que o reagente efectua a ligação (governado pela cinética).	47
Figura 3.2: Rede de elementos finitos.	49
Figura 3.3: Esquema da mistura de fluidos por aceleração centrípeta.	51
Figura 3.4: Geometria do misturador.	52
Figura 3.5: Sistema de microfluidos no qual se visualiza a rede de elementos finitos utilizada.	53

Figura 3.6:	Simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com 80 mg/l de ácido úrico. O gráfico ilustra o perfil da viscosidade do modelo.....	55
Figura 3.7:	Simulação do perfil do vector da velocidade do fluxo.	56
Figura 3.8:	Perfil do vector da velocidade do fluxo na zona de entrada da câmara de detecção.	56
Figura 3.9:	Simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com 1200 mg/l de ácido úrico. O gráfico ilustra o perfil da viscosidade do modelo.	57
Figura 3.10:	Vista frontal da simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com (a) 80 mg/l de ácido úrico; (b) 1200 mg/l de ácido úrico.....	58
Figura 3.11:	Processo de mistura incompleto devido ao aumento da velocidade do fluxo para 1.5 μ l/s. O padrão de urina tem 80 mg/l de ácido úrico.	59
Figura 3.12:	Simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com 1200 mg/l de ácido úrico e com uma largura dos canais de 100 μ m. O gráfico ilustra o perfil da viscosidade do modelo.	60
Figura 4.1:	Esquema de um filme fino.....	64
Figura 4.2:	Estrutura de multicamadas de filmes finos.....	65
Figura 4.3:	Definição das polarizações p e s . A luz incide no plano xz com um ângulo θ relativamente ao eixo dos zz . Os vários vectores \mathbf{E} estão representados.	68
Figura 4.4:	Definições dos parâmetros para uma estrutura multicamada de filmes finos. Por simplicidade, a direcção de propagação de cada onda está simplesmente indicada como para a esquerda ou como para a direita e nem os ângulos θ_j nem a espessura dos filmes estão representados.	71
Figura 4.5:	Distância entre as frentes de onda (x), usada no cálculo do caminho óptico.	72
Figura 4.6:	Reflectância de uma superfície de vidro em função do ângulo incidente, para a polarização s e p	77
Figura 4.7:	Reflectância de filmes dieléctricos com diferentes índices de refração em função da espessura do seu caminho óptico. Substrato de vidro com $n_0 = 1.5$. Meio incidente ar com $n_q = 1.0$. Ângulo de incidência $\theta_q = 0^\circ$	78
Figura 4.8:	Reflectância de uma superfície de alumínio e prata em função do ângulo.	81
Figura 4.9:	Reflectância da prata, do cobre, do ouro e do alumínio, em função do comprimento de onda.	81

Figura 4.10: Esquema do cálculo da FWHM de um filtro passa-banda.....	85
Figura 4.11: Estrutura do canal óptico do Microlab.....	85
Figura 4.12: Requisito para a intensidade da transmissão do pico.....	86
Figura 4.13: Valores da transmitância e da reflectância do TiO_2 e SiO_2 em função da espessura da camada. Considerou-se cada camada independente e depositada num substrato de vidro com $n = 1.52$	87
Figura 4.14: Simulação do espectro de transmissão, em função do comprimento de onda, do filtro passa-banda com a estrutura da Tabela 4.2. $T_{max} = 91.4\%$, FWHM = 5.5 nm.	89
Figura 4.15: Simulação do espectro de transmissão, em função do comprimento de onda, do filtro passa-banda com a estrutura da Tabela 4.2. $T_{max} = 94.2\%$, FWHM = 7.5 nm.	90
Figura 4.16: Simulação do espectro de transmissão, em função do comprimento de onda, do filtro passa-banda com a estrutura da Tabela 4.3. $T_{max} = 94.7\%$, FWHM = 3.6 nm.	91
Figura 4.17: Impressão artística dos 16 filtros ópticos.....	94
Figura 4.18: Simulação da transmitância, em função do comprimento de onda, para a matriz de 16 filtros ópticos. A estrutura dos filtros encontra-se na Tabela 4.5.....	95
Figura 4.19: Simulação da transmitância, em função do comprimento de onda, para uma matriz de 16 filtros ópticos com a estrutura da Tabela 4.6. A variação das espessuras das camadas 5 e 7 fornecem o deslocamento do pico de transmissão.	98
Figura 4.20: Simulação da transmitância, em função do comprimento de onda, para a matriz de 16 filtros ópticos com a estrutura da Tabela 4.5. Esta simulação foi realizada considerando como detector o fotodíodo fabricado.....	99
Figura 5.1: Vista em corte dos três tipos de fotodíodos em silício disponíveis na tecnologia CMOS <i>standard</i> com <i>n-well</i> : (a) <i>n-well / p-epilayer</i> ; (b) <i>p+ / n-well</i> ; (c) <i>n+ / p-epilayer</i>	105
Figura 5.2: Coeficiente de absorção e profundidade da penetração da luz no silício.....	107
Figura 5.3: Eficiência quântica para os três tipos de fotodíodos verticais, apresentados na Figura 5.1 e fabricados em tecnologia CMOS <i>standard</i> . (a) <i>n-well / p-epilayer</i> ; (b) <i>p+ / n-well</i> ; (c) <i>n+ / p-epilayer</i> [4].	107
Figura 5.4: Vista em corte do fototransístor bipolar de junção vertical em silício disponível na tecnologia CMOS <i>standard</i> com <i>n-well</i>	109
Figura 5.5: Eficiência quântica para o fototransístor <i>pnp</i> , apresentado na Figura 5.4 e fabricado em tecnologia CMOS <i>standard</i> [4].....	110

Figura 5.6:	Resposta espectral dos três tipos de fotodíodos verticais de acordo com os parâmetros da tecnologia CMOS <i>standard</i> com <i>n-well</i> utilizada no fabrico. (a) <i>n-well / p-epilayer</i> ; (b) <i>p+ / n-well</i> ; (c) <i>n+ / p-epilayer</i> [15].	112
Figura 5.7:	Estrutura básica do fotodíodo quando fabricado em tecnologia CMOS <i>standard</i> com <i>n-well</i> e duplo metal.	113
Figura 5.8:	Simulação da resposta espectral das combinações típicas das camadas dieléctricas que se encontram por cima do fotodíodo.	113
Figura 5.9:	Diagrama de blocos do conversor luz – frequência para um canal óptico.	114
Figura 5.10:	Formas de onda da tensão na entrada e na saída do comparador.	115
Figura 5.11:	Esquema do conversor luz - frequência para os quatro canais ópticos.	115
Figura 6.1:	Esquema do sistema de microfluidos.	120
Figura 6.2:	(a) Fotografia da máquina CNC; (b) berbequim; (c) ampliação da zona da fresa no berbequim; (d) fresa utilizada para vidro.	120
Figura 6.3:	Fotografia do sistema de microfluidos.	121
Figura 6.4:	Posição de cada filtro óptico na matriz.	123
Figura 6.5:	As 4 máscaras utilizadas no processo de deposição da camada 6 de SiO ₂ para os 16 filtros ópticos construídos com multicamadas de filmes finos. As cruzes são marcas para o alinhamento das máscaras.	123
Figura 6.6:	Sequência de fabrico da matriz de 16 filtros ópticos construídos com multicamadas de filmes finos.	125
Figura 6.7:	Vista em corte da estrutura básica do fotodetector da tecnologia CMOS <i>standard</i> .	126
Figura 6.8:	A fotografia tirada no SEM do fotodíodo CMOS sem o 1º óxido ilustra a rugosidade aleatória da superfície.	127
Figura 6.9:	Espessura da corrosão das 3 camadas dieléctricas que se encontram por cima da junção <i>pn</i> do fotodíodo, na tecnologia CMOS <i>standard</i> disponível no DIMES.	127
Figura 6.10:	Vista em corte da estrutura do fotodetector fabricado. A espessura efectiva do 1º óxido é de 650 nm.	128
Figura 6.11:	Fotografia ampliada de um fotodíodo (A) e do fotodíodo que fornece a corrente de fuga (B). Acima dos fotodíodos encontra-se alguma da electrónica de leitura.	128
Figura 6.12:	Fotografia do sistema de detecção e electrónica de leitura.	128
Figura 6.13:	O Microlab.	129

Figura 7.1:	Curva de calibração para diferentes concentrações de albumina depois de reagir com o reagente “ <i>Microprotein-PR</i> ”. Valores obtidos com 1 mm de caminho óptico.	134
Figura 7.2:	Curva de calibração para diferentes concentrações de ácido úrico depois de reagir com o reagente de “ <i>InfinityTM uric acid reagent</i> ”. Valores obtidos com 1 mm de caminho óptico.....	136
Figura 7.3:	Espectro de absorção para diferentes concentrações de albumina depois de reagir com o reagente “ <i>Microprotein-PR</i> ”. Da curva superior para a curva inferior: 100 mg/dl, 50 mg/dl, 30 mg/dl, 15 mg/dl, 7.5 mg/dl, 3 mg/dl.....	137
Figura 7.4:	Espectro de absorção para diferentes concentrações de ácido úrico depois de reagir com o reagente “ <i>InfinityTM uric acid reagent</i> ”. Da curva superior para a curva inferior: 120 mg/dl, 80 mg/dl, 60 mg/dl, 40 mg/dl, 30 mg/dl, 20 mg/dl, 15 mg/dl, 10 mg/dl, 5 mg/dl.....	138
Figura 7.5:	Fotografia da instalação para as medições experimentais.....	139
Figura 7.6:	Fotografia do interior da caixa para as medições no Microlab e ampliação da zona de medição do Microlab.	139
Figura 7.7:	Fotografia da caixa com o fotodíodo da <i>Hamamatsu</i> e ampliação deste.	140
Figura 7.8:	(a) Irradiância espectral em função do comprimento de onda para a lâmpada utilizada nas medições (curva com a referência 6334); (b) Transmitância em função do comprimento de onda para a fibra óptica utilizada nas medições [8].....	140
Figura 7.9:	Interface gráfica na medição simultânea de dois fotodíodos.	141
Figura 7.10:	Espectro de transmissão do filtro óptico fabricado. O gráfico mostra os valores medidos em relação a uma lamela de vidro sem filtro. Ambos foram medidos com o fotodíodo comercial.....	142
Figura 7.11:	Espectro de transmissão dos dois filtros, números 3 e 8, fabricados inicialmente. A espessura total é de 56% da pretendida. O gráfico mostra os valores medidos em relação a uma lamela de vidro sem filtro. Ambos foram medidos com o fotodíodo comercial.....	142
Figura 7.12:	Características espectrais do fotodíodo comercial calibrado da <i>Hamamatsu</i>	144
Figura 7.13:	Corrente de cada fotodíodo em função do comprimento de onda. Os valores foram obtidos sem polarizar o fotodíodo e com um <i>pinhole</i> de 500 μm	145
Figura 7.14:	Responsividade de cada fotodíodo, calculada a partir da corrente medida e tendo como referência o fotodíodo comercial calibrado da <i>Hamamatsu</i>	145
Figura 7.15:	Eficiência quântica de cada fotodíodo, calculada a partir da expressão (5.4).	145

Figura 7.16	Corrente, em função do comprimento de onda, dos fotodíodos <i>n+</i> / <i>p-epilayer</i> com o 1º óxido e com as três camadas dielétricas por cima da junção <i>pn</i> . Valores medidos sem polarizar os fotodíodos. ..	147
Figura 7.17:	Responsividade dos fotodíodos medidos na Figura 7.16.	147
Figura 7.18:	Eficiência quântica dos fotodíodos medidos na Figura 7.16.	147
Figura 7.19:	Corrente em função da tensão inversa dos fotodíodos <i>n+</i> / <i>p-epilayer</i> , medida quando não estão expostos à luz.....	148
Figura 7.20:	Tensão no condensador (1) e tensão na saída do comparador (2) do conversor luz - frequência, quando é iluminado por uma lâmpada de filamento incandescente a cerca de 5 cm do fotodíodo.	149
Figura 7.21:	Tensão no condensador (1) e tensão na saída do comparador (2) do conversor luz - frequência, quando é iluminado por uma lâmpada de filamento incandescente a cerca de 50 cm do fotodíodo.	149
Figura 7.22:	O Microlab (os canais têm 500 µm de profundidade e 1 mm de largura).....	150
Figura 7.23:	Espectro de transmissão para diferentes concentrações de albumina depois de reagir com o reagente específico para proteína total (“ <i>Microprotein-PR</i> ”). Da curva superior para a inferior: reagente, 3 mg/dl, 7.5 mg/dl, 15 mg/dl, 30 mg/dl, 50 mg/dl e 100 mg/dl.	151
Figura 7.24:	Curva calibração para diferentes concentrações de albumina depois da sua reacção com o reagente “ <i>Microprotein-PR</i> ”.....	152
Figura 7.25:	Espectro de transmissão para diferentes concentrações de ácido úrico depois de reagir com o reagente específico para a sua quantificação (“ <i>InfinityTM uric acid reagent</i> ”).	154
Figura 7.26:	Curva de calibração para diferentes concentrações de ácido úrico depois da sua reacção com o reagente “ <i>InfinityTM uric acid reagent</i> ”. A recta de tendência foi calculada apenas na zona linear.....	154
Figura 7.27:	Espectro de transmissão, obtido com o filtro óptico sobre o Microlab, para diferentes concentrações de ácido úrico após a reacção com o reagente específico para a sua determinação.	156
Figura 7.28:	Curva de calibração do ensaio demonstrado na Figura 7.27, para $\lambda = 480$ nm.....	156
Figura 7.29:	Curva de calibração para diferentes concentrações de ácido úrico após completa a reacção com o reagente específico para a sua determinação. Valores obtidos quando o Microlab é iluminado com uma fonte de luz branca convencional.....	157
Figura 8.1:	Desenho artístico de um possível leitor para o Microlab.	164
Figura 8.2:	Desenho artístico, em corte e em perspectiva, do Microlab com o sistema de microfluidos fabricado através de técnicas de SU-8.....	165
Figura I.1:	Curva de calibração	A - 6

Figura I.2: Espectros sem sobreposição [2]	A - 8
Figura I.3: Espectros do reagente e mistura sobrepostos [2]	A - 8
Figura I.4: Espectros da amostra, do reagente e da mistura sobrepostos [2]	A - 9
Figura IV.1: Esquema detalhado do conversor luz - frequência.....	A - 23
Figura IV.2: Esquema detalhado do comparador.	A - 24
Figura V.1: Máscaras e espessuras em nanômetros da matriz de 16 filtros ópticos descrita na Tabela 4.6.	A - 28
Figura V.2: Posição dos 16 filtros ópticos na matriz, utilizando as máscaras descritas na Figura V.1 e as espessuras apresentadas na Tabela 4.6.....	A - 28

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Comparação dos passos necessários de uma análise ao sangue quando realizada num laboratório e num microsistema de análises [7].	7
Tabela 1.2: Frequência de amostragem típica para a monitorização de vários parâmetros clínicos [9].	8
Tabela 2.1: Composição média de alguns compostos da urina numa colecta de 24 horas [2].	33
Tabela 3.1: Propriedades do reagente e do padrão de urina.	54
Tabela 4.1: Material e espessura das camadas do filtro passa-banda.	89
Tabela 4.2: Material e espessura das camadas do filtro passa-banda com a estrutura dos filmes: <i>HLHL HH LHLH</i>	90
Tabela 4.3: Material e espessura das camadas do filtro passa-banda com a estrutura dos filmes: <i>HLHLH LL HLHLH</i>	91
Tabela 4.4: Dezasseis biomoléculas que podem ser analisadas por detecção colorimétrica. U (Urina), S (Soro sanguíneo), P (Plasma sanguíneo), CSF (Fluido cefalorraquidiano) [15].	93
Tabela 4.5: Material e espessura das camadas da matriz de filtros ópticos passa-banda, com a estrutura <i>HLHLH LL HLHLH</i>	96
Tabela 4.6: Material e espessura das camadas da matriz de filtros ópticos passa-banda, com um arranjo de camadas dieléctricas.	97
Tabela 6.1: Espessura da camada 6 de SiO ₂ com o respectivo número do filtro óptico para posterior localização na matriz e o comprimento de onda do seu máximo de transmitância.	122
Tabela 6.2: Materiais, espessura e sequência de deposição de cada camada da matriz de 16 filtros ópticos.	124
Tabela 7.1: Valores medidos da corrente e cálculo da responsividade e eficiência quântica dos 3 tipos de fotodíodos verticais da Figura 5.1 para $\lambda = 633 \text{ nm}$ e $P_{\text{incidente}} = 5 \mu\text{W}$ e constante.	146

Tabela 7.2: Características em corrente contínua do comparador com relógio.	150
Tabela 7.3: Coeficiente de absorção para cada concentração medida para $\lambda = 595$ nm e com $LP = 500$ μ m.	152
Tabela 7.4: Coeficiente de absorção para cada concentração medida para $\lambda = 495$ nm e com $LP = 500$ μ m.	155
Tabela 7.5: Resumo dos parâmetros obtidos do Microlab.	158
Tabela I.1: Determinação de uma curva de calibração.	A - 6

Lista de símbolos

Símbolo	Descrição	Unidade
A	Absorvência	-
\mathbf{B}	Densidade de fluxo magnético	T
BW	Largura de Banda	Hz
C	Concentração das moléculas	mol/l ou partículas/m ³
C	Condensador	F
CR	Coefficiente de correlação	-
c	Velocidade da onda electromagnética	m/s
c_0	Velocidade da onda electromagnética no vazio	m/s
D	Coefficiente de difusão	m ² /s
\mathbf{D}	Deslocamento eléctrico	C/m ²
d	Espessura de um material	m
E	Energia	J
E	Campo eléctrico	V/m
\mathbf{E}	Vector campo eléctrico	V/m
f	Frequência	Hz
g	Espessura de fase do filme	rad
H	Campo magnético	A/m
H	Índice de refração baixo	-
\mathbf{H}	Vector campo magnético	A/m
h	Constante de <i>Planck</i>	J s
I	Intensidade da onda de luz	J s/m
I	Corrente eléctrica	A
i	Operador complexo	-

J	Fluxo da difusão	partículas/m ² s
j	Número de filmes finos	-
\mathbf{K}	Vector de propagação	rad/m
K	Número de propagação	rad/m
K_a	Constante de associação	l/(s mol)
K_d	Constante de dissociação	l/(s mol)
k	Coefficiente de extinção	-
L	Distância	m
L	Índice de refração baixo	-
L_d	Distância entre a região do espaço de carga e o contacto óhmico num fotodíodo	m
LP	Caminho óptico	m
M	Matriz	-
m	Ordem de interferência de um interferómetro de <i>Fabry-Perot</i>	-
N_{AV}	Número de <i>Avogadro</i>	mol ⁻¹
n	Índice de refração	-
n	Semicondutor tipo n com electrões como portadores maioritários	-
P	Pressão	Pa
P	Fluxo de energia radiante ou potência óptica	W
\mathbf{P}	Vector de <i>Poyting</i>	W/m ²
p	Semicondutor tipo p com lacunas como portadores maioritários	-
pn	Junção entre um semicondutor do tipo p e outro do tipo n	-
Q	Carga	C
q	Número de interfaces numa multi-camada	-
R	Reflectância	-
Re	Número de <i>Reynolds</i>	-
r	Coefficiente de reflexão	-
\mathbf{r}	Vector posição	m
S	Chaves analógicas	-
T	Transmitância	-

T_D	Tempo de difusão	s
t	Coeficiente de transmissão	-
t	Tempo	s
u	Energia por unidade de volume	J/m ³
V	Volume	m ³
V	Volume de líquido	l
V	Tensão	V
V_a	Taxa de reacção da associação	s ⁻¹
V_d	Taxa de reacção da dissociação	s ⁻¹
V_{dd}	Tensão de alimentação	V
Y	Admitância óptica	siemens
W_d	Largura da camada de deplecção num fotodíodo	m
v	Velocidade	m/s
Δ	Variacção	-
α	Coeficiente de absorção	m ⁻¹
β	Ganho em corrente de um transístor	-
ϵ	Permitividade eléctrica	F/m
ϵ_0	Permitividade eléctrica no vazio	F/m
ϵ_r	Permitividade relativa	-
ϕ	Ângulo	rad
η	Eficiência	-
λ	Comprimento de onda da luz	nm
μ	Permeabilidade magnética	H/m
μ_0	Permeabilidade magnética no vazio	H/m
μ_r	Permeabilidade relativa	-
ν	Viscosidade	N s/m ²
θ	Ângulo de incidência da luz num meio	rad ou graus
ρ	Densidade	Kg/m ³
σ	Ruído	-
ω	Frequência angular	rad/s
ζ	Razão dos índices de refração	-
\mathfrak{R}	Responsividade	A/W

Lista de acrónimos e termos

Acrónimo / termo	Designação
AU	Unidades arbitrárias
BPSG	<i>Boron Phosphor Silicate Glass</i>
CNC	Comando Numérico por Computador
CFD	Dinâmica Computacional do fluido
<i>Chip</i>	Circuito integrado e encapsulado
CMOS	<i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>
DEI	Departamento de Electrónica Industrial
<i>Die</i>	Parte de um disco (de um determinado material utilizado como substrato), normalmente com 10 mm de lado
DIMES	<i>Delft Institute for MicroElectronics and Sub-micron Technology</i>
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
FEM	Métodos dos Elementos Finitos
FWHM	<i>Full-Width-Half-Maximum</i>
GPIB	<i>General Purpose Interface Bus</i>
IBD	<i>Ion Beam Deposition</i>
INESC-MN	Instituto de Engenharia de Sistemas e Computadores - Microsistemas e Nanotecnologias
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
<i>Mesh</i>	Malha que define a divisão de um elemento em elementos finitos
Microlab	Microlaboratório
MOSFET	<i>Metal Oxide Silicon Field Effect Transistor</i>
NMOS	Transístor MOSFET de canal <i>n</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PDMS	<i>PolyDiMethylSiloxane</i>
<i>Pinhole</i>	Furo de alfinete
PMMA	<i>PolyMethylMethAcrylate</i>
PMOS	Transistor MOSFET de canal <i>p</i>
PVD	<i>Physical Vapor Deposition</i>
RNA	<i>RiboNucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
SEM	<i>Secondary Electron Microscopic</i>
UM	Universidade do Minho
VLSI	<i>Very Large Scale Integration</i>

1

Introdução

Neste capítulo faz-se uma breve descrição sobre a análise aos fluidos biológicos realizada nos laboratórios de análises clínicas e as vantagens de efectuar esta análise num microssistema. Apresenta-se também uma revisão de microssistemas já implementados descritos na literatura e estabelece-se a noção, motivação e objectivos deste projecto. Por último descreve-se a estrutura da tese.

1.1 Análise de fluidos biológicos

1.1.1 Conceito de fluido biológico

Fluido biológico é o termo utilizado para definir a componente líquida de organismos vivos de origem humana ou animal. No ser humano os fluidos mais importantes são o sangue (soro e plasma), a urina, o fluido cerebrospinal, o fluido linfático, o fluido intracelular, o fluido lacrimal, a saliva, a bÍlis e o fluido sinovial. Estes fluidos contêm água, iões orgânicos, aminoácidos, glúcidos, lípidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. Os dois primeiros são compostos simples que interligados formam as moléculas biológicas (biomoléculas). Os restantes são proteínas e ácidos nucleicos, denominados de “macromoléculas”, devido à sua estrutura ser formada pelo encadeamento de um grande número de moléculas de um ou mais tipos, pelo que, são maiores que as biomoléculas anteriores [1].

1.1.2 Biomoléculas medidas nos fluidos biológicos

A análise dos fluidos biológicos e das biomoléculas ou compostos neles presentes é um factor muito importante no diagnóstico de doenças. Características como a cor, a transparência e o volume são exemplos de uma análise inicial aos fluidos biológicos. O resultado destas características qualitativas podem logo à partida indicar o estado de doença de um indivíduo (ex.: infecção urinária na análise da cor da urina ou meningite na análise da claridade do fluido cerebrospinal).

Frequentemente é necessário medir quantitativamente várias biomoléculas ou compostos nos fluidos biológicos para estabelecer um padrão de anormalidades. As biomoléculas ou compostos solicitados mais comumente em exames de rotina incluem: o pH, a albumina, as proteínas totais, a globulina, o ácido úrico, a bilirrubina total, o cálcio, o sódio, o potássio, o cloro, o colesterol, a creatinina, a glicose, o aspártato transaminase e o fósforo inorgânico. Os padrões de valores anormais obtidos dessas medições fornecem dados que permitem chegar a um diagnóstico definitivo. As implicações clínicas são inúmeras e podem ser consultadas em [2].

No soro sanguíneo, na urina e no fluido cerebrospinal, a separação de proteínas, denominada de “electroforese de proteínas”, fornece um diagnóstico sobre a distribuição e concentração dos principais componentes presentes em cada fracção de proteína. Este teste pode diagnosticar alguns estados inflamatórios, disfunções imunes e evolução de uma doença e seu tratamento. As proteínas mais solicitadas em exames de rotina são: a albumina, as globulinas ($\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma$), as hemoglobinas (S, A₁, F) e as lipoproteínas (β , pré- β , α).

A contagem e examinação das células presentes num dado fluido biológico fornecem informações úteis tanto para o diagnóstico como para o prognóstico. Em exames de rotina, o sangue e a urina são os fluidos mais solicitados para este procedimento laboratorial. No sangue são normalmente contadas as células brancas (leucócitos), as células vermelhas (hemácias) e as plaquetas (trombócitos). Na urina, além da contagem de células, também tem interesse identificar e contar bactérias, cristais e cilindros, pelo que é frequentemente utilizada a denominação de “exame aos sedimentos urinários”.

Detectar a presença de anticorpos em fluidos biológicos é a medida utilizada no diagnóstico de doenças infecciosas, distúrbios auto-imunes, alergias imunes e doenças neoplásicas. Este tipo de exames apenas é solicitado quando há suspeita de alguma das

doenças mencionadas. A resposta antígeno - anticorpo é a defesa natural do organismo contra agentes invasores como bactérias, vírus, parasitas e fungos. Os antígenos são biomoléculas que estimulam e subsequentemente reagem com os produtos da resposta imune. Os anticorpos são proteínas produzidas pelo sistema imune do organismo em resposta a um antígeno, de forma a retirar as possibilidades de sobrevivência do antígeno criado pelos agentes invasores [2].

Separar, sequenciar, amplificar e determinar a estrutura do DNA (ácido desoxirribonucleico) e do RNA (ácido ribonucleico) são exames solicitados não só no caso de suspeita de doenças, mas também na investigação criminal, por exemplo. O DNA e RNA são macromoléculas que determinam a formação e o desenvolvimento de todas as formas de vida. A sua estrutura contém a informação necessária para a síntese dos milhares de proteínas que regulam todas as funções vitais. Do estudo do DNA consegue-se produzir biomoléculas para combate a doenças (ex.: vacinas e anticorpos).

1.1.3 Laboratórios de análises clínicas

Os exames aos fluidos biológicos disponíveis nos laboratórios de análises clínicas podem ser divididos, de um modo geral, em exames físicos, químicos e microscópicos. Os físicos examinam as características físicas do fluído, devolvendo uma medida qualitativa da amostra em análise. A cor, a claridade e o volume são exemplos desse tipo de exames. Apesar de simples, a informação básica resultante de um exame físico, contém dados preliminares relativamente à presença de algumas doenças. Mais ainda, essas informações podem ser necessárias para explicar descobertas obtidas nos exames químicos e microscópicos.

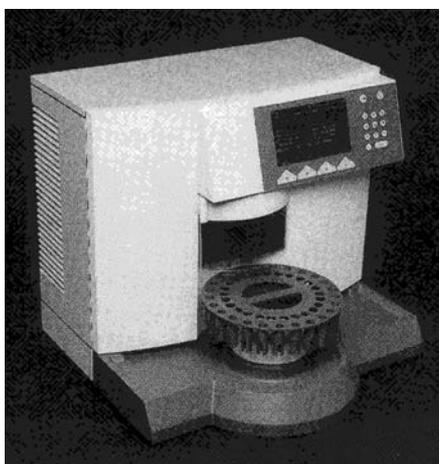
Os exames químicos analisam as características químicas dos fluidos, devolvendo uma medida quantitativa da biomolécula ou composto em análise. A maior parte destes exames são realizados por espectrofotometria. Espectrofotometria é o estudo da interacção da radiação electromagnética com as biomoléculas. A espectrofotometria por absorção óptica é frequentemente utilizada para determinar a concentração e/ou quantidade de uma determinada biomolécula numa amostra (por exemplo, proteínas ou glicose). O seu princípio é baseado na absorção óptica da luz pelas biomoléculas presentes na amostra. Essas biomoléculas têm um máximo de absorção para um determinado comprimento de onda do espectro electromagnético. O valor da absorção nesse comprimento de onda está directamente relacionado com a concentração dessas biomoléculas na amostra. A espectrofotometria com detecção por

fluorescência, tem a vantagem de ser muito sensível e selectiva, pelo que, é utilizada para determinar muito baixas concentrações de uma determinada biomolécula numa amostra (ex.: albumina na urina). Embora com menos frequência que a detecção por absorção óptica, também ela é usada em laboratórios clínicos. É aplicada a biomoléculas que emitem uma luz fluorescente quando excitadas por uma fonte de luz com um comprimento de onda específico. A desvantagem da detecção por fluorescência reside no tempo extremamente curto da luz fluorescente emitida pelas biomoléculas (< 500 ns) e pelo facto de ser necessário encontrar reagentes que contenham compostos fluorescentes, quando as biomoléculas a analisar não os tiverem. A cromatografia e a electroforese são os métodos realizados em laboratórios clínicos para separar as proteínas existentes numa amostra de um fluido biológico. A cromatografia executa a separação de acordo com o tamanho, carga e afinidade de ligação das biomoléculas, baseando-se nas diferentes velocidades a que cada um dos componentes é arrastado por um determinado solvente, num meio poroso apropriado [3]. Na electroforese a separação é baseada na mobilidade electrocinética das biomoléculas numa solução, sob influência de um campo eléctrico [4].

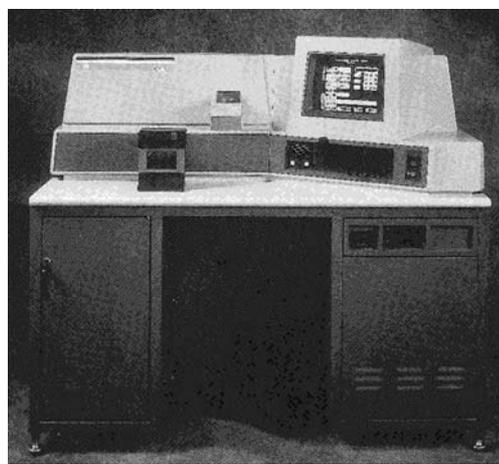
Os exames microscópicos detectam, identificam e quantificam os componentes insolúveis presentes na amostra do fluido biológico. A contagem e examinação de células, de bactérias ou de cristais, são exemplos deste tipo de exames. As técnicas de microscopia utilizadas nos laboratórios clínicos são: microscopia de campo brilhante, microscopia de contraste de fase, microscopia de polarização e microscopia de contraste de interferência. Na primeira os objectos ampliados aparecem escuros contra um fundo claro. É a técnica mais frequentemente utilizada, uma vez que é a usada nos exames de rotina. A microscopia de contraste de fase converte variações no índice de refração do objecto em análise em variações de intensidade da luz ou contraste. Esta técnica permite uma visualização mais detalhada dos componentes translúcidos ou com baixos índices de refração (ex.: cilindros hialinos na urina) e das células vivas. A microscopia de polarização é baseada nos fundamentos de uma luz polarizada. É utilizada para analisar biomoléculas com a propriedade de refractar a luz em duas direcções a 90° (ex.: cristais e lípidos). Por fim, a microscopia de contraste de interferência fornece uma imagem tridimensional ilustrando detalhes estruturais muito precisos. Esta técnica é a mais dispendiosa e muitas vezes não é utilizada em análises de rotina [5].

Vários instrumentos automatizados estão disponíveis nos laboratórios de análises clínicas, realizando vários testes simultaneamente para cada fluido biológico, com um volume de líquido de 1 ml em cada teste. Exemplos desses equipamentos

encontram-se nas fotografias da Figura 1.1. Actualmente, esses equipamentos são bastante sofisticados, precisos e fiáveis. Contudo, a não ser que um consultório médico inclua esse tipo de equipamentos, ainda não é possível ao próprio médico elaborar um diagnóstico fidedigno na hora da consulta (apenas após o resultado das análises por ele requeridas). Pelo que, o paciente necessita de se deslocar a um laboratório de análises clínicas ou, caso o médico colha as amostras, estas necessitam de ser enviadas para o laboratório e o seu resultado apenas estará disponível após algumas horas, ou mesmo passado alguns dias. Além do atraso no tempo, enganos logísticos, tais como, etiquetagem errada ou perda de amostras podem atrasar significativamente o diagnóstico.



(a)



(b)

Figura 1.1: (a) Clinitek Atlas (cortesia da Bayer Diagnostics, Elkhart, In.); (b) Model 500 Workstation (cortesia da International Remote Imaging Systems, Chatsworth, CA.) [2].

Para algumas análises químicas de rotina à urina, encontram-se comercialmente disponíveis, fora do ambiente laboratorial (geralmente em farmácias), as chamadas fitas reagentes (Figura 1.2). Estas, podem ser usadas e lidas directamente por pacientes e outros profissionais de saúde. O seu aspecto é semelhante a pedaços de papel mata-borrão, podendo ser de papel ou plástico. Estas fitas, quimicamente impregnadas com reagente, permitem uma rápida determinação da concentração de determinadas biomoléculas ou compostos na urina, através de resultados visuais codificados por cores. O pH, a proteína total, a glicose, as cetonas, a bilirrubina, o nitrito e a hemoglobina, são alguns exemplos das biomoléculas ou compostos por elas analisados. O formato ou a profundidade da coloração produzida está relacionada com a concentração da biomolécula na urina. São fornecidos controlos de cor contra os quais pode ser comparada a cor produzida pela amostra de urina. Os tempos de reacção das

biomoléculas nas fitas são padronizados para cada categoria de fita. Actualmente, estas fitas reagentes funcionam como laboratórios em miniatura. Contudo, são poucas as biomoléculas por elas analisadas e a leitura manual da cor, mesmo com controlos, não é precisa.

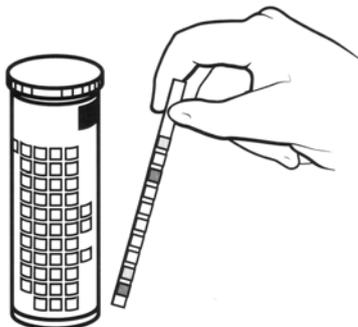


Figura 1.2: Uma fita reagentes comercial [5].

Uma nova abordagem é necessária para possibilitar uma ampla monitorização dos parâmetros de saúde na prevenção de doenças. A necessidade de medições e resultados rápidos, no próprio local, a baixas concentrações e utilizando pequenos volumes de amostras (alguns microlitros, contra 1 ml dos equipamentos actuais) levou a que, na década passada, começassem a surgir desenvolvimentos na miniaturização de sistemas de análise de fluidos, com a parte dos fluidos, detecção e electrónica de leitura integrados num único dispositivo.

1.1.4 Microsistemas de análise de fluidos biológicos

As vantagens associadas com os microsistemas de análise de fluidos, incluem uma melhorada eficiência no tamanho, na aplicação, no tempo de resposta, no custo, no desempenho analítico, na integração, na produtividade, na automação e na segurança no laboratório [6]. Uma vez que são usadas quantidades de microlitros, ou mesmo nanolitros, de solventes orgânicos, os custos associados com a compra de novos reagentes e com a destruição dos utilizados é praticamente desprezável. A automação dos procedimentos de preparação de amostras permite que uma pessoa menos especializada possa, com exactidão, realizar uma análise. Além disso, derramamentos de líquidos, explosões e outros acidentes que poderiam ocorrer com as técnicas convencionais de preparação das amostras, deixam de ser um problema. Um microsistema pode tornar-se num laboratório de análises clínicas portátil, adequado para realizar medições em qualquer local. Para além destas vantagens destaca-se ainda o

seu baixo custo quando produzido em massa, pelo facto de utilizar os mesmos conceitos básicos de fabrico e materiais utilizados na microelectrónica.

A Tabela 1.1 compara os passos que são necessários para uma análise ao sangue quando é realizada num laboratório de análises clínicas e num microssistema de análise de fluidos biológicos. Neste, uma considerável redução no manuseamento da amostra e na logística resultam numa poupança de tempo e custos.

Tabela 1.1: Comparação dos passos necessários de uma análise ao sangue quando realizada num laboratório e num microssistema de análises [7].

Análise realizada em laboratório	Análise realizada num microssistema
1. Teste é pedido	1. Teste é pedido
2. Pedido do teste é processado	2. Enfermeira retira amostra de sangue
3. Enfermeira retira amostra de sangue	3. Amostra é analisada
4. Amostra é transportada para o laboratório central	4. Resultados são revistos pela enfermeira
5. Amostra é etiquetada e armazenada	5. Médicos agem de acordo com os resultados
6. Amostra é analisada	
7. Resultados são revistos pelo pessoal do laboratório	
8. Resultados são relatados ao departamento	
9. Médicos agem de acordo com os resultados	

Apesar das vantagens descritas, são questionadas restrições quanto ao grau de miniaturização necessária ou mesmo desejada, devido à natureza de alguns sistemas biológicos. Se o número de moléculas numa amostra com uma concentração relevante para diagnóstico for muito reduzido, pode ser atingido o ponto em que não são introduzidas no sistema de análise nenhuma moléculas. Assim, deve ser sempre calculado o volume de líquido mínimo que se pode utilizar numa análise. Como exemplo, para a menor concentração de macromoléculas de albumina na urina, o volume mínimo a ser utilizado é da ordem dos fentolitros. Contudo, no caso do DNA, é da ordem das centenas de microlitros [8].

Um microssistema de análise de fluidos biológicos encontra a sua vasta área de aplicações em campos como os diagnósticos clínicos, a análise de drogas, os exames imunológicos, a separação e a análise de proteínas, o doseamento e a transferência de medicamentos, a análise genética (a amplificação e a sequenciação do DNA), a cultura

de células e o equipamento de monitorização e de diagnóstico. Pelo seu baixo custo e portabilidade permite que qualquer pessoa o adquira e realize um correcto diagnóstico preliminar em sua própria casa. Como exemplo, a Tabela 1.2 refere alguns exemplos das biomoléculas/compostos mais frequentemente medidos em análises clínicas e o tempo necessário para a sua monitorização, no caso de haver suspeita de alguma doença ou mesmo no seu tratamento.

Tabela 1.2: Frequência de amostragem típica para a monitorização de vários parâmetros clínicos [9].

Segundos / Minutos	Horas	Dias
Oxigénio	Creatinina	Ferro
Dióxido de Carbono	Bilirrubina	Albumina
Ião potássio	Ureia	Ácido úrico
Glicose	Sódio	Globulina
Lactato	Cloreto	Colesterol
Cortisona	Triglicérido	
Neurotransmissores		

Aplicações para fluidos em geral (não biológicos) podem ser contempladas por dispositivos com os mesmos princípios básicos, tais como: análises ambientais (qualidade do ar e água), teste a comida e identificação imediata de drogas.

1.1.5 Microsistemas de análise de fluidos biológicos: estado da arte

A evolução da tecnologia dos microsistemas de análise de fluidos é, de alguma forma, análoga ao sucedido com o circuito integrado. O desenvolvimento da microelectrónica que ocorreu nas últimas décadas do século XX facilitou a miniaturização da maior parte dos componentes electrónicos a um nível tal que, actualmente, acima de dez milhões de transístores podem ser concentrados num *chip* microprocessador *standard*. Esta escala de integração (através da miniaturização) determinou o enorme ganho no desempenho do processador durante os últimos trinta anos. Os mesmos materiais e técnicas de fabrico que fizeram da microelectrónica um sucesso, combinados com a micromaquinagem, levaram ao enorme desenvolvimento da miniaturização dos métodos e técnicas analíticas das ciências físicas e biológicas [10].

Lançado por Manz *et al.* [11], a primeira designação para um microsistema de análise de fluidos (não só biológicos, mas em geral) foi a de “ μ TAS” (*micro total analysis system*). Conjuntamente com “*lab-on-a-chip*” (*laboratory on a chip*), esse

termo continua ainda hoje a ser largamente utilizado para sistemas de análise de fluidos que desempenhem tratamento da amostra, transporte, detecção e electrónica de leitura e de controlo num único dispositivo.

Apenas na última década as vantagens dos microssistemas de análise de fluidos biológicos despertaram o interesse e o suporte financeiro das indústrias biomédicas e farmacêuticas, que se interessaram em comercializar este tipo de dispositivos. Este interesse tornou a área dos microssistemas de análise de fluidos biológicos num campo de pesquisa e desenvolvimento extremamente fértil e compreendendo inúmeras aplicações.

Em vez de ser apresentada uma exaustiva revisão de todas essas aplicações, um resumo sucinto com base em artigos seleccionados e direccionado para aplicações de microssistemas na área de diagnósticos clínicos, será apresentado. Contudo, pela elevada importância nas ciências biomédicas, aplicações cobrindo as áreas de cultura e manuseamento de células, testes imunológicos, separação de proteínas e análise de DNA, serão previamente apresentadas exemplificando um microssistema para cada uma delas. Capítulos sobre várias aplicações biomédicas podem ser consultados em [12, 13] e também em artigos de revisão [10, 14, 15].

A análise do DNA, compreendendo a amplificação, separação e sequência, foi e ainda é a área mais forte para a investigação e comercialização dos microssistemas de análise de fluidos biológicos. Contudo, os seus dispositivos têm a sua maior aplicação na investigação genética, na investigação criminal e no desenvolvimento de medicamentos.

A separação das moléculas do DNA é normalmente realizada recorrendo à técnica da electroforese capilar. Esta técnica é extremamente adequada para ser implementada num microssistema, uma vez que a separação é realizada com uma eficiência muito elevada (devido à elevada tensão aplicada) e num tempo inferior a um segundo [16]. A *Nanogen Inc.* desenvolveu um microssistema comercialmente disponível para análise e separação do DNA. Utiliza a técnica da electroforese capilar em matriz, isto é, os reservatórios das moléculas de DNA têm uma estrutura em matriz. Esse reservatório, ilustrado na Figura 1.3 e denominado de “*Nanochip electronic microarray*”, é o coração do dispositivo. Fabricado em silício, contém 100 poços de teste dispostos em matriz e permite determinar as características de uma amostra desconhecida de DNA. Cada poço de teste pode ser controlado electronicamente através de um computador conectado ao dispositivo. As moléculas do DNA e RNA (que têm

cargas naturais positivas e negativas) podem assim ser movidas com grande flexibilidade, velocidade, precisão e eficiência. As especificações técnicas deste dispositivo podem ser consultadas em [17].

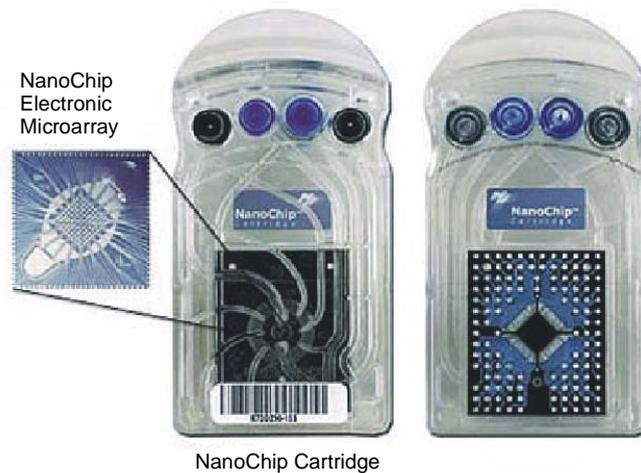


Figura 1.3: *Chip* descartável da Nanogen [17].

A técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) está muito vulgarizada na amplificação do DNA. É um procedimento repetitivo que permite replicar, por acção da enzima DNA-polimerase, em tubo de ensaio e por acção do calor, quantidades significativas de DNA a partir de um determinado segmento de DNA [18]. Normalmente a reacção PCR é realizada numa câmara que é aquecida e arrefecida em ciclos. Os equipamentos convencionais que realizam a PCR geralmente necessitam de ciclos longos devido às grandes constantes de tempo associadas com o aquecimento e arrefecimento. Contudo, a PCR em microsistemas permite o uso de volumes de amostras muito pequenos (nl ou mesmo pl no caso da estrutura da câmara ser em matriz (Figura 1.4)) e materiais com condutividades térmicas elevadas como o vidro ou o silício. Estas duas características permitiram reduzir drasticamente o tempo dos ciclos.

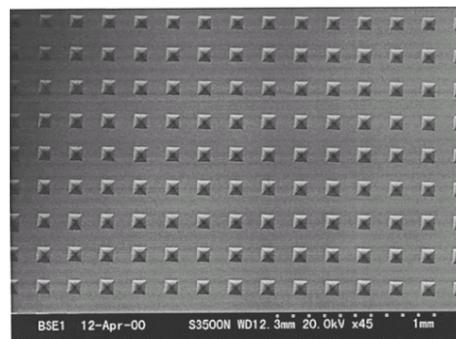


Figura 1.4: Imagem SEM (*Secondary Electron Microscopy*) das micro câmaras em silício para a PCR [19].

Uma alternativa à tradicional reacção PCR em câmara é a chamada “PCR de fluxo contínuo”. A solução para a reacção PCR é conduzida dentro de um canal com 3 zonas de temperaturas distintas, fazendo assim o efeito do ciclo térmico. Um esquema do conceito encontra-se ilustrado na Figura 1.5 [20]. A Figura 1.6 apresenta uma fotografia de um *chip* em vidro para a PCR. O diâmetro, a profundidade e o comprimento do canal são de 250 μm , 100 μm e 1512 μm , respectivamente. A amplificação de proteínas do DNA com 700 pares básicos foi demonstrada num tempo total de 30 minutos e em 25 ciclos. A velocidade do fluxo foi de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. O dispositivo consome 12 W/hora [21]. Ambas as reacções PCR (em câmara e de fluxo contínuo) continuam, actualmente, a ser bastante utilizadas.

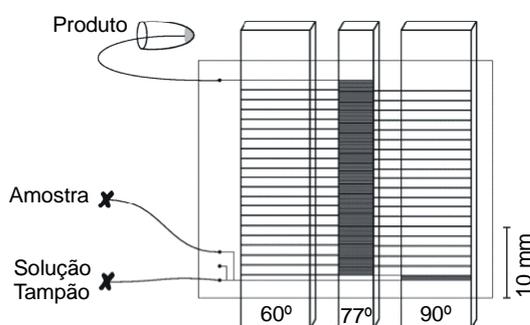


Figura 1.5: Esquema do conceito de PCR de fluxo contínuo [20].

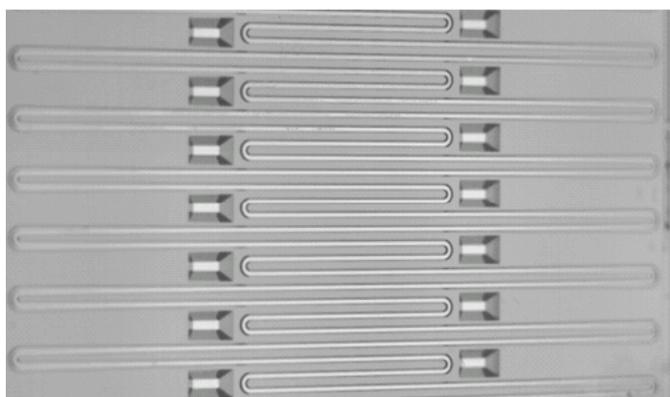


Figura 1.6: Vista de topo de parte do *chip* para amplificação de DNA utilizando a técnica de PCR de fluxo contínuo [21].

A sequência do DNA contém as instruções do funcionamento de uma célula e uma pequena amostra deste ácido nucleico permite o acesso a informações genéticas de tal forma importantes que a criação de bibliotecas biológicas com bancos de informação genética são hoje uma possibilidade. Com a sequência do DNA pode determinar-se a ordem dos três milhões de pares de bases químicas que o formam e a partir daí é

possível identificar os genes, como se codificam e como se regulam [18]. A sequência do DNA foi tradicionalmente realizada em géis viscosos. Recentemente, a electroforese capilar em matriz provou ser um método de alta velocidade e elevada produtividade para determinar a sequência do DNA. Esta técnica, implementada num microsistema, torna a análise ainda mais rápida e mais eficiente devido aos curtos canais de separação e à injeção de bandas de amostra pequenas. Paegel *et al.* apresentaram um dispositivo microfabricado para realizar a sequência do DNA com elevada produtividade baseado na técnica descrita. Consiste em 96 canais agrupados numa conformação radial (Figura 1.7). O microsistema apresentou uma taxa de sequência 10 vezes superior aos aparelhos comerciais [22].

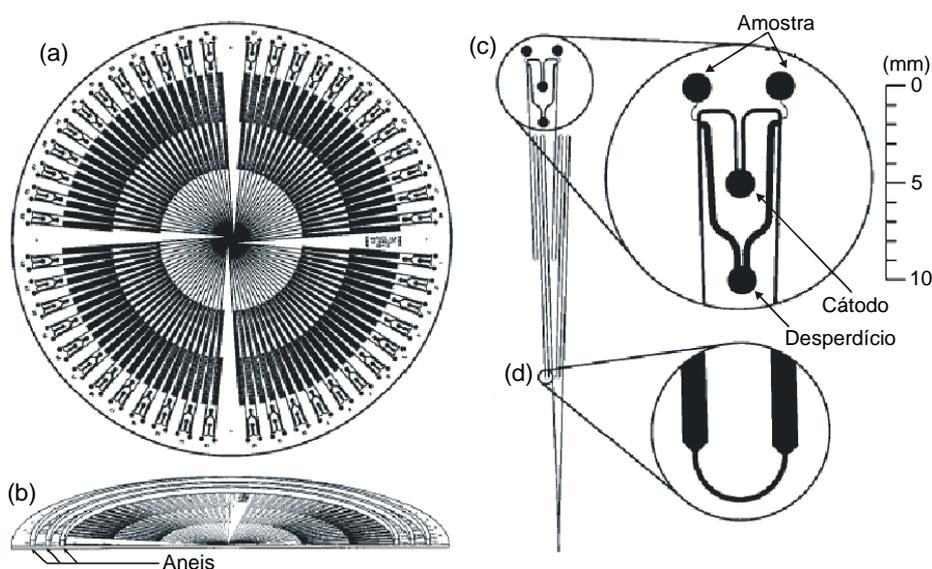


Figura 1.7: (a) Esquema dos 96 canais do microsistema para a sequência do DNA; (b) vista em corte; (c) vista pormenorizada da parte de injeção; (d) vista pormenorizada das curvas [22].

Enquanto a inovação tecnológica adaptou a análise de material genético a um formato miniaturizado de *chips* de DNA, também a estrutura das proteínas levou ao desenvolvimento de dispositivos análogos. Os sistemas para proteínas, miniaturizados e combinados com os métodos de detecção de biomoléculas, são uma ferramenta poderosa.

Os microsistemas para proteínas geralmente utilizam a técnica da cromatografia ou electroforese para a separação das proteínas nas suas biomoléculas e compostos simples. O domínio da técnica de separação por electroforese face à cromatografia foi e é uma tendência geral nos microsistemas. Do ponto de vista de implementação do sistema é mais fácil aplicar uma tensão nos terminais dos microcanais do que aplicar

uma diferença de pressão. Isto é, a miniaturização dos sistemas de cromatografia envolve desafios técnicos, os quais não são normalmente necessários na electroforese. Contudo, a cromatografia é a técnica de separação mais utilizada nos sistemas convencionais pelo que a investigação no sentido de implementar esta técnica em microssistemas continua a ser uma tendência actual. Regnier *et al.* desenvolveram um microssistema para cromatografia (Figura 1.8). Dentro dos microcanais foram implementados pilares para formarem colunas. Estes, fabricados num substrato de quartzo têm uma profundidade de 10 μm . Os canais de fluxo são bastante pequenos e uniformes. A aplicação deste microssistema foi eficientemente demonstrada na separação da rodamina 123 [23].

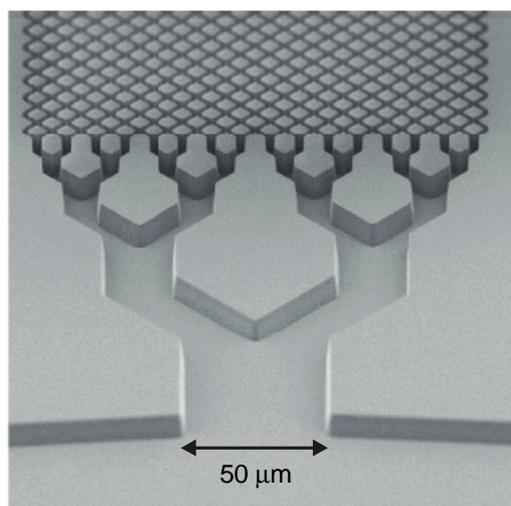


Figura 1.8: Suportes e colunas microfabricados para cromatografia. Os pilares mais pequenos têm $5 \times 5 \times 10 \mu\text{m}$, com canais entre pilares de largura de $1.5 \mu\text{m}$ [23].

Os microssistemas para electroforese capilar surgiram paralelamente à proposta da cromatografia em microssistema. O primeiro microssistema que relatava a separação de moléculas por electroforese capilar foi apresentado pela equipa de Manz em 1992 (Figura 1.9) [24]. Fabricado em vidro, o seu funcionamento foi demonstrado na separação da fluoresceína e da calceína de uma amostra de sangue, em 5 minutos. Muitas separações foram subsequentemente realizadas em microssistemas com desenhos similares, tais como: pequenas moléculas de matéria corante [25] e classificação de aminoácidos [26-30]. Paralelamente, outros grupos desenvolveram técnicas similares [31, 32]. Jin *et al.* apresentaram um microssistema de electroforese capilar para separar proteínas e que utiliza ainda um processo para as identificar dinamicamente enquanto estão a ser separadas. O esquema dos canais foi o tradicional

esquema em T cruzado (Figura 1.10(a)). A separação de 8 proteínas foi demonstrada eficientemente neste microsistema (Figura 1.10(b)) [33].

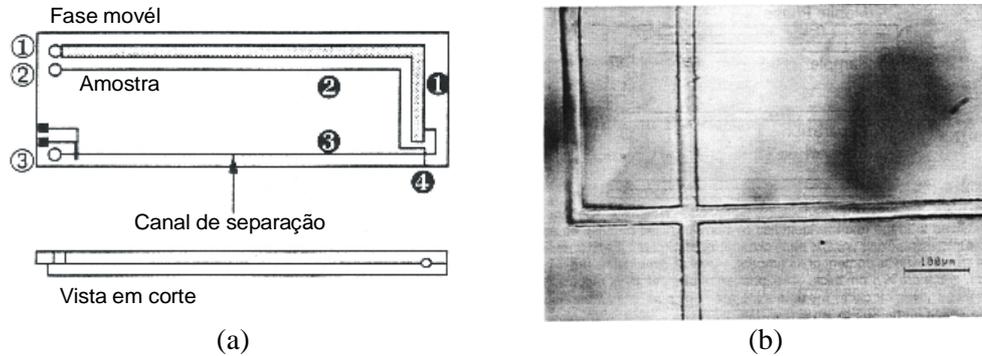


Figura 1.9: (a) Esquema dos canais; (b) Fotografia do ponto de intersecção dos 4 canais, a largura dos canais é de 30 μm [24].

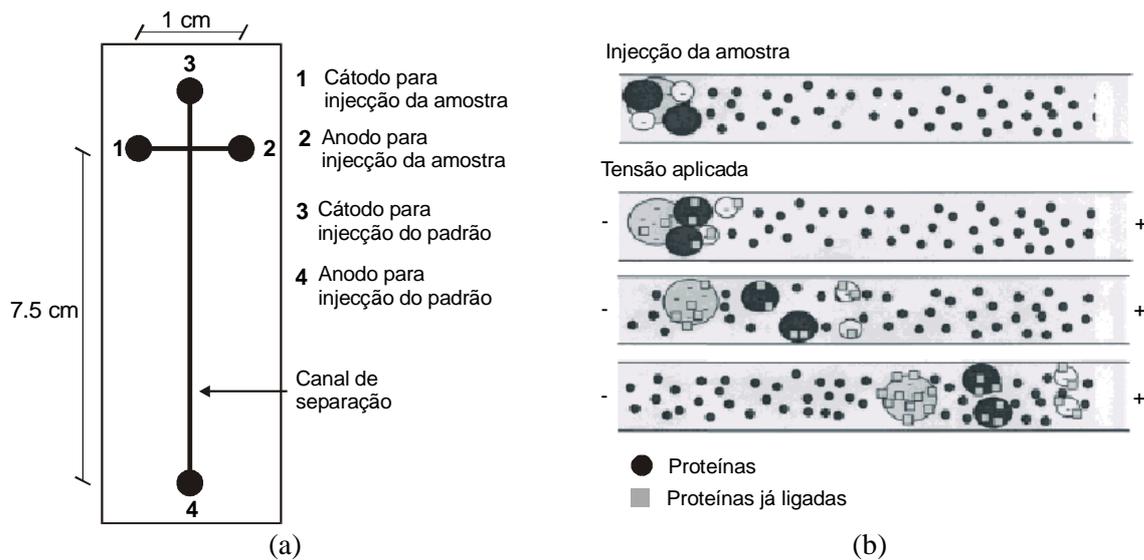


Figura 1.10: (a) Esquema do microsistema fabricado em vidro. Os canais têm 30 μm de profundidade. O canal de separação tem 120 μm de largura e o de injeção 150 μm ; (b) mecanismo para separar e identificar proteínas [33].

As análises imunológicas são extremamente importantes e cruciais na descoberta de vírus, bactérias e novas doenças. Os sistemas convencionais requerem um tempo de análise bastante longo e grandes quantidades de reagentes anticorpos, reagentes estes bastante dispendiosos. Realizar estas análises num microsistema vem obviar as desvantagens descritas. Um exemplo de um microsistema para testes imunológicos encontra-se na Figura 1.11. Este dispositivo é capaz de processar 4 amostras simultaneamente com apenas uma unidade de bombeamento e completar a análise em 50 minutos, em vez dos correspondentes 35 minutos para cada amostra. O limite de

deteccção foi dezenas de vezes menor que os dos sistemas convencionais. A integração reduziu o tempo necessário para a reacção antigénio - anticorpo ser efectuada de 45 horas para 35 minutos, para uma amostra [34].

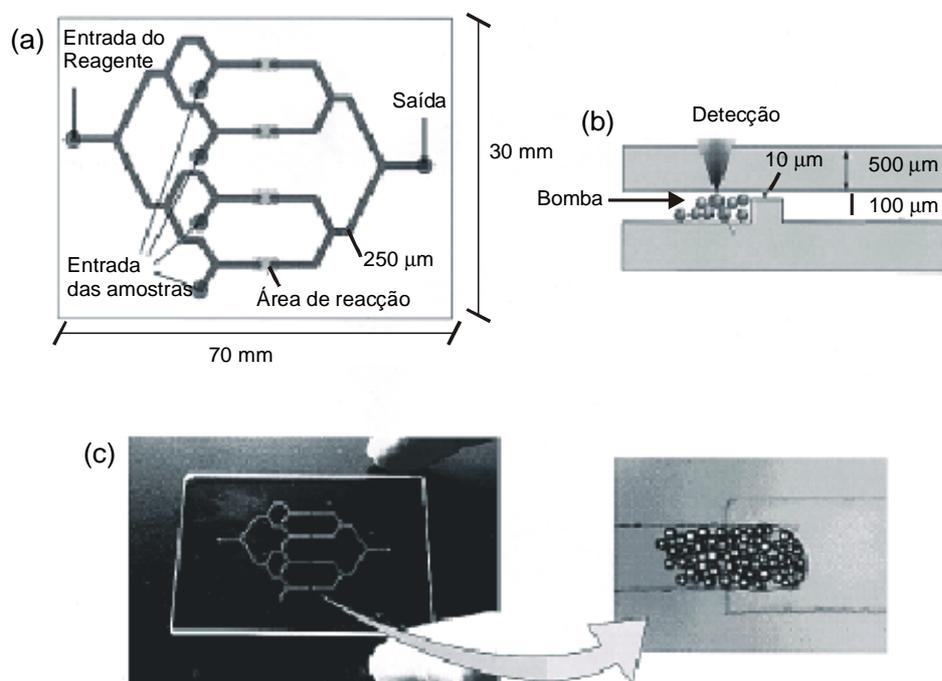


Figura 1.11: (a) Esquema; (b) vista em corte da área de reacção e deteção; (c) fotografia do microsystema e fotografia ampliada das moléculas no microsystema [34].

O posicionamento e manuseamento preciso de células requer que os dispositivos tenham uma dimensão idêntica à das próprias células, dos vírus ou mesmo das macromoléculas. Assim, os microsystemas são mais apropriados que os sistemas convencionais. Além disso, têm tempos de resposta rápidos, fácil esterilização e permitem a construção de sistemas complexos. Mais ainda, muitas células e tecidos são sensíveis ao pH e outros gradientes iónicos. Apenas nos microsystemas esses gradientes podem ser gerados, estabilizados e controlados numa escala micro [35]. Um exemplo de aplicação de um microsystema nessa área encontra-se na Figura 1.12. O microsystema, fabricado em PDMS (*PolyDiMethylSiloxane*), é composto por uma matriz de microinjectores e por um canal base de fluxo. Foi testado para localizar a aplicação de drogas na cultura de células, usando células neuronais [36].

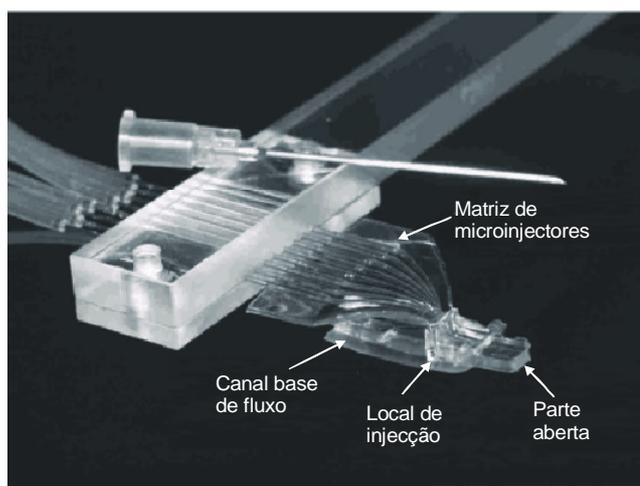


Figura 1.12: Fotografia do microssistema comparada com uma agulha de seringa [36].

Um elemento chave na saúde pública moderna é a extensão dos equipamentos de diagnóstico clínico para fora do laboratório central. É necessário melhorar a relação médico - paciente e reduzir o número de dias de internamento hospitalar. O desenvolvimento de microssistemas de rastreio de condições médicas, isto é, para determinar valores anormais de moléculas vitais ao funcionamento fisiológico do corpo humano, resultou num valor acrescentado em diagnósticos clínicos. Seguidamente, apresentam-se alguns exemplos, com base em artigos seleccionados, de microssistemas aplicados na área de diagnósticos clínicos.

Um sistema baseado na electroforese capilar para a separação de pequenas moléculas do plasma sanguíneo e posterior determinação quantitativa encontra-se ilustrado na Figura 1.13. O dispositivo tem uma espessura de 3 mm, dimensões externas de 35 mm × 65 mm, e é composto por duas placas de vidro termicamente coladas. Na placa superior foram perfurados orifícios para a introdução dos líquidos. O canal para electroforese capilar tem 20 μm (espessura) × 60 μm (largura) × 4.2 cm (comprimento). A sua aplicação contemplou a separação e quantificação da carnitina, um composto envolvido no metabolismo dos ácidos gordos, em apenas 30 segundos [37].

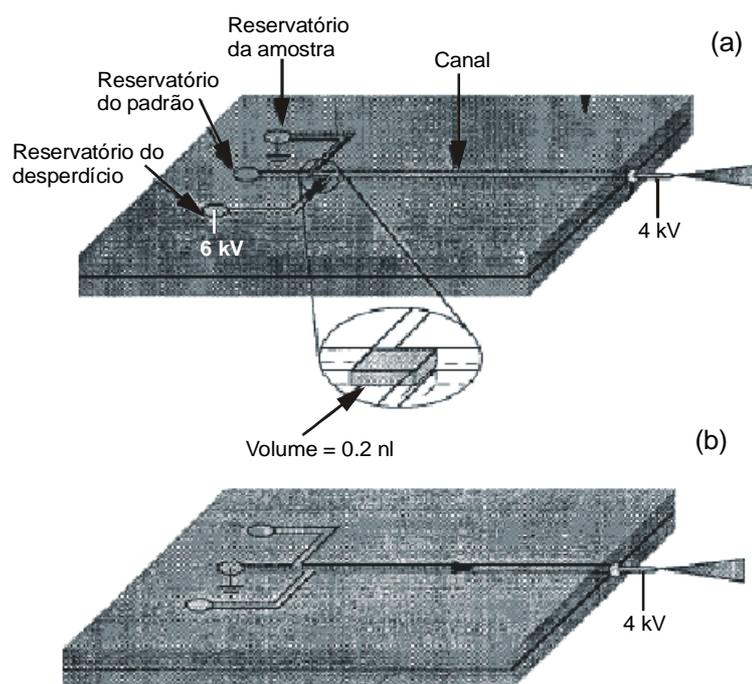


Figura 1.13: Desenho esquemático do microssistema em vidro para electroforese capilar: (a) operação de carregamento das amostras; (b) operação de electroforese [37].

A detecção da cisteína no plasma sanguíneo por electroforese capilar num microssistema foi apresentada por Pasas *et al.* A Figura 1.14 apresenta o esquema do dispositivo. As condições de separação e detecção implementadas no microssistema foram exactamente as mesmas dos sistemas convencionais para a mesma aplicação. A separação e detecção foram realizadas em menos de 2 minutos [38].

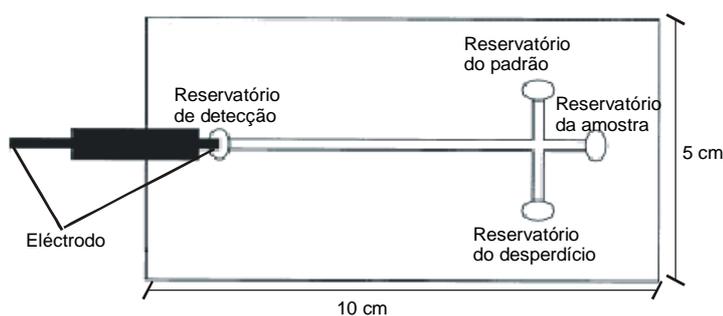


Figura 1.14: Desenho esquemático do microssistema. Os canais têm uma profundidade de $12.1 \mu\text{m}$, e uma largura de $51.0 \mu\text{m}$. Os eléctrodos de referência e os auxiliares (não visíveis na figura) estão localizados no reservatório de detecção [38].

A Figura 1.15 mostra um dispositivo para separar múltiplas bactérias do sangue por electroforese, sem a utilização de múltiplos anticorpos. A separação das bactérias foi conseguida com uma eficiência de 97%. O microssistema tem a vantagem, por exemplo

em análises clínicas, de conseguir detectar antigénios antes do corpo começar a produzir os anticorpos, pelo que pode detectar a doença no seu estado inicial [39].

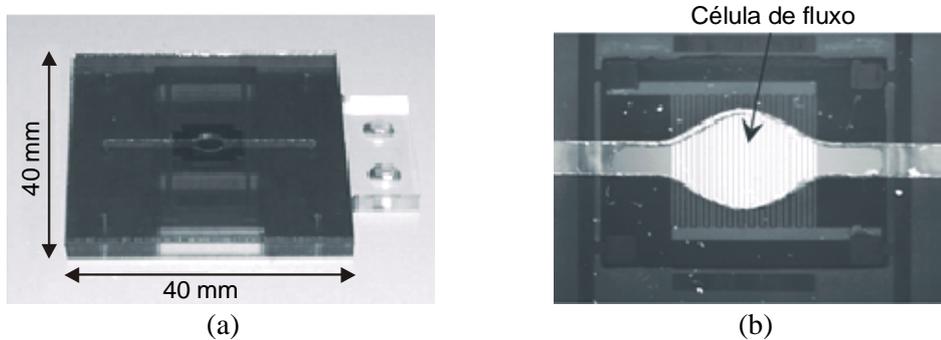


Figura 1.15: Fotografia do dispositivo completo [39].

Um microsistema que permite a detecção de várias moléculas no sangue através de electrosmose encontra-se na Figura 1.16. O microcapilar com $30 \times 30 \mu\text{m}$ (espessura \times largura) foi fabricado num substrato de dióxido de silício com dimensões de $2 \times 2 \text{ cm}$ (largura \times comprimento). No microcapilar foi depositado um polímero biocompatível por forma às moléculas do sangue aderirem às paredes do capilar [40].

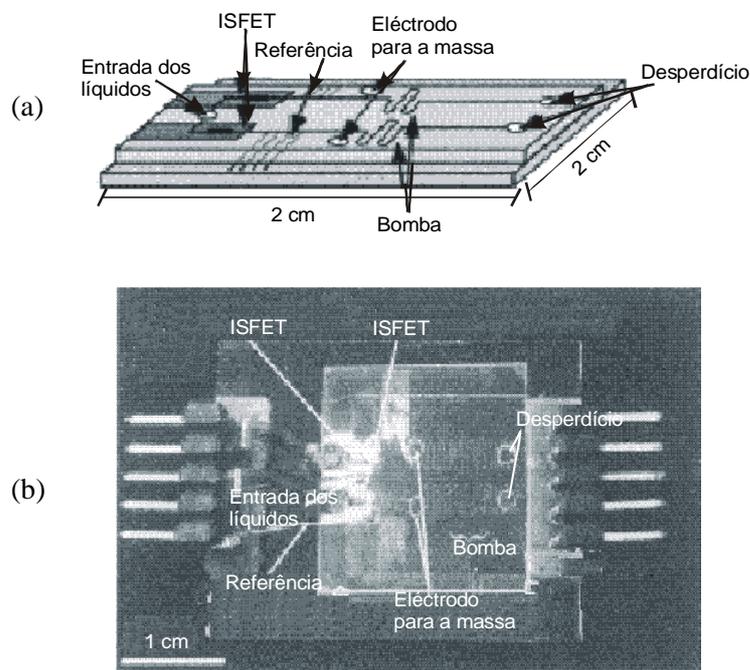


Figura 1.16: (a) Diagrama esquemático do protótipo do microsistema no qual os sensores ISFET estão incluídos; (b) fotografia do microsistema fabricado [40].

Apesar da maior parte dos microssistemas serem implementados para análise sanguínea, existem já alguns para análise de outros fluidos biológicos. É o caso da análise de amostras de urina com elevados níveis de aminoácidos como um indicativo de desordem do metabolismo dos aminoácidos e mau funcionamento do fígado. Esta análise foi realizada, num microssistema (Figura 1.17), utilizando a separação por electroforese com um método de detecção por fluorescência. Dezanove dos aminoácidos padrão da urina podem ser detectados por este microssistema, com um limite médio de detecção de $32.9 \mu\text{M}$ [41, 42].

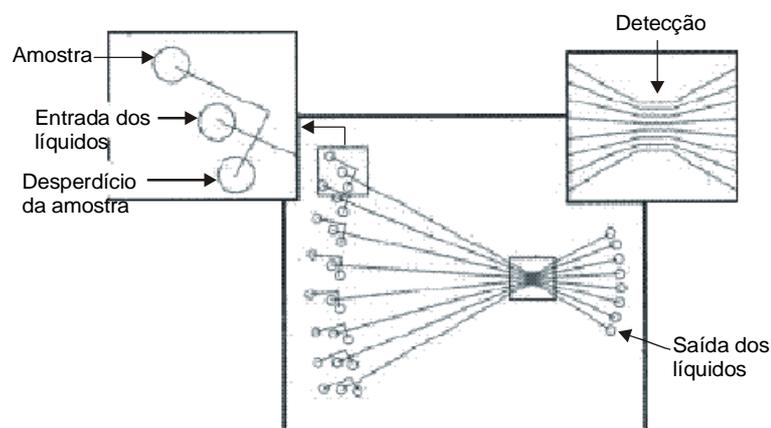


Figura 1.17: Configuração do microssistema para electroforese [42].

A técnica de separação por electroforese capilar foi aplicada a uma amostra de urina para separar o oxalato. O microssistema incorpora ainda o método de detecção do oxalato por condutividade. A Figura 1.18 ilustra o esquema dos canais fabricados em PMMA (*PolyMethylMethAcrylate*). Foi conseguida uma detecção de concentrações de 80 nM em cerca de 280 s , sem necessidade de pré-tratamento da urina [43].

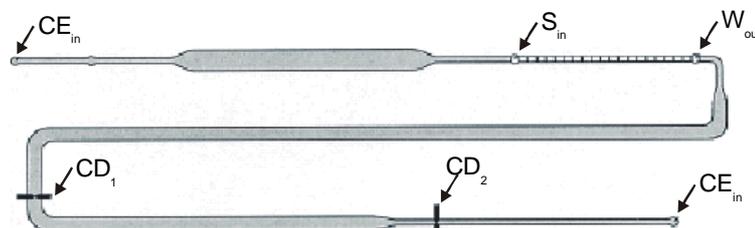


Figura 1.18: Esquema ilustrativo dos canais em PMMA no microssistema. CE_{in} : entrada da solução electrolítica portadora; S_{in} : entrada da amostra; W_{out} : saída dos desperdícios; CD_1 e CD_2 : sensores de platina. O canal de injeção da amostra é definido por S_{in} e W_{out} (12.5 mm de comprimento, 0.2 mm de largura e 0.2 mm de profundidade). O canal de separação é definido por W_{out} a CD_2 (90.8 mm de comprimento, 0.5 mm de largura e 0.2 mm de profundidade) [43].

Uma enorme variedade de microssistemas em várias áreas biomédicas mostra claramente que estes são um campo de pesquisa bastante interessante. No que diz respeito à área de diagnósticos clínicos um enorme número de microssistemas tem sido desenvolvido. Pode dizer-se que existem uma série de microssistemas para análise de proteínas. Contudo, a maior parte deles são baseados em técnicas de electroforese capilar. Isto é compreensível uma vez que minimizar a técnica de electroforese resulta numa redução do tempo necessário à separação das proteínas de mais de 90%. Contudo, os sistemas para quantificar e determinar as proteínas separadas por electroforese, são normalmente complexos quando integrados num microssistema. É essencial que a sua detecção seja de elevada sensibilidade, uma vez que necessita de detectar entre 100 a 10^5 moléculas de dimensões entre 1 Å a 10 µm.

Microssistemas que sejam fáceis de usar, portáteis e que tenham um custo similar aos testes diagnósticos realizados com fita reagente, mas que forneçam resultados quantitativos fiáveis, ainda são uma lacuna. Exemplos dessas lacunas são microssistemas para quantificar proteínas e outras biomoléculas da urina, do fluido cerebrospinal e mesmo do plasma sanguíneo. Estes devem incluir um sistema de leitura dos resultados que permita na hora e no local determinar os valores dessas biomoléculas, de forma a obter-se imediatamente um diagnóstico definitivo.

Em meados de 2003 surgiu um modelo comercialmente disponível que de alguma forma preenche essas lacunas, o Urisys1100 da Roche (Figura 1.19). Este dispositivo, específico para análises de rotina à urina, permite analisar um máximo de 10 biomoléculas ou compostos da urina simultaneamente [44]. Contudo, o método utilizado é o da fita reagente embebida em urina. Note-se que nos laboratórios de análises clínicas os reagentes existem na forma líquida. Uma desvantagem deste módulo é a possível contaminação das amostras, uma vez que as fitas reagentes são colocadas numa régua, que se não for bem limpa após cada análise, pode deixar resíduos que afectem a leitura. Outra desvantagem face aos equipamentos convencionais dos laboratórios de análises clínicas é que os resultados são quantitativos apenas quando os valores se encontram fora da gama de valores normais. Caso contrário, o valor impresso no papel será de NEG (negativo) ou NOR (normal), consoante a biomolécula a analisar (ver Figura 1.19). É óbvio que num primeiro diagnóstico estes resultados qualitativos servem. Contudo, em alguns casos o valor quantitativo dentro dos padrões normais mas perto dos valores anormais, pode indicar um indício de doença. Quando o resultado é um valor anormal, esse valor encontra-se dentro de determinadas gamas de concentrações, não se obtendo uma gama de valores linear. Além disso, no caso de ser o

próprio paciente a fazer a análise, o facto de utilizar fitas reagentes pode ser uma desvantagem face à utilização de reagentes líquidos. Inconscientemente, existe mais cuidado no manuseamento de reagentes líquidos.

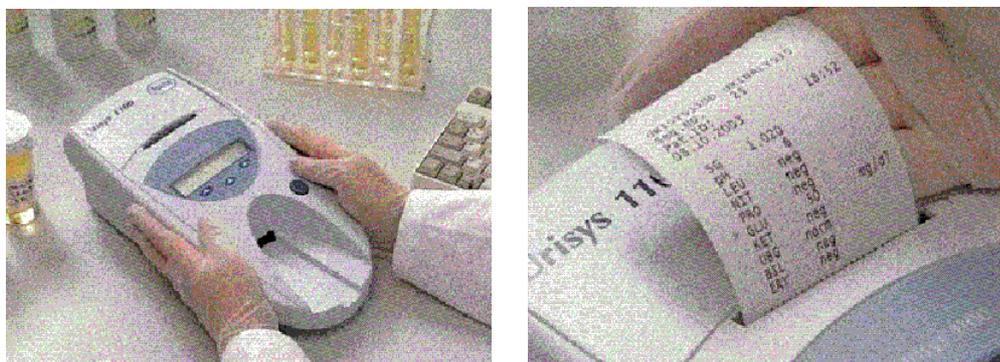


Figura 1.19: Fotografia do dispositivo Urisys1100 [44].

1.2 Motivação e objetivos

Este projecto contribui para a área de diagnósticos clínicos através do desenvolvimento e fabrico de um microssistema que satisfaz as lacunas anteriormente descritas. Pretende construir-se um microssistema para quantificar várias biomoléculas dos fluidos biológicos, que funcione de forma análoga aos aparelhos utilizados nos laboratórios de análises clínicas (por espectrofotometria, ver secção 1.1.3), que tenha o mesmo ou melhor desempenho (preciso e fiável), que o local de circulação dos fluidos seja descartável, que inclua um sistema de leitura dos resultados e cujo custo, quando produzido em massa, seja similar ao custo da aquisição das fitas reagentes nas farmácias. Qualquer técnico de saúde (ou mesmo qualquer pessoa caso o fluido seja a urina), após a recolha da amostra do fluido biológico, deve colocá-la no microssistema e obter de imediato um resultado quantitativo e fiável.

1.2.1 Conceito de microssistema de fluidos biológicos

O conceito de um microssistema para análise de fluidos biológicos relaciona-se com um dispositivo capaz de realizar todos os procedimentos necessários para a análise de uma amostra. O seu projecto é ditado pela tecnologia disponível para o fabricar, sendo necessário uma procura contínua de novos materiais, novas técnicas de fabrico, novas estruturas para o desenho dos canais, novos sistemas de leitura dos resultados e novas interfaces com o exterior. A integração destes conceitos num único *chip* ainda é

um desafio. Geralmente, estes *chips* só são fabricados para aplicações muito específicas e quando se prevê que o número de vendas permite recuperar os enormes investimentos no desenvolvimento do processo. Deste modo, o microssistema pode permitir que alguns dos seus componentes sejam montados em várias e independentes configurações, formando um sistema modular completo.

Um microssistema para análise de fluidos biológicos por espectrofotometria é, normalmente, composto por dois módulos distintos. Um deles contém os canais nos quais circularão os fluidos. O outro inclui o sistema de detecção e leitura dos resultados da análise. O módulo para a circulação dos fluidos pode ser fabricado em vidro, em polímero ou mesmo em silício. Neste último caso, o sistema de detecção não pode ser baseado em medições ópticas, uma vez que o silício não possui transparência na região visível do espectro electromagnético. Actualmente, o uso de materiais poliméricos está a ser uma tendência dominante, principalmente quando se pretende um dispositivo descartável. Neste caso, a contaminação entre as diversas análises deixa de ser um problema e desaparece o custo inerente aos produtos de limpeza dos locais de circulação dos fluidos. Note-se que o custo de um dispositivo de polímero, quando produzido em larga escala, é muito baixo. O sistema de detecção e leitura dos resultados inclui um detector óptico e electrónica de leitura. Esta realiza a conversão do sinal do detector para um sinal digital para posterior aquisição e tratamento dos dados num computador. Todo este módulo, incluindo o detector, pode ser fabricado utilizando microelectrónica *standard*, o que possibilita a integração do detector, da electrónica de leitura e adição de circuitos suplementares num único *chip*.

Um microssistema como o descrito abre aos médicos a possibilidade de fazer análises aos fluidos biológicos (tais como: sangue, urina, saliva, fluido cefalorraquidiano) na hora da consulta e permite ser utilizado pelos pacientes na sua própria casa.

1.2.2 Microssistema laboratorial para análise de urina: Microlab

A urina foi o fluido biológico utilizado para testar o Microlab. A sua escolha deveu-se em primeiro lugar ao facto da amostra retirada da urina poder ser directamente utilizada nas medições (por exemplo, na maior parte das análises ao sangue é necessário separar o plasma e o soro sanguíneo). Em segundo lugar, pensando no Microlab, é o fluido biológico com menos viscosidade e por isso mais fácil de fluir nos canais a implementar. Contudo, outros fluidos biológicos podem ser utilizados no mesmo Microlab desde que a análise seja realizada da mesma forma. O Microlab permite

analisar biomoléculas para as quais não existem fitas reagentes comercialmente disponíveis.

O Microlab desenvolvido neste trabalho é composto por três módulos (Figura 1.20 e Figura 1.21): o sistema de circulação dos fluidos, o sistema de filtragem óptica e o sistema de detecção e leitura.

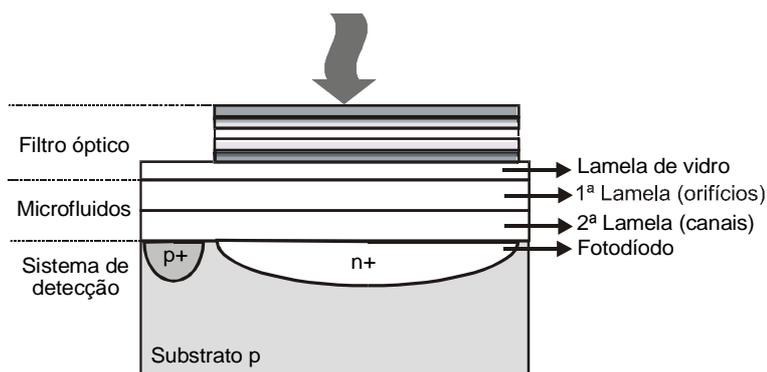


Figura 1.20: Esquema da estrutura do Microlab para um canal óptico individual, vista em corte.

O sistema de circulação dos fluidos, ou simplesmente sistema de microfluidos, é fabricado em vidro e é composto por duas lamelas cada uma com 1 mm de espessura (Figura 1.21(b)). A primeira lamela tem os orifícios para a injeção e remoção dos líquidos e a segunda inclui os canais. O Microlab contém basicamente três canais. Um para obter a linha de referência. Outro para o fluido a analisar. Este tem duas entradas e uma saída para permitir a mistura do fluido com o reagente de forma automática. Por fim, o terceiro canal é necessário para calibrar a concentração da biomolécula a medir (com um padrão de concentração conhecida) e para calibrar a fonte de luz.

O sistema de filtragem óptica encontra-se por cima do módulo anterior (ver Figura 1.20). É composto por uma lamela de vidro de 0.5 mm de espessura na qual são depositados filmes finos de material dielétrico para formar filtros ópticos passa-banda. Os filtros ópticos têm como função seleccionar o comprimento de onda, dentro do espectro electromagnético de luz visível, adequado à biomolécula que se pretende analisar. O uso de filtros ópticos no Microlab permite que as medições sejam realizadas com uma fonte de luz convencional (por exemplo, simples luz branca), evitando assim as tradicionais e dispendiosas fontes de luz dependentes do comprimento de onda (por exemplo, fonte monocromática). O uso de uma fonte de luz branca nas medições faz com que o sistema seja portátil e adequado para medições em qualquer local. Em vez de um único filtro, é implementada uma matriz de 16 filtros ópticos (Figura 1.21(a)) o que permite medir 16 biomoléculas diferentes com o mesmo Microlab.

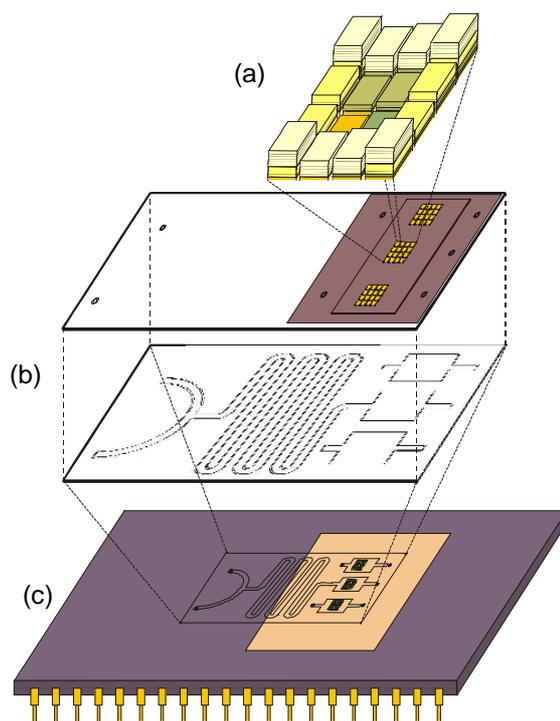


Figura 1.21: Esquema do Microlab.

O sistema de detecção e leitura encontra-se por baixo dos outros dois (ver Figura 1.20) e é fabricado segundo um processo CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*) *standard*. Contém uma matriz de fotodíodos para medir a intensidade do feixe de luz transmitido através da mistura. Este feixe, com várias componentes espectrais, é filtrado pelos filtros ópticos obtendo-se apenas uma banda muito estreita com poucas componentes espectrais. A matriz de fotodíodos é posicionada exactamente debaixo da matriz dos filtros ópticos (Figura 1.21(c)). Para converter o sinal analógico dos fotodetectores num sinal digital, um conversor luz - frequência foi implementado e integrado no mesmo processo de fabrico.

Na Figura 1.22 encontra-se uma fotografia do Microlab. O funcionamento do Microlab baseia-se na detecção colorimétrica por absorção óptica. A amostra, na qual se encontra a biomolécula a ser analisada, quando misturada com um determinado reagente produz uma determinada cor. A intensidade dessa cor é directamente proporcional à concentração da biomolécula em análise. A detecção colorimétrica consiste na medição da intensidade dessa cor. Para tal, um feixe de luz é direccionado para o canal no qual se encontra a mistura a analisar. A intensidade da luz transmitida através da mistura é medida por um fotodetector colocado por baixo da zona de medição. A intensidade medida pelo fotodetector é proporcional à concentração da biomolécula em análise.

Desta forma, consegue quantificar-se a concentração de biomoléculas existentes em fluidos biológicos.

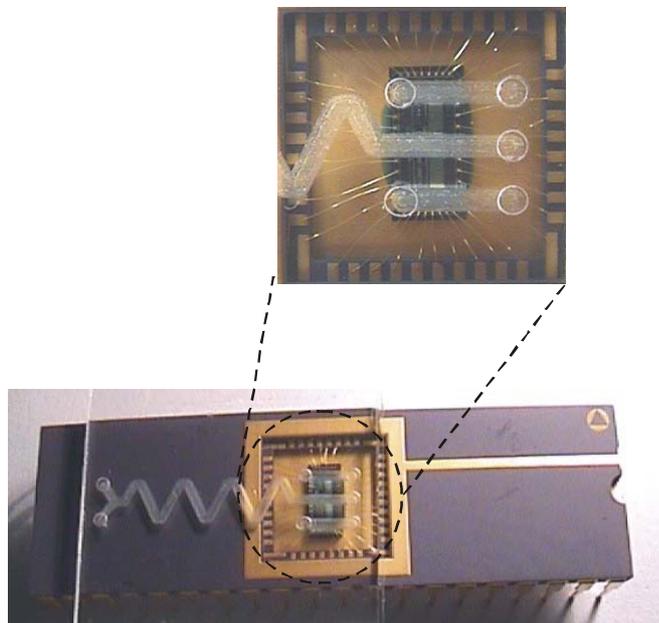


Figura 1.22: Fotografia do Microlab.

1.3 Organização da tese

Este capítulo contém uma breve descrição sobre a análise aos fluidos biológicos realizada nos laboratórios de análises clínicas e as vantagens de fazer esta análise num microssistema. Inclui também uma revisão de microssistemas já implementados descritos na literatura e estabelece a noção, motivação e objectivo deste projecto. O capítulo 2 apresenta uma panorâmica geral sobre a urina, os seus componentes e a importância clínica desses componentes. Determina-se ainda o volume mínimo de amostra a utilizar para que não se invalide o método de análise. O capítulo 3 dedica-se ao sistema de microfluidos, i. é., à estrutura dos microcanais, através de simulações computacionais de forma a obter-se um modelo dinâmico tridimensional de fluidos. No capítulo 4 aborda-se como as estruturas de filmes finos podem ser analisadas, compreendidas e aplicadas no projecto de filtros ópticos baseados em filmes finos. O capítulo 5 apresenta o fotodetector e a electrónica de leitura e de conversão do seu sinal realizada por um conversor luz – frequência. O fabrico do Microlab é descrito no capítulo 6. O capítulo 7 refere e documenta os resultados práticos obtidos através de várias experiências, com o objectivo de testar o funcionamento do Microlab. No capítulo 8 são tecidas algumas considerações globais sobre o trabalho realizado, bem

como sugestões que poderão ser efectuadas sobre o trabalho já desenvolvido. As figuras, equações e tabelas presentes nesta tese são numeradas com dois identificadores numéricos independentes, separados por um ponto. O primeiro identificador indica o capítulo ao qual essa figura, equação ou tabela pertencem. O segundo representa a numeração sequencial dentro de cada capítulo. A notação adoptada ao longo do texto e o significado dos acrónimos e dos símbolos mais utilizados são descritos numa lista de símbolos, situada após o índice. As referências bibliográficas, segundo a norma portuguesa NP405-1, são indicadas por um número dentro de parênteses rectos. A numeração é realizada de forma sequencial e associada a uma referência bibliográfica indicada no final de cada capítulo na secção “Bibliografia”.

Bibliografia

- [1] DEVLIN, T. M. - *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. John Wiley & Sons, 1997.
- [2] STRASINGER, S. K; Di LORENZO, M. S. - *Urinalysis and body fluids*. 4th ed. F. A. Davis Company, Philadelphia, 2001.
- [3] SIMÕES, T. S. [et al.] - *Técnicas laboratoriais de química*. Porto Editora, 1994, bloco I.
- [4] TSELIUS, A. - *Journal of Biochemistry*. Vol. 31 (1937), p. 1464.
- [5] BRUNZEL, N. A. - *Fundamental of urine and body fluids analysis*. W. B. Saunders Company, USA, 1994.
- [6] KOPP, M. U.; CRABTREE, H. J.; MANZ, A. - *Developments in technology and applications of microsystems*. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol. 3, nº 1 (1997), p. 410-419.
- [7] THIEBE, L.; VINCI, K.; GARDNER, J. - *Nurs. Manage*. Vol. 24 (1993) p. 54-56.
- [8] PETERSEN, K. E. [et al.] - *Toward next generation clinical diagnostics instruments: scaling and new processing paradigms*. *Journal of Biomedical Microdevices*. Vol. 2, nº 1 (1999), p. 71-79.
- [9] MASCINI, M.; VADGAMA, P. - *Implantation and sampling sites*. *Advances in biosensors*. ed. A. P. F. Turner, JAI Press Ltd., Middlesex UK, 1993, suppl. 1, p. 109-139.

-
- [10] JAKEWAY, S. C.; de MELLO, A. J.; RUSSELL, E. - *Miniaturized total analysis systems for biological analysis*. Fresenius J. Analytical Chemistry. Vol. 366 (2000), p. 525-539.
- [11] MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. - *Miniaturized total chemical systems: a novel concept for chemical sensing*. Sensors and Actuators, Vol. B1 (1990) p. 244-248.
- [12] KOCH, M.; EVANS, A.; BRUNNSCHWEILER, A. - *Microfluidic technology and applications*. Research Studies Press Ltd., Baldock, England, 2000.
- [13] NGUYEN, N-T; WERELEY, S. T. - *Fundamentals and applications of microfluidics*. Artech House Inc., Boston MA, 2002.
- [14] HARRISON, D. J. [et al.] - *The decade's search for the killer Ap in μ -TAS*. Proceedings Micro Total Analysis Systems (μ TAS). Enschede, The Netherlands, (2000), p. 195-204.
- [15] DARIO, P. [et al.] - *Micro-systems in biomedical applications*. Journal of Micromechanics and Microengineering. Vol. 10, n° 2 (2000), p. 235-244.
- [16] JACOBSON, S. C. [et al.] - Analytical Chemistry. Vol. 70 (1998) p. 3476.
- [17] http://www.nanogen.com/products/nanochip_micro.htm.
- [18] CAMPOS, L. S. - *Entender a Bioquímica: o metabolismo fundamental em animais e plantas*. 2ª ed. Escolar Editora, Lisboa, 1999.
- [19] NAGAI, H. [et al.] - *Development of a microchamber array for picoliter PCR*. Analytical Chemistry. Vol. 73 (2001), p. 1043-1047.
- [20] KOPP, M. U.; de MELLO, A. J.; MANZ, A. - *Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip*. Science. Vol. 280, (1998), p. 1046-1048.
- [21] SCHNEEGAß, I.; BRÄUTIGAM, R.; KÖHLER, J. M. - *Miniaturized flow-through PCR with different template types in a silicon chip thermocycler*. Lab on a chip. Vol. 1, n° 1 (2001), p. 42-49.
- [22] PAEGEL, B. M. [et al.] - *High throughput DNA sequencing with a microfabricated 96-lane capillary array electrophoresis bioprocessor*. Proceedings of National Acad. Sci USA. Vol. 99, n° 2 (2002), p. 574-579.
- [23] HE, B.; TAIT, N.; REGNIER, F. - *Fabrication of Nanocolumns for Liquid Chromatography*. Analytical Chemistry. Vol. 70 (1998), p. 3790-3797.
-

- [24] HARRISOJ, D. J. [et al.] - *Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip*. Analytical Chemistry. Vol. 64 (1992), p. 1926-1932.
- [25] HARRISON, D. J. [et al.] - *Analytica Chimica Acta*. Vol. 283 (1993), p. 361-366.
- [26] MANZ, A. [et al.] - *Planar chip technology for capillary electrophoresis*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. Vol. 348 (1994), p. 567-571.
- [27] MANZ, A. [et al.] - *Journal High Resolution Chromatography*. Vol. 16 (1993), p. 433-436.
- [28] SEILER, K.; HARRISON, D. J.; MANZ, A. - *Planar glass chips for capillary electrophoresis: repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency*. Analytical Chemistry. Vol. 65 (1993), p. 1481-1488.
- [29] HARRISON, D. J. [et al.] - *Science*. Vol. 261 (1993), p. 895-897.
- [30] EFFENHAUSER, C. S.; MANZ, A.; WIDMER, H. M. - *Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights*. Analytical Chemistry. Vol. 65 (1993), p. 2637-2642.
- [31] JACOBSON, S. C. [et al.] - *High-speed separations on a microchip*. Analytical Chemistry. Vol. 66 (1994), p. 1114-1118.
- [32] FAN, Z. H.; HARRISON, D. J. - *Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections*. Analytical Chemistry. Vol. 66 (1994), p. 177-184.
- [33] JIN, L. J.; GIORDANO, B. C.; LANDERS, J. P. - *Dynamic labeling during capillary or microchip electrophoresis for laser-induced fluorescence detection of protein-SDS complexes without pre-or postcolumn labeling*. Analytical Chemistry. Vol. 73 (2001), p. 4994-4999.
- [34] SATO, K. [et al.] - *Microchip-based immunoassay with branching multichannels for simultaneous determination of interferon- γ* . Electrophoresis. Vol. 23 (2002), p. 734-739.
- [35] FUHR, G.; SHIRLEY, S. G. - *Biological application of microstructures*. Microsystem technology in Chemistry and Life Sciences. Springer Pub. (1999), p. 83-116.

- [36] THIÉBAUD, P. [et al.] - *PDMS device for patterned application of microfluids to neuronal cells arranged by microcontact printing*. *Biosensors & Bioelectronics*. Vol. 17 (2002), p. 87-93.
- [37] DENG, Y.; ZHANG, H.; HENION, J. - *Chip-Based Quantitative Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry Determination of Drugs in Human Plasma*. *Analytical Chemistry*. Vol. 73 (2001), p. 1432-1439.
- [38] PASAS, S. A. [et al.] - *Detection of homocysteine by conventional and microchip capillary electrophoresis/electrochemistry*. *Electrophoresis*. Vol. 23 (2003), p. 759-766.
- [39] HUANG, Y. [et al.] - *Separation of simulants of biological warfare agents from blood by a miniaturized dielectrophoresis device*. *Biomedical Microdevices*. Vol. 5, nº 3 (2003), p. 217-255.
- [40] OKI, A. [et al.] - *Electroosmosis injection of blood serum into biocompatible microcapillary chip fabricated on quartz plate*. *Electrophoresis*. Vol. 22 (2001), p. 341-347.
- [41] MUNRO, N. J. [et al.] - *Indirect fluorescence detection of amino acids on electrophoretic microchips*. *Analytical Chemistry*. Vol. 72 (2000), p. 2765-2773.
- [42] MUNRO, N. J. [et al.] - *Molecular diagnostics on microfabricated electrophoretic devices: from slab gel- to capillary- to microchip-based assays for T- and B-cell lymphoproliferative disorders*. *Clinical Chemistry*. Vol. 45, nº 11 (1999), p. 1906-1917.
- [43] ZÚBOROVÁ, M. [et al.] - *Determination of oxalate in urine by zone electrophoresis on a chip with conductivity detection*. *Electrophoresis*. Vol. 23 (2002), p. 774-781.
- [44] www.roche-diagnostics.com/npt.

2

Detecção colorimétrica na quantificação de biomoléculas na urina

Neste capítulo será apresentada uma breve descrição da urina e seus compostos, assim como as implicações clínicas de algumas das suas biomoléculas. Seguidamente determinar-se-á o volume mínimo de amostra a utilizar, tendo presente que se deve garantir uma quantidade significativa da biomolécula a analisar. Por fim, descrevem-se os conceitos gerais, requisitos e métodos para a análise quantitativa da concentração de biomoléculas na urina por absorção óptica na gama da luz visível: detecção colorimétrica. Este método de detecção é o utilizado nos laboratórios de análises clínicas e pretende-se que seja implementado no Microlab.

2.1 Urina

A urina foi o fluido biológico seleccionado para estudo neste trabalho. Daí a necessidade de dedicar esta secção à formação, à composição e à importância clínica de alguns compostos da urina.

2.1.1 História

Pode dizer-se que a medicina laboratorial começou com as análises de urina. Referências ao estudo da urina podem ser encontradas em hieroglíficos Egípcios e em desenhos em cavernas [1]. Apesar dos clínicos desse tempo não disporem dos sofisticados mecanismos de teste disponíveis hoje em dia, eles conseguiam obter

informação diagnóstica de observações básicas como a cor, a turbulência, o odor, o volume, a viscosidade e mesmo a doçura (notando neste caso que algumas amostras atraíam formigas). Estas mesmas características da urina (características físicas) são ainda hoje analisadas em laboratórios e continuam a ter um papel importante numa análise de rotina à urina. Durante um exame inicial (físico) à urina é possível deduzir a existência de algumas doenças com base em biomoléculas anormais aí presentes. Contudo, a análise de urina expandiu as suas metas de modo a incluir não apenas o exame físico, mas também a análise química e o exame microscópico dos sedimentos da urina (conforme referido na secção 1.1.3).

2.1.2 Formação da urina

A urina, um líquido muito complexo, é composta por 95% de água e 5% de sólidos. É o produto final do metabolismo realizado por biliões de células no sistema renal e urinário e resulta numa eliminação média de 1 a 1.5 litros de urina por dia, dependendo da ingestão hídrica.

A formação da urina ocorre nos rins. Estes, juntamente com a pele e o sistema respiratório, são os principais órgãos excretores do corpo. A importância da formação e excreção da urina como função reguladora é profundamente enfatizada ao lidar-se com situações nas quais a função do rim é subitamente perdida. Nestas circunstâncias, pode ocorrer a morte dentro de poucos dias. Uma grande quantidade de sangue circulante flui através dos rins: 25% do sangue do lado esquerdo do coração atravessam os rins. Um litro de urina é o produto final de mais de 1000 ml de sangue circulante que atravessa os rins. O rim possui a importante capacidade de diluir ou concentrar urina, de acordo com as necessidades do indivíduo, e regular a excreção do sódio. A bioquímica sanguínea, a pressão sanguínea, o equilíbrio hídrico, a ingestão de nutrientes, juntamente com o estado geral de saúde, são elementos fundamentais em todo este processo metabólico.

2.1.3 Composição da urina

A urina contém milhares de biomoléculas e compostos dissolvidos e é o fluido que excreta mais sólidos do organismo. A Tabela 2.1 compara as quantidades e os pesos dos principais compostos da urina. Note-se que a quantidade de um composto em milimoles é relativa ao número de partículas/moléculas presentes, enquanto o peso do composto refere-se à sua massa. Estas quantidades são necessárias para o cálculo do volume mínimo de urina a utilizar no Microlab, de modo a garantir pelo menos uma

molécula de uma determinada biomolécula ou composto. Na secção 2.2 abordar-se-á esta questão.

Tabela 2.1: Composição média de alguns compostos da urina numa colecta de 24 horas [2].

Composto	Quantidade média (mmol)	Peso médio (mg)
Água (1.2 litros ¹)	67000.00	1200000
Ureia	400.00	24000
Cloreto	185.00	6570
Sódio	130.00	2990
Potássio	70.00	2730
Amónia	40.00	720
Fosfato inorgânico	30.00	2850
Sulfato inorgânico	20.00	1920
Creatinina	11.80	1335
Ácido úrico	3.00	505
Glicose	0.72	130
Albumina	0.001	90
Proteína total	≈ 0.003	150

¹ A média de urina colectada em 24 horas, com uma razão de filtração glomerular de 125 mmol/min.

Dos compostos existentes na urina que são analisados por detecção colorimétrica, apenas a importância clínica da proteína total e do ácido úrico será descrita. Esta escolha foi baseada em informação retirada de laboratórios de análises clínicas, os quais reportaram as biomoléculas analisadas normalmente em testes de rotina à urina. Dessas biomoléculas escolheram-se as duas acima referidas - proteína total e ácido úrico - para verificar o correcto funcionamento do Microlab.

2.1.4 Importância clínica da proteinúria e albuminúria

A quantidade de proteína na urina (proteinúria) é o indicativo mais relevante de doença renal. Em indivíduos saudáveis existem apenas vestígios de proteína que pode ir até cerca de 150 mg/l [1]. A medição da quantidade de proteína total existente numa pessoa é uma forma de averiguar o seu estado de saúde, não só no diagnóstico de doenças relacionadas com o mau funcionamento dos rins, como também pelo facto de quantidades anormais de proteína total na urina poderem significar cancro, por exemplo. Já na década de 70 foi demonstrada a existência de mais de 200 proteínas urinárias [3]. Através do método colorimétrico apenas se consegue determinar a concentração das proteínas da urina (total ou específica). A discriminação/separação dessas proteínas

poderá ser feita através de electroforese, por exemplo. Sabe-se porém que essas proteínas consistem em albumina (um terço da proteinúria é albumina) e globulinas do plasma. Contudo, existem reagentes específicos para quantificar determinadas proteínas na urina através do método colorimétrico. É o caso da albumina, bilirrubina, entre outras [4].

A razão entre a albumina e a proteína total presente na urina de pessoas doentes, pode ajudar a distinguir qual o tipo de doença que está a afectar o rim. Por isso, pode ser vantajoso utilizar simultaneamente um teste de quantificação de proteína total e um teste de quantificação de proteína específico para a albumina. Além disso, a medida da albumina na urina, separada das outras proteínas aí existentes, normalmente chamada de “albuminúria”, é muito útil na previsão de diagnósticos precoces de doenças renais e sua progressão. Mais ainda, a albuminúria é um indicador chave da necessidade de tratamento intensificado em pacientes com diabetes. Contudo, a concentração de albumina na urina é baixa (de 50 a 150 mg/l), pelo que para a sua determinação precisa são necessários métodos de elevada sensibilidade.

2.1.5 Importância clínica do ácido úrico na urina

O ácido úrico representa o principal produto final do metabolismo das purinas, sendo excretado na urina. Depois da hidrólise dos ácidos nucleicos, as bases púricas livres, são convertidas, principalmente a nível do fígado, em uratos. A quantidade de ácido úrico excretado na urina é dependente da alimentação (ingestão de carnes, fígado, rim, certos vinhos, etc.). A quantidade média excretada na urina por um adulto é de aproximadamente 0.4 a 0.8 g de ácido úrico por dia. Numa dieta pobre em purinas essa quantidade poderá descer até 0.12 g/dia e numa dieta rica em purinas poderá atingir 1 g/dia. Se uma pessoa, em média, excreta 1.5 litros de urina por dia, as quantidades referidas serão de 267 mg/l a 533 mg/l (dieta normal), 80 mg/l (dieta pobre em purinas) e 667 mg/l (dieta rica em purinas).

O ácido úrico é pouco solúvel, pelo que quando os seus valores são superiores aos valores normais poderá haver precipitação dessa biomolécula no organismo, o que determina o aparecimento de fenómenos dolorosos nas articulações (há deposição de ácido úrico nas articulações). Níveis elevados de ácido úrico ocorrem em doenças como a gota, leucemia mielóide crónica, policitemia vera, síndrome de *Lesch-Nyhan*, doença de *Wilson*, hepatite viral, anemia falciforme, gravidez com subcarga de sal, drogas

citotóxicas para tratar linfoma e leucemia, etc. Níveis baixos são encontrados em doença renal crónica, deficiência de ácido fólico e intoxicação por chumbo [1].

2.2 Biomoléculas em pequenos volumes de urina

O volume de ensaio para a análise de urina utilizado nos laboratórios de análises clínicas é de 1 ml. No Microlab pretende-se que seja da ordem dos 10 μ l. Assim, é necessário provar que a redução do volume de líquido ensaiado não impeça a existência de pelo menos uma quantidade significativa de moléculas a analisar. Por isso, é necessário saber até que ponto se pode reduzir o volume da amostra de forma a garantir um número significativo de moléculas da biomolécula a analisar. A relação entre o volume da amostra, V (l), e a concentração da biomolécula a analisar, C (mol/l), é dada por [5],

$$V = \frac{1}{\eta \times N_{AV} \times C} \quad (2.1)$$

onde η é a eficiência do sensor ($0 \leq \eta \leq 1$) e $N_{AV} = 6.023 \times 10^{23}$ é o número de *Avogadro*. Esta equação demonstra que o volume da amostra é determinado pela concentração da biomolécula que se pretende analisar. Mais ainda, a concentração de uma determinada biomolécula determina a quantidade de moléculas presentes para um determinado volume de amostra. Geralmente, os ensaios para quantificar biomoléculas, requerem concentrações dessa biomolécula na amostra que tenham entre 10^{14} e 10^{21} moléculas por mililitro [5].

2.2.1 Dimensão de uma molécula de albumina

Para determinar a ordem de grandeza do volume mínimo a utilizar quando se pretende quantificar a proteína total na urina utilizou-se uma proteína muito representativa, a albumina (recorde-se que esta representa 1/3 das proteínas totais da urina). O problema resolver-se-á na situação mais delicada, ou seja, com a concentração de albumina mais baixa existente na urina (50 mg/l). Note-se que quanto maior a concentração mais moléculas de albumina se encontram num determinado volume da amostra. O menor volume da amostra para garantir que esta contenha pelo menos uma molécula de albumina pode ser calculado pelo método que se apresenta a seguir.

Da Tabela 2.1, conclui-se que 1 μmol de albumina pesa 90 mg e contém 6.023×10^{17} moléculas (1 mol = 6.023×10^{23} partículas). Na concentração mais baixa, 50 mg/l, existem 3.35×10^{17} moléculas de albumina. Pelo que, em 1 pl de amostra de urina com a albumina à concentração de 50 mg/l (50 fg/pl) existem 3.35×10^5 moléculas de albumina. Com estes valores conclui-se que a análise de albumina e consequentemente de proteína total na urina (esta última além de albumina ainda contém mais proteínas o que aumenta a quantidade de moléculas), pode ser realizada num microssistema. No Microlab, com 10 μl de urina, existem 3.35×10^{12} moléculas de albumina, para a concentração referida.

2.2.2 Dimensão de uma molécula de ácido úrico

No caso do ácido úrico, considere-se de igual modo o pior cenário para a sua concentração, ou seja, como foi referido em 2.1.5, o valor mais baixo que um doente pode ter de ácido úrico na urina, que é de 80 mg/l. Da Tabela 2.1 conclui-se que 3 mmol de ácido úrico pesam 505 mg e contêm 1.8069×10^{21} moléculas. À concentração de 80 mg/l existem 2.86×10^{20} moléculas de ácido úrico. Pelo que, em 1 pl de uma amostra de urina com ácido úrico à concentração de 80 mg/l (80 fg/pl) tem-se 2.86×10^8 moléculas de ácido úrico. Tal como no caso anterior, também neste se conclui que a análise de ácido úrico pode ser implementada com sucesso no microssistema. No Microlab, com 10 μl de urina, existem 2.86×10^{15} moléculas de ácido úrico, para a concentração referida.

2.3 Detecção por espectrofotometria

A espectrofotometria (o estudo da interacção da radiação electromagnética com as biomoléculas) é, de entre as várias técnicas analíticas disponíveis em laboratórios de análises clínicas, a mais utilizada. A espectrofotometria pode ser utilizada para identificar uma biomolécula específica, determinar a sua estrutura, determinar a sua concentração e/ou quantidade (ex.: proteínas, aminoácidos) e determinar a actividade de uma enzima específica.

2.3.1 Espectro electromagnético

A gama do espectro electromagnético estende-se desde os raios cósmicos até às ondas de radiofrequência, com comprimentos de onda de 10^{-15} m a 10^3 m,

respectivamente (Figura 2.1). As moléculas biológicas interagem com diferentes partes desse espectro.

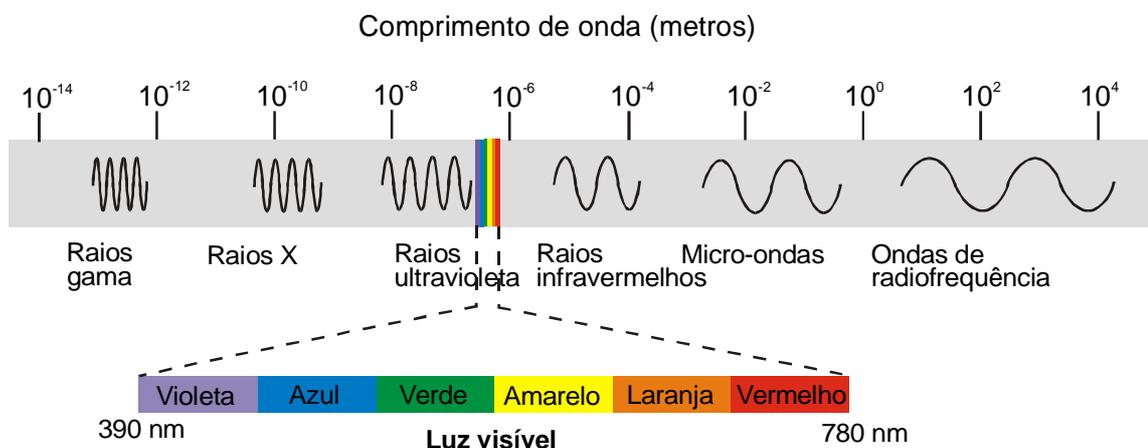


Figura 2.1: Espectro eletromagnético [6].

A região visível do espectro eletromagnético foi, e ainda é, a mais utilizada para medidas bioquímicas quantitativas em sistemas biológicos, provavelmente por conter radiação que pode ser vista pelo olho humano. Contudo, também outras regiões do espectro eletromagnético são utilizadas para analisar moléculas de interesse biológico. Os raios X, por exemplo, são usados para determinar a localização precisa de átomos dentro de uma estrutura (cristalografia de raios X). A espectroscopia de infravermelhos é usada para identificar estruturas orgânicas a partir das suas características de vibração e rotação molecular. A radiação micro-ondas é usada em técnicas que investigam o movimento nuclear e eletrônico (por exemplo, ressonância magnética) [7].

A radiação eletromagnética comporta-se como ondas eletromagnéticas e como partículas (fótons). A distância entre dois picos adjacentes da onda é definida como comprimento de onda (λ) da luz. A unidade do comprimento de onda é o metro (m). A frequência de uma onda eletromagnética (f) é o número de oscilações que ocorrem num segundo. A sua unidade é s⁻¹ ou Hz. O comprimento de onda e a frequência estão reciprocamente relacionados,

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (2.2)$$

onde, c é a velocidade da luz em m s^{-1} . A energia de um fóton é inversamente proporcional ao comprimento de onda da luz,

$$E = h \frac{c}{f} \quad (2.3)$$

onde, E é a energia de um fóton em Joules e h é a constante de *Planck* (6.626×10^{-34} J s).

A cor das soluções e da luz reflectida é determinada pelos comprimentos de onda da luz que não são absorvidos pela solução ou pelas biomoléculas que reflectem a luz. Por exemplo, muitas plantas são verdes porque a clorofila absorve luz fora da região verde.

2.3.2 Análise quantitativa na gama da luz visível

Um grande número de biomoléculas com interesse para análise não têm cromóforos¹ que absorvam luz na gama visível. Assim, a espectrofotometria não pode ser directamente utilizada para determinar a concentração dessas biomoléculas numa dada amostra. Contudo, existem uma série de reacções químicas específicas que transformam essas biomoléculas em produtos coloridos – as “reacções colorimétricas” – cuja absorvência se encontra dentro da gama de luz visível. Essas reacções devem ser específicas, rápidas, reproduzíveis e terem um valor de absorvência estável (durante um determinado período de tempo). Este é o princípio da detecção colorimétrica. A Figura 2.2 traduz a alteração espectrofotométrica ocorrida devido à reacção química que transformou a biomolécula *A* num composto *C* (normalmente denominada de “mistura”) com cromóforos na gama da luz visível. Na análise colorimétrica ideal, o valor da absorvência da mistura é proporcional à concentração da biomolécula. Por mistura entenda-se o produto colorido obtido após misturar um determinado reagente na amostra que contém a biomolécula a analisar. O termo “colorimetria” derivou do facto de, antigamente, as medições no domínio espectral serem feitas sem nenhum instrumento óptico. Era realizada uma comparação visual da cor da amostra com uma solução de referência de concentração conhecida.

¹ Grupo de átomos num composto orgânico capaz de originar a absorção de radiação, qualquer que seja a natureza do resto do composto.

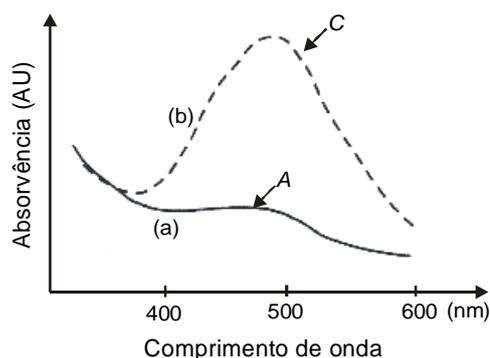


Figura 2.2: Alteração no espectro de absorção: (a) espectro da biomolécula a quantificar; (b) espectro da mistura da biomolécula A com cromóforo para ser quantificado por colorimetria.

Pode ocorrer uma situação em que a mistura tenha duas biomoléculas A e B que absorvam na mesma gama espectral. Neste caso, uma medição directa da absorvência não revela o valor quantitativo da biomolécula A mas sim das duas (Figura 2.3, curva (a)). É necessário transformar a biomolécula A através de uma reacção química num composto C com uma banda de absorção retirada da banda de absorção da biomolécula B (Figura 2.3, curva (b)).

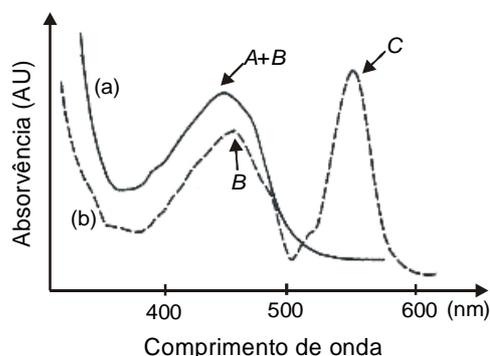


Figura 2.3: Alteração no espectro de absorção: (a) espectro da biomolécula a quantificar; (b) alteração do espectro para desviar o máximo da absorvência da biomolécula A para C.

Na detecção colorimétrica existem uma série de requisitos que têm que ser cumpridos para uma correcta leitura das absorvências das biomoléculas. Esses requisitos são normalmente inerentes às biomoléculas e reagentes utilizados e são descritos nos protocolos dessas biomoléculas. No anexo I citam-se alguns desses requisitos.

2.3.3 Absorção na gama da luz visível

A absorção é o efeito da atenuação do sinal óptico devido à interação com os átomos e moléculas da amostra, para certas frequências. Na região visível a absorção da luz ocorre quando os fótons absorvidos excitam um electrão de um estado de energia para um estado de energia superior. A Figura 2.4 ilustra alguns desses níveis de energia [8].

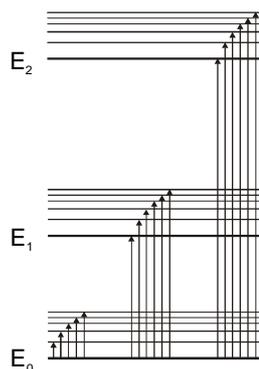


Figura 2.4: Diagrama de níveis de energia com algumas das alterações de energia que ocorrem durante a absorção, para uma espécie molecular.

A energia de um fóton determina qual a transição que pode ocorrer. Dentro de um nível de energia, podem existir vários subníveis (linhas horizontais na Figura 2.4). A diferença de energia entre os níveis de energia de uma determinada molécula é dependente da sua estrutura, pelo que a absorção da luz por uma molécula será função tanto da sua estrutura como do comprimento de onda da luz. Alterações químicas que alterem a estrutura de uma molécula alterarão o seu espectro de absorção.

Na espectrofotometria por absorção, dois termos são geralmente utilizados como medidas quantitativas da atenuação do sinal óptico: a “transmitância” e a “absorvência” (Figura 2.5). A transmitância (T) é a fracção da intensidade da luz incidente numa amostra que é transmitida através dessa mesma amostra,

$$T = \frac{I_{\text{final}}}{I_{\text{inicial}}} \quad (2.4)$$

onde, I_{final} e I_{inicial} são a intensidade inicial e final da luz, respectivamente. A intensidade da radiação I_{inicial} diminui à medida que atravessa a amostra de espessura d e coeficiente de absorção, α . A intensidade da luz transmitida através dessa amostra é dada por [9],

$$I_{\text{final}} = I_{\text{inicial}} \exp(-\alpha d) \quad (2.5)$$

Note-se que a alteração do valor da transmitância não é uma função da intensidade inicial da luz, pelo que medidas em absorção podem ser feitas com uma variedade de intensidades de luz. A absorvência (A) pode ser representada por,

$$A = -\log T \quad (2.6)$$

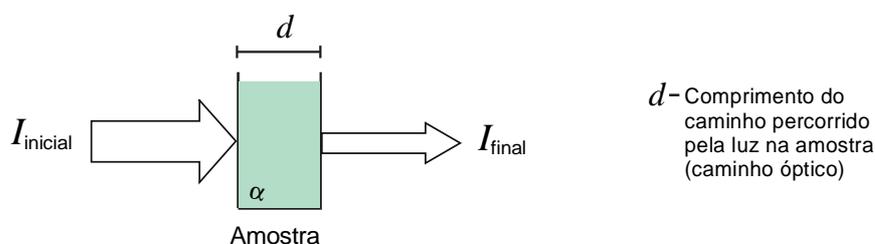


Figura 2.5: Atenuação da intensidade da luz devido a uma solução absorvente.

A absorvência da luz para um determinado comprimento de onda é directamente proporcional ao número de moléculas capazes de absorver nesse comprimento de onda e que se encontram no caminho percorrido pela luz. Como o número dessas moléculas é uma função directa da concentração da biomolécula e do comprimento do caminho óptico, a absorvência da luz por uma determinada solução é directamente proporcional a essas variáveis. A lei de *Lamber-Beer* define que,

$$A = \alpha_{\text{mol}} dC \quad (2.7)$$

onde A é a absorvência, um parâmetro óptico sem unidades, medida com um espectrofotómetro; d é o comprimento do caminho óptico em metros; C é a concentração molar em moles/l; e α_{mol} é o coeficiente de absorção molar (ou absortividade molar) em $l/(\text{mol} \times \text{m})$ para um determinado comprimento de onda. A absortividade molar é uma função da estrutura da molécula e do comprimento de onda da luz que atravessa a solução. Geralmente, o seu valor é conhecido para o comprimento de onda na qual a absorção é máxima [7].

2.3.4 Cálculo da Concentração

Se, para uma determinada biomolécula, a absortividade molar para um comprimento de onda específico é conhecida, então, o cálculo da concentração dessa biomolécula pode ser determinado através do valor da absorvência nesse comprimento de onda pela lei de *Lamber-Beer*:

$$C = \frac{A}{\alpha_{\text{mol}} d} \quad (2.8)$$

Nos casos que a absorvidade molar é desconhecida, ela pode ser determinada através da região linear da curva de calibração (absorvência = f(concentração)) obtida para o mesmo comprimento de onda. O declive dessa região linear é a absorvidade molar.

O cálculo da concentração para biomoléculas que absorvem radiação na gama da luz visível usando a lei *Lamber-Beer* é a base do método colorimétrico.

2.4 Conclusão

Este capítulo estudou a urina, sua formação e os seus principais compostos. Foram referidas as implicações clínicas dos valores anormais das duas biomoléculas que serão as primeiras candidatas para as análises no Microlab: proteína total e ácido úrico. Seguidamente, calculou-se o número de moléculas dessas duas biomoléculas existentes num volume de 10 µl de urina, para a menor concentração existente num ser humano. Esse volume será aproximadamente o utilizado no Microlab. Conclui-se que em 10 µl de urina existem 3.35×10^{12} moléculas de albumina (concentração de 50 mg/l) e 2.86×10^{15} moléculas de ácido úrico (concentração de 80 mg/l). Ficou assim provado que a análise dessas duas biomoléculas pode ser realizada no Microlab. Por fim, dedicou-se uma secção aos conceitos gerais, aos requisitos e ao método colorimétrico para a análise quantitativa da concentração das biomoléculas da urina. Esse método baseia-se no aumento da absorvência máxima, para um determinado comprimento de onda, que ocorre após a ligação de um reagente com a biomolécula a analisar. Esse aumento é directamente proporcional à concentração da biomolécula, e traduz-se no aumento da intensidade da cor produzida pela mistura. O cálculo da concentração da biomolécula em análise é efectuado com base na lei de *Lamber-Beer*.

Bibliografia

- [1] STRASINGER, S. K; Di LORENZO, M. S. - *Urinalysis and body fluids*. 4th ed. F. A. Davis Company, Philadelphia, 2001.
- [2] BRUNZEL, N. A. - *Fundamental of urine and body fluids analysis*. W. B. Saunders Company, USA, 1994.

- [3] Todd, J. C.; Sanford, A. H.; Davidsohn I. - *Clinical diagnosis and management*. 17th ed. W. B. Saunders Company, USA, 1984.
- [4] Biochemistry and Organic Reagents: for bioscience investigation. Sigma-Aldrich Diagnostics[®], 2002.
- [5] MANZ, A.; GRABER, N.; WIDMER, H. M. - *Miniaturized total chemical systems: a novel concept for chemical sensing*. Sensors and Actuators, Vol. B1 (1990) p. 244-248.
- [6] HECHT, E. - *Óptica*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1991.
- [7] STEWART, K. K.; EBEL, R. E. - *Chemical measurement in biological systems*. John Wiley & Sons, USA, 2000.
- [8] SKOOG, D. A.; EST, D. M.; - *Fundamentals of analytical chemistry*. 5th ed. Saunders College Publishing, Philadelphia, 1987.
- [9] ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. - *Chemical analysis, modern instrumental methods and techniques*. John Wiley & Sons, USA.

3

Sistema de microfluidos

Este capítulo descreve a estrutura dos canais nos quais circularão os fluidos biológicos. Para a definir é necessário ter em conta o formato e a geometria dos canais, o tipo de movimento do fluxo (laminar ou turbulento), o tempo e o processo de reacção dos fluidos, as propriedades dos fluidos que circulam nesses canais e o possível aparecimento de bolhas de ar nesses canais devido às suas pequenas dimensões. Recorreu-se a simulações computacionais, de forma a obter-se um modelo dinâmico tridimensional de fluidos que fosse adequado para realizar o processo de mistura do fluido biológico com um determinado reagente. Neste capítulo far-se-á uma breve introdução à teoria da mecânica de fluidos. Uma explicação detalhada pode consultar-se em [1]. Capítulos sobre microfluidos podem ser consultados em [2, 3] e em artigos de revisão [4].

3.1 Análise das características dos sistemas de microfluidos

O factor tempo é um requisito essencial num sistema de mistura de microfluidos. Devido à falta de mecanismos de mistura convencionais miniaturizados, a mistura de fluidos num microcanal acarreta algumas dificuldades.

3.1.1 Propriedades dos fluidos num microssistema e num sistema macroscópico

Os sistemas de microfluidos têm propriedades distintas que resultam das suas pequenas dimensões. Em primeiro lugar, o fluxo é, normalmente, laminar e não

turbulento. Em segundo lugar, nos microcanais a difusão é praticamente o único processo para misturar os fluidos. Para uma mistura eficaz de dois ou mais fluidos é necessário manipulá-los ou orientá-los de tal modo que a área de contacto entre eles aumente. É de igual modo necessário que a distância na qual a difusão deve actuar seja a menor possível para que o processo de mistura fique completo num tempo aceitável. Nos dispositivos macroscópicos a mistura é, normalmente, realizada usando turbulência através de estruturas de fluxo tridimensional ou actuadores mecânicos. Contudo, quando se pretende que o fabrico do sistema de microfluidos seja realizado utilizando técnicas de fotolitografia, actuadores mecânicos ou estruturas tridimensionais complexas devem ser evitadas.

3.1.2 Misturadores

Os mecanismos para realizar a mistura de fluidos, denominados de misturadores, desenvolvidos para microssistemas podem ser classificados em duas categorias: activos ou passivos. Os primeiros conduzem o processo de mistura pela aplicação de uma força exterior em conjunto com a força que está a transportar o fluido (por exemplo, uma parede a mover-se, um campo eléctrico ou um campo magnético). Os segundos não utilizam essa força adicional: a mistura é causada por difusão devido ao longo tempo de circulação do fluxo nos canais. Estes devem ter um comprimento suficiente para assegurar a mistura uniforme no tempo desejado. Contudo, esta abordagem pode levar a canais extremamente compridos à medida que a velocidade de circulação do fluxo aumenta, e quando as moléculas a misturar são grandes e com baixos coeficientes de difusão ($< 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$) [5].

3.1.3 Cinética química

A reacção entre o reagente e a amostra a ser analisada envolve tipicamente a ligação, em solução aquosa, das partículas do reagente com as moléculas da substância em análise. Denominando o reagente por A , a substância a analisar por C e o complexo das partículas do reagente com as moléculas da substância em análise por AC , a reacção química define-se do seguinte modo,



onde K_a e K_d são as constantes de associação e dissociação em $l/(mol\ s)$. As taxas da reacção são definidas por,

$$V_a = K_a[A][C] \quad , \quad V_d = K_d[AC] \quad (3.2)$$

onde V_a é a taxa da reacção para a associação de A e C e V_d é a taxa da reacção para a dissociação de AC . As letras entre parênteses rectos simbolizam a concentração das moléculas em mol/l. Este processo pode ser esboçado na Figura 3.1 [6].

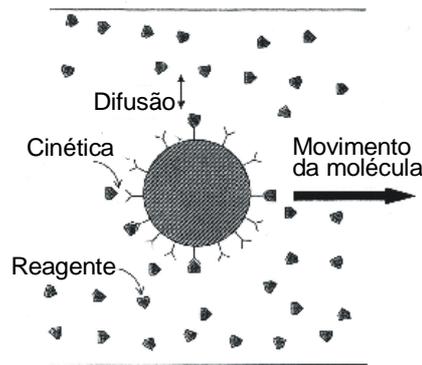


Figura 3.1: Um esboço das actividades em torno da molécula em análise. A molécula move-se com uma certa velocidade na amostra enquanto que o reagente efectua a ligação (governado pela cinética).

3.1.4 Caracterização do fluxo

O manuseamento de fluidos em quantidades de microlitros resulta num número de *Reynolds* pequeno indicando tipicamente um fluxo laminar. O número de *Reynolds* é definido como,

$$Re = \frac{\rho v L}{\nu} \quad (3.3)$$

onde ρ é a densidade em Kg/m^3 , v a velocidade em m/s, ν a viscosidade em $N\ s/m^2$ e L a distância característica interior do sistema em metros. Tipicamente, num canal o L representa a profundidade do canal. O número de *Reynolds*, parâmetro adimensional, é usado para caracterizar o movimento do fluxo, de forma a determinar se o fluido está na zona de fluxo laminar, turbulento ou na zona de transição. Um número de *Reynolds* inferior a 1500 indica que o fluxo é laminar. Num sistema de microfluidos a variável L será em geral inferior ou igual a 500 μm . Assumindo a maior velocidade de fluxo como sendo da ordem do tamanho de um *die* por segundo (*die* = 10 mm, então $v = 10\ mm/s$) e

considerando o fluido água ($\rho = 10^3 \text{ kg/m}^3$ e $\nu = 10^{-3} \text{ N s/m}^2$), pode dizer-se que um limite superior do número de *Reynolds* será de $Re = 5$. Como a turbulência ocorre quando $Re > 1500$ obter-se-ão fluxos laminares nos microcanais. Assim, considerar a turbulência como um mecanismo para a mistura dos fluidos não será aplicável. Isto exclui o uso de geometrias complexas e limita a utilidade de actuadores mecânicos.

3.1.5 Difusão

O tamanho e a forma dos microssistemas para fluidos limitam a utilidade da difusão como o único mecanismo para a mistura dos fluidos. Num dispositivo planar, o comprimento no qual a difusão deve actuar será dentro da dimensão do canal de circulação do fluido. A razão para a difusão é o elevado gradiente da concentração das moléculas do fluido, que existe quando dois líquidos diferentes têm uma interface comum. A difusão é portanto a chave para a mistura de fluidos e é modelizada pela lei de *Fick*, a qual determina o fluxo de difusão de uma determinada molécula em função da variação da concentração com a distância x ,

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (3.4)$$

onde J é o fluxo da molécula em partículas/($\text{m}^2 \text{ s}$), D é o coeficiente de difusão em m^2/s e C é a concentração das moléculas em partículas/ m^3 . O tempo médio para a difusão de uma partícula numa determinada distância pode ser dado por [7],

$$T_D = \frac{L^2}{D} \quad (3.5)$$

onde L é o comprimento relevante para a mistura. Esta equação prediz que utilizando apenas a difusão para o processo de mistura, pode, em alguns casos, resultar em tempos de mistura elevados. Como exemplo, para misturar o sal na água usando um $L = 1 \text{ mm}$ resulta num $T_D = 10^3 \text{ s}$ (D do sal na água = $103 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

3.2 Método dos elementos finitos

As técnicas de modelização são muito importantes para se obter a geometria apropriada dos canais. Os problemas de fluidos são frequentemente expressos através de equações diferenciais que na maior parte dos casos são extremamente difíceis de resolver analiticamente. Por vezes, não é possível descrever um sistema de fluidos

utilizando uma única equação diferencial, e um sistema de equações de derivadas parciais pode ser muito complexo dependendo da complexidade da geometria do sistema. Nestes casos é usual recorrer à divisão do sistema num número finito de pequenas regiões denominadas de elementos finitos.

3.2.1 Rede de elementos finitos

O método dos elementos finitos (FEM) prevê a divisão do sistema em elementos finitos, transformando o meio contínuo em discreto, como se mostra na Figura 3.2. A essa divisão dá-se o nome de “rede de elementos finitos”. A malha (*mesh*) dessa rede pode ser aumentada ou diminuída variando o tamanho dos elementos finitos. Os pontos de intersecção das linhas dessa rede são chamados de nós. Assim, em vez de existir uma função que satisfaça as condições de contorno para todo o elemento, no FEM as funções são definidas no domínio de cada elemento finito [8].

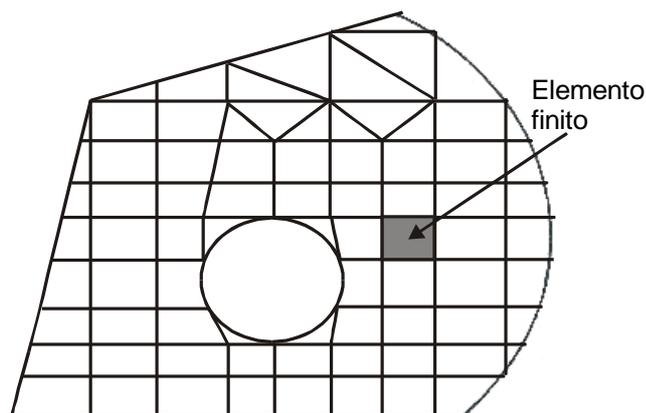


Figura 3.2: Rede de elementos finitos.

Uma das fases mais importantes na modelização por elementos finitos é a criação da malha, definindo a estrutura de toda a análise. A quantidade de elementos finitos deve ser suficiente para possibilitar a identificação da natureza dos fenómenos. Na maior parte dos casos é mesmo necessário refinar a malha em zonas onde há alteração do formato da geometria. Caso a malha seja demasiado grosseira, a rede original de elementos finitos pode não conseguir capturar os efeitos significantes que ocorrem ao longo dos vários passos das iterações.

3.2.2 Fundamentos do FEM

O integral sobre um domínio complexo (de volume V), pode ser substituído por um somatório de integrais estendidos a sub domínios de geometria simples (de volume V_i). Esta técnica é ilustrada com o seguinte exemplo, que corresponde ao integral de volume de uma função f ,

$$\int_V f \, dV = \sum_{i=1}^{i=n} \int_{V_i} f \, dV \quad (3.6)$$

onde

$$V = \sum_{i=1}^{i=n} V_i \quad (3.7)$$

O somatório do cálculo de todos os integrais dos sub domínios V_i (segundo membro da equação (3.6)) corresponde ao integral estendido a todo o domínio. Cada sub domínio V_i corresponde a um elemento finito de geometria simples (e.g., segmento de recta, triângulo, quadrilátero, tetraedro, paralelepípedo). O somatório indicado pela equação (3.6) dá origem à operação designada de “montagem” ou “junção”. Contudo, o método dos elementos finitos só tem utilidade prática se se dispuser de um computador com uma razoável capacidade de processamento. Este requisito é devido à elevada quantidade de cálculos que é necessário realizar, nomeadamente na resolução de grandes sistemas de equações lineares [9].

3.2.3 Uso de programas de elementos finitos

Com os programas comerciais de elementos finitos não é necessário o utilizador estabelecer os sistemas de equações para um determinado problema. É suficiente introduzir-se a geometria, as propriedades físicas dos materiais e escolher o método de resolução das equações do sistema. Contudo, é ainda necessário entender as bases do método de elementos finitos para interpretar os resultados correctamente.

Os principais passos básicos para o desenvolvimento correcto e para a análise de um problema de elementos finitos são: (1) a criação da malha; (2) definir o formato e tipo de elementos; (3) definir as propriedades do elemento; (4) a junção das propriedades de cada elemento (normalmente realizado automaticamente pelo programa); (5) a aplicação das condições de fronteira; (6) a resolução das equações do sistema; (7) efectuar a computação adicional necessária (baseado na solução obtida).

3.3 Modelo computacional da dinâmica do fluido

O principal objectivo do presente estudo é o de desenvolver um misturador em tecnologia planar para mistura e manipulação de fluidos. Para implementar um misturador, deve ser proposta uma estrutura que tenha a habilidade de misturar dois fluidos por difusão. Alguns formatos do canal de mistura podem encorajar a turbulência e assim acelerar o processo de mistura. Um exemplo é forçar o fluxo à volta de uma curva com um raio de curvatura pequeno, o que induz um fluxo secundário rotacional devido à aceleração centrípeta (Figura 3.3). Após a curva o fluxo torna-se novamente laminar para pequenos valores do Re .

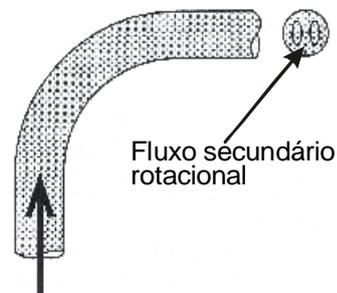


Figura 3.3: Esquema da mistura de fluidos por aceleração centrípeta.

3.3.1 Geometria do misturador

Um modelo computacional da dinâmica de fluidos foi estabelecido e utilizado para estudar e prever a distribuição e a difusão do fluxo. A aplicação desse modelo foi a quantificação do ácido úrico na urina. Nesta aplicação são utilizados dois fluidos: o reagente específico para a detecção do ácido úrico e a urina. Relembre-se que a medição da concentração de ácido úrico na urina é realizada após a ligação do reagente às moléculas de ácido úrico, pelo que é necessário a mistura destes dois fluidos.

A geometria básica dos canais para a mistura e circulação dos fluidos encontra-se na Figura 3.4. O formato dos canais rectangular, face aos redondos ou cónicos, é o mais apropriado para o processo de medição através de absorção óptica, devido à reflexão da luz. O reagente e a urina são introduzidos no canal em forma de **U** através das entradas 1 e 2, respectivamente. Eles são injectados por intermédio de uma seringa de forma a minimizar o aparecimento de bolhas de ar. Este fenómeno é desprezável quando o misturador é descartável, mas pode acontecer quando este necessita de ser reutilizado, pelo que o processo de sucção do líquido de limpeza dos canais deve ser bastante eficiente. O processo de difusão dos líquidos começa na junção

do **U** com o canal principal e continua ao longo de todo o canal até à câmara de detecção. Os canais têm 500 μm de largura e 500 μm de profundidade. O canal principal tem 70 mm de comprimento e 6 curvas em **U**. A câmara de detecção tem 2 mm de lado. A detecção colorimétrica é efectuada quando a mistura se encontra na câmara de detecção. Por baixo desta encontram-se os fotodetectores que medem a intensidade da luz transmitida através da mistura. A área da câmara de detecção é dependente da área dos fotodetectores e vice-versa.

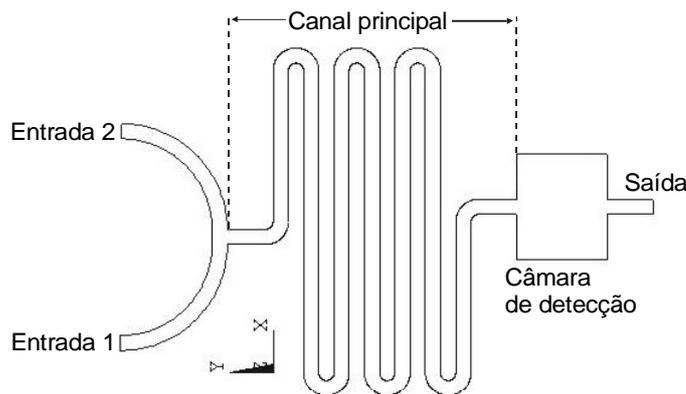


Figura 3.4: Geometria do misturador.

3.3.2 Simulação numérica

Para modelizar o misturador usando o FEM deve definir-se a malha, o tipo de elementos que constrói o modelo, as propriedades dos materiais, o regime do fluxo, as condições de fronteira, as cargas e o tipo de solução a resolver (parâmetros da análise).

A análise numérica deste trabalho foi realizada utilizando o *software Ansys*[®] *Flotran*[™] com a opção *Flotran* CFD (Dinâmica Computacional de Fluidos), a qual possibilita o projecto de dispositivos de microfluidos complexos através da modelização do fluxo dos fluidos [10]. Na Figura 3.5 apresenta-se a malha utilizada no projecto do misturador. O misturador foi modelizado por um elemento fluido tridimensional ('Fluid142'). Utilizou-se uma malha com elementos poliedros de 6 faces, sendo mais fina nas junções do **U** com o canal principal, nas curvas e nas paredes do canal, de forma a melhorar a precisão das simulações. Com base nestes pressupostos o número total de elementos foi de 33152, o que originou um bom compromisso entre os tempos de computação e o rigor da solução.

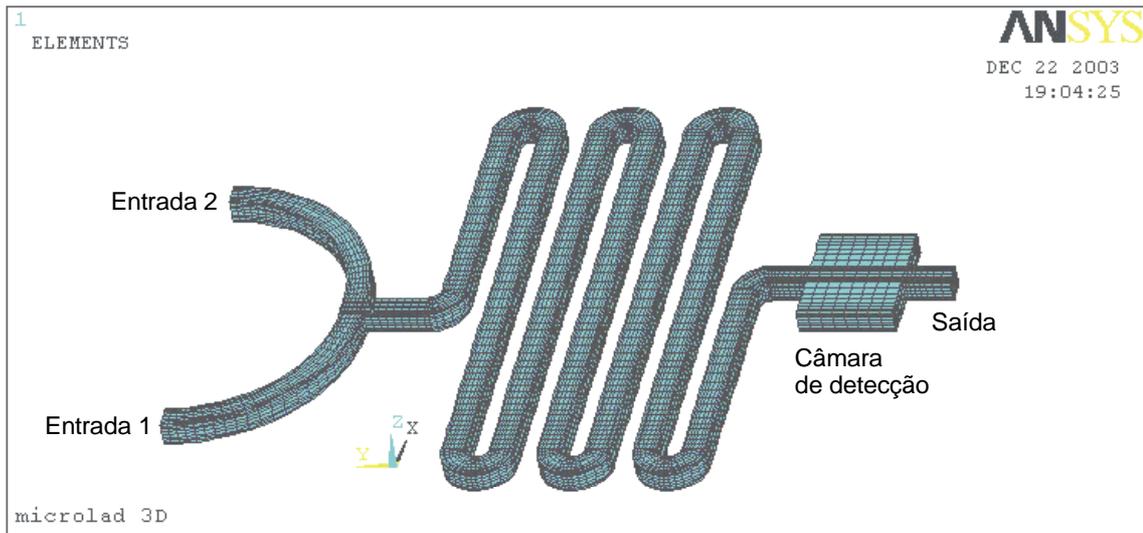


Figura 3.5: Sistema de microfluidos no qual se visualiza a rede de elementos finitos utilizada.

As equações de continuidade e de *Navier-Stokes*, para a velocidade e a pressão (incluídas no *software*), foram utilizadas para modelizar o misturador,

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = -\nabla \cdot (\rho v) \quad (3.8)$$

$$\rho \frac{dv}{dt} = -\nabla P + \nu \nabla^2 v \quad (3.9)$$

onde ν e ρ são a viscosidade e a densidade do fluido, respectivamente. P é a pressão e v é o vector velocidade. Derivações e detalhes das equações podem ser consultadas em [1, 11]. O vector velocidade foi subsequentemente utilizado para resolver as equações de transporte de espécies (por espécie entenda-se o reagente e a urina). Ambas as espécies têm um peso molecular baixo e um coeficiente de difusão elevado. As equações (3.8) e (3.9) foram resolvidas usando um modelo CFD baseado em elementos finitos. O modelo de regime do fluxo foi definido como laminar. As simulações foram implementadas no estado transitório. Uma condição de velocidade constante foi atribuída às condições de fronteira nas entradas. As condições de fronteira na saída do canal foram estabelecidas para uma pressão constante.

3.3.3 Propriedades dos fluidos

A avaliação do processo de mistura foi simulado utilizando o *kit* de diagnóstico da *Sigma-Aldrich Diagnostics*[®] (*InfinityTM uric acid reagent*) e padrões de urina com

várias concentrações de ácido úrico. O procedimento descrito no manual do reagente para determinar a concentração do ácido úrico na urina informa que a mistura do reagente com a urina é realizada apenas com uma ligeira inversão da cuvete que contém essa mistura. Isto é suficiente para misturar completamente os dois líquidos, devido ao elevado coeficiente de difusão e baixo peso molecular das moléculas envolvidas. Estas duas características revelam que estes dois fluidos têm boas condições para a mistura por difusão.

Da equação (3.5) determina-se que o tempo médio para a difusão do ácido úrico na urina é de $T_D = 30$ s, com $L = 70$ mm e $D = 163 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [12]. Este processo, embora lento é apesar de tudo adequado, tendo em atenção que o tempo de incubação para a reacção se completar é, aproximadamente, 5 minutos. Relembre-se que, normalmente, as reacções colorimétricas possuem um tempo de incubação de mais de um minuto. As propriedades dos dois fluidos que é necessário conhecer para correr as simulações são: o peso molecular, a densidade, a viscosidade, a condutividade térmica e o coeficiente de difusão. Estes parâmetros foram obtidos através das especificações técnicas que acompanham os dois líquidos ou através de medições realizadas no Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade do Minho (UM). Os seus valores encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Propriedades do reagente e do padrão de urina.

Propriedade (SI)	Reagente	Padrão de urina com 80 mg/l de ácido úrico
Peso molecular (kg/kmol)	160	168
Densidade (kg/m ³)	10 ³	1.89×10 ³
Viscosidade (N s/m ²)	0.9×10 ⁻³	1.1×10 ⁻³
Condutividade térmica (W/m k)	0.7	0.7
Coeficiente de difusão (μm ² /s)	-----	163

3.4 Resultados da simulação

O processo de mistura foi simulado para dois valores diferentes da concentração de ácido úrico na urina: 80 mg/l e 1200 mg/l. Estes valores são, respectivamente, inferiores e superiores ao valor mínimo e máximo anormais no ser humano.

3.4.1 Concentração de 80 mg/l de ácido úrico na urina

A Figura 3.6 ilustra o processo de mistura para a concentração de 80 mg/l e com uma velocidade de fluxo de 0.43 $\mu\text{l/s}$. Um volume de reagente de 20 μl é introduzido no misturador através da entrada 1 e um volume de 0.4 μl de urina através da entrada 2. Estas quantidades asseguram a existência de moléculas suficientes para uma análise precisa (uma molécula de ácido úrico ocupa 3.5×10^{-9} pl de solução, para a concentração de 80 mg/l, ver secção 2.2.2).

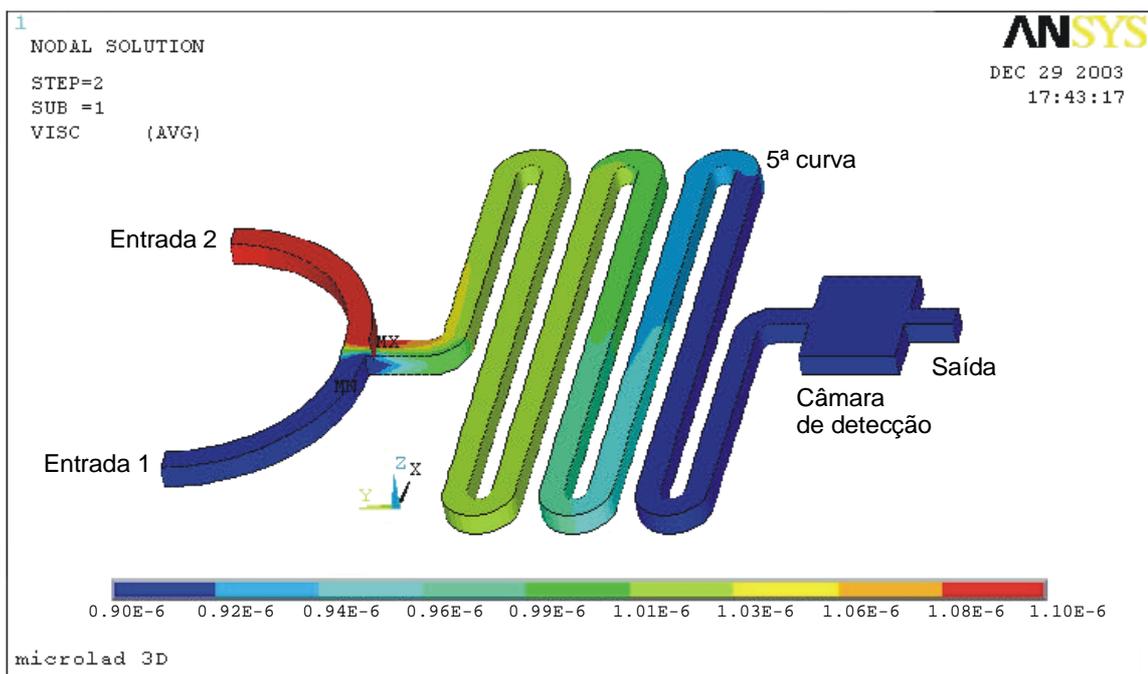


Figura 3.6: Simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com 80 mg/l de ácido úrico. O gráfico ilustra o perfil da viscosidade do modelo.

Os fluidos são injectados para o misturador através de uma seringa e fluem desde as entradas 1 e 2 até à saída, guiados pela pressão do líquido. Cruzam-se na intersecção em forma de **U** e aí começam o processo de mistura por difusão. Na Figura 3.6 pode ver-se zonas onde a mistura está incompleta. Contudo, antes de atingir a zona da câmara de detecção, mais precisamente após a quinta curva, o processo de mistura está completo e homogéneo.

Devido à baixa velocidade (0.43 $\mu\text{l/s}$) o fluxo é laminar. Contudo, um fluxo secundário e presumivelmente uma turbulência local foi gerada nas zonas curvas do misturador, conforme ilustrado pelo vector velocidade na Figura 3.7. A Figura 3.8 ilustra o perfil do fluxo do fluido no canal principal, na zona de entrada da câmara de

deteção (Figura 3.7). O traçado resultante mostra que se estabeleceu um fluxo laminar. A curva é relativamente simétrica e parabólica.

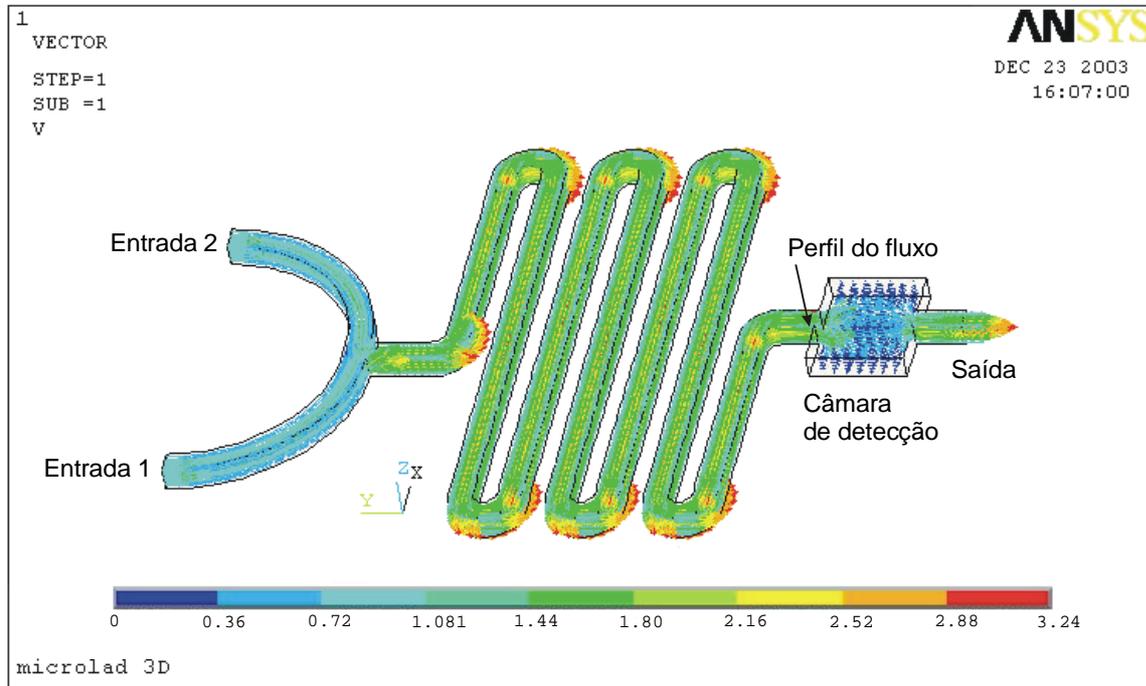


Figura 3.7: Simulação do perfil do vector da velocidade do fluxo.

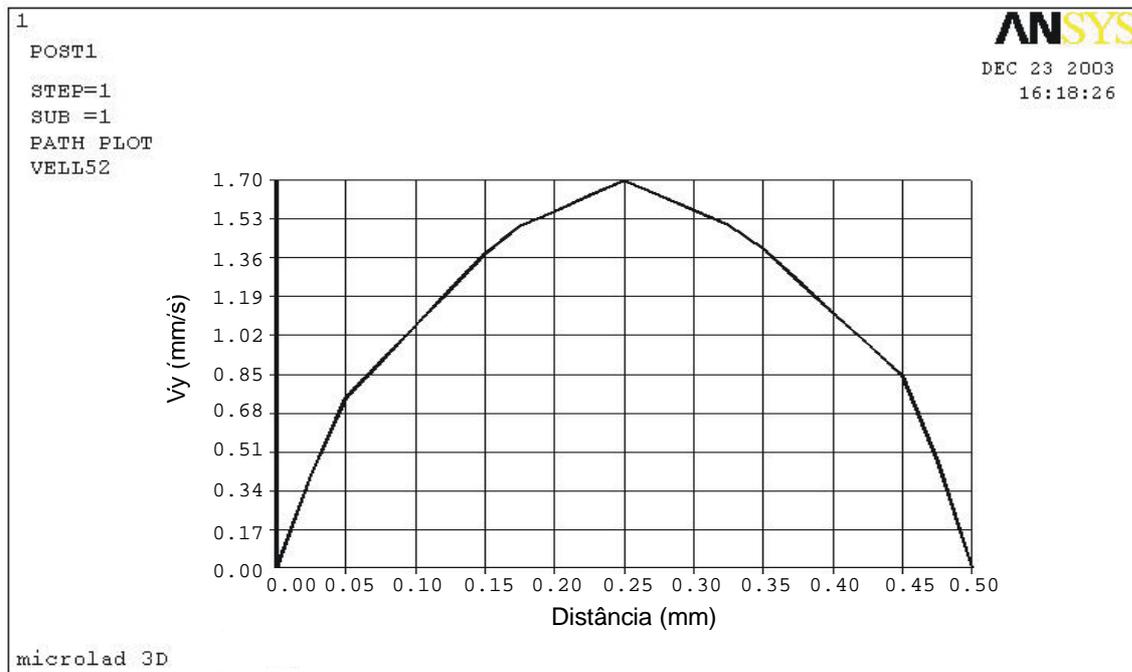


Figura 3.8: Perfil do vector da velocidade do fluxo na zona de entrada da câmara de detecção.

3.4.2 Concentração de 1200 mg/l de ácido úrico na urina

A simulação do processo de mistura para a concentração de 1200 mg/l apresenta-se na Figura 3.9. O resultado da simulação é muito similar ao observado na Figura 3.6, na qual foi simulado o processo de mistura para a concentração de 80 mg/l. Este resultado é o esperado uma vez que na medição das propriedades do padrão de urina com 1200 mg/l de ácido úrico observaram-se sensivelmente os mesmos valores (ver Tabela 3.1), à excepção do valor da densidade que passou de $1.89 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ para $1.90 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$. Um plano frontal da simulação do fluxo do processo de mistura para as duas concentrações de ácido úrico referidas é ilustrado pela Figura 3.10(a) e Figura 3.10(b). Em ambos os casos, a velocidade do fluxo é de $0.43 \text{ } \mu\text{l/s}$. No caso da concentração de ácido úrico de 1200 mg/l (Figura 3.10(b)), a mistura completa dos dois fluidos demora mais 90 milésimos de segundo relativamente ao processo de mistura com uma concentração de ácido úrico de 80 mg/l (Figura 3.10(a)). Conforme se observa na zona da 5ª curva na Figura 3.10, a diferença para uma concentração de ácido úrico elevada e para uma concentração de ácido úrico baixa é mínima. Na simulação de concentrações intermédias o ponto no qual é atingida a mistura completa encontrar-se-á entre os pontos das concentrações anteriormente simuladas e representadas na Figura 3.10.

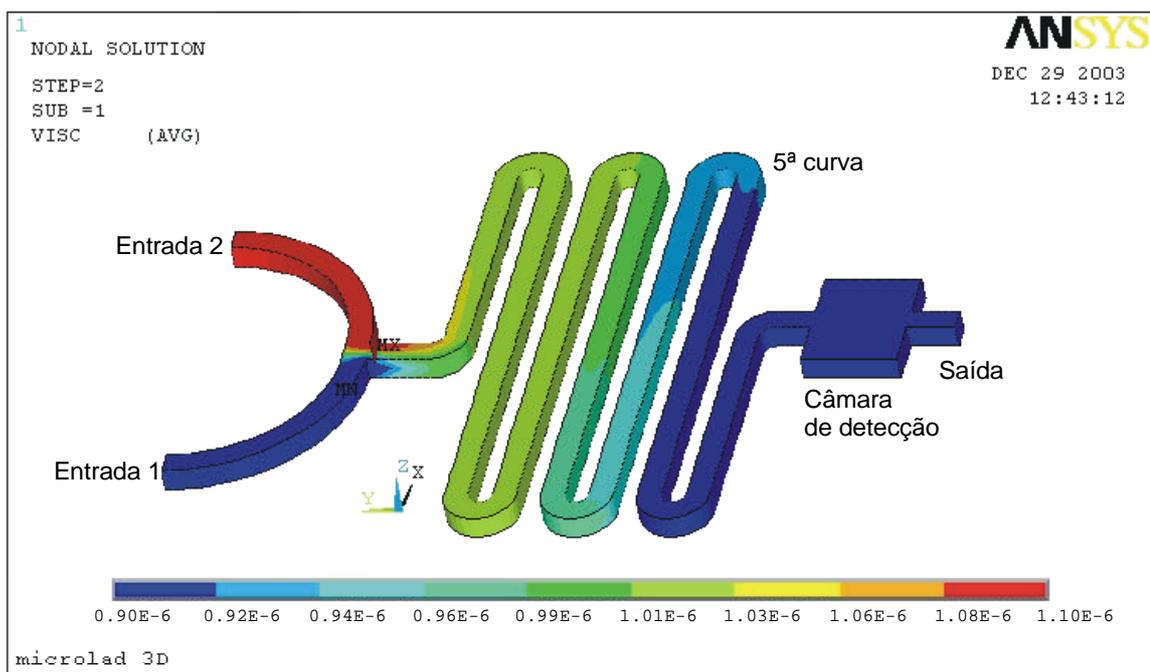


Figura 3.9: Simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com 1200 mg/l de ácido úrico. O gráfico ilustra o perfil da viscosidade do modelo.

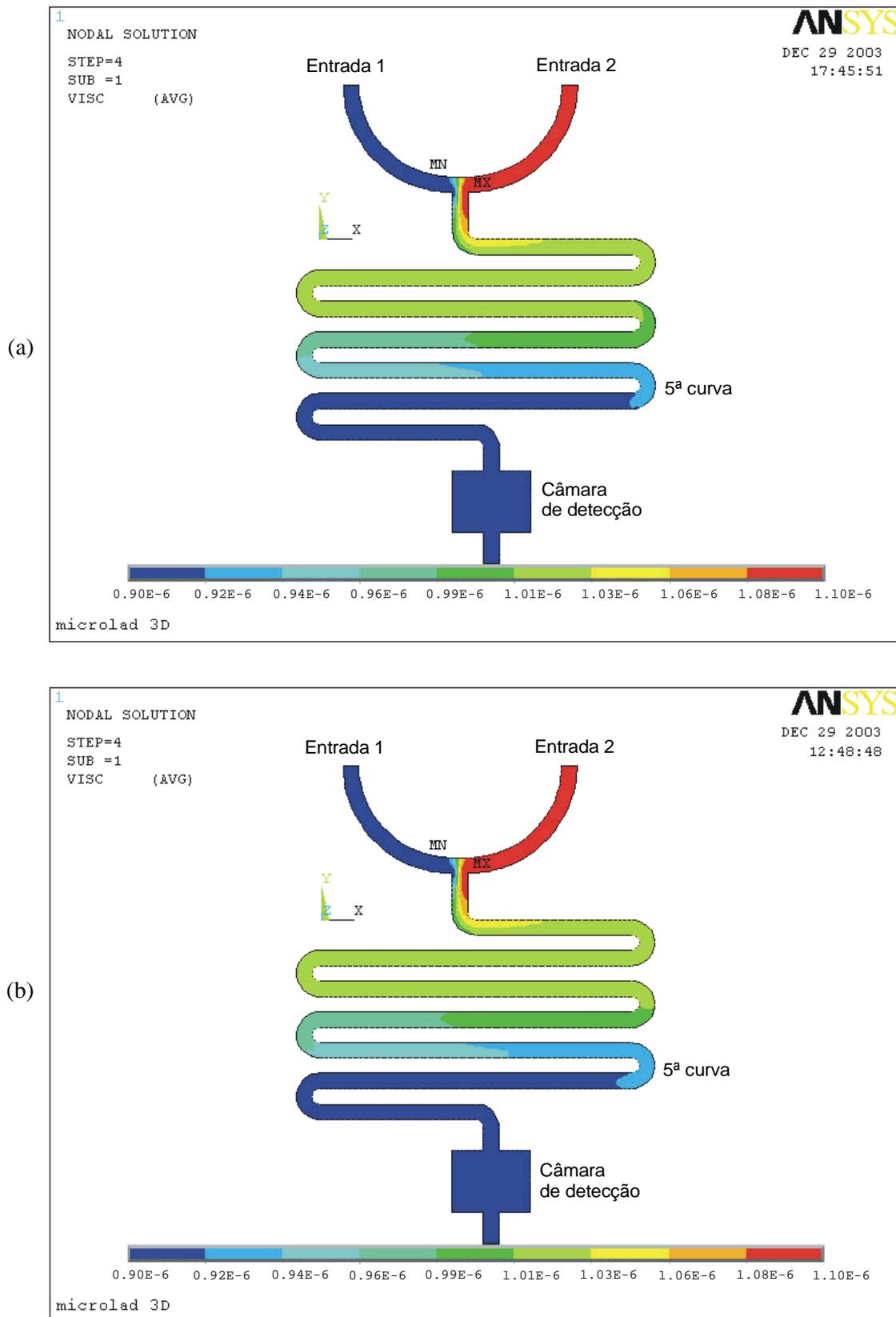


Figura 3.10: Vista frontal da simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com (a) 80 mg/l de ácido úrico; (b) 1200 mg/l de ácido úrico.

Com este modelo pode concluir-se que para uma velocidade de fluxo inferior a $0.43 \mu\text{l/s}$, uma mistura homogénea é obtida após ser percorrido cerca de 75% do percurso do canal principal. A estrutura do modelo com canais com uma profundidade de $500 \mu\text{m}$ fornece uma larga área de contacto entre os dois fluidos facilitando o processo de difusão ao longo do canal principal.

3.4.3 Aumento da velocidade de fluxo

Aumentando a velocidade de fluxo de $0.43 \mu\text{l/s}$ para $1.5 \mu\text{l/s}$ (injectado por intermédio de uma seringa), resulta num processo de mistura incompleto até ao fim do canal principal (ver Figura 3.11). Nesta simulação foi utilizado o padrão de urina com uma concentração de 80 mg/l de ácido úrico. O tempo de circulação dos fluidos é claramente insuficiente para uma mistura eficaz e completa por difusão. Esta velocidade de fluxo resulta num tempo de circulação de 11.7 s , menor que o tempo mínimo necessário de 30 s (ver secção 3.3.3).

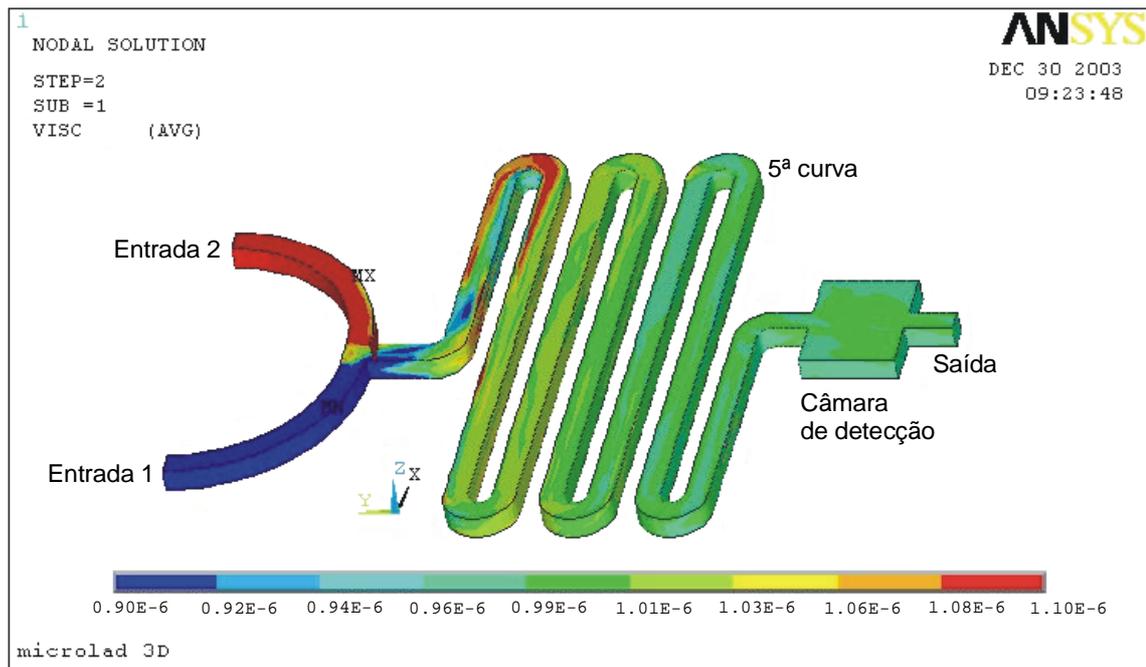


Figura 3.11: Processo de mistura incompleto devido ao aumento da velocidade do fluxo para $1.5 \mu\text{l/s}$. O padrão de urina tem 80 mg/l de ácido úrico.

3.4.4 Diminuição da largura dos canais

As simulações efectuadas revelam que a geometria do misturador é adequada para o processo de mistura pretendido. Contudo, pode dizer-se que uma largura e profundidade dos canais de 500 μm são valores elevados quando se pensa no fabrico através de técnicas de micromaquinagem. De facto, conforme se verificará nos capítulos seguintes, a profundidade de 500 μm é necessária devido ao processo de medição, colorimétrico através de absorção óptica, exigir um caminho óptico de 500 μm .

Com o objectivo de diminuir a largura dos canais, foi realizada uma simulação com canais de largura de 100 μm , mantendo a restante geometria do modelo e as condições do ensaio da Figura 3.6. Neste caso, o volume de reagente é de 5 μl para 0.1 μl de padrão de urina. A Figura 3.12 apresenta o resultado da simulação para uma concentração de 1200 mg/l de ácido úrico na urina. Observa-se que o ponto no qual a mistura dos dois fluidos está completa é alcançado com uma antecedência de cerca de 5 mm relativamente ao mesmo ponto para a estrutura da Figura 3.6. Esta situação deve-se à menor velocidade de fluxo obtida (0.09 $\mu\text{l/s}$). Conclui-se, assim, que a geometria proposta para o misturador é adequada.

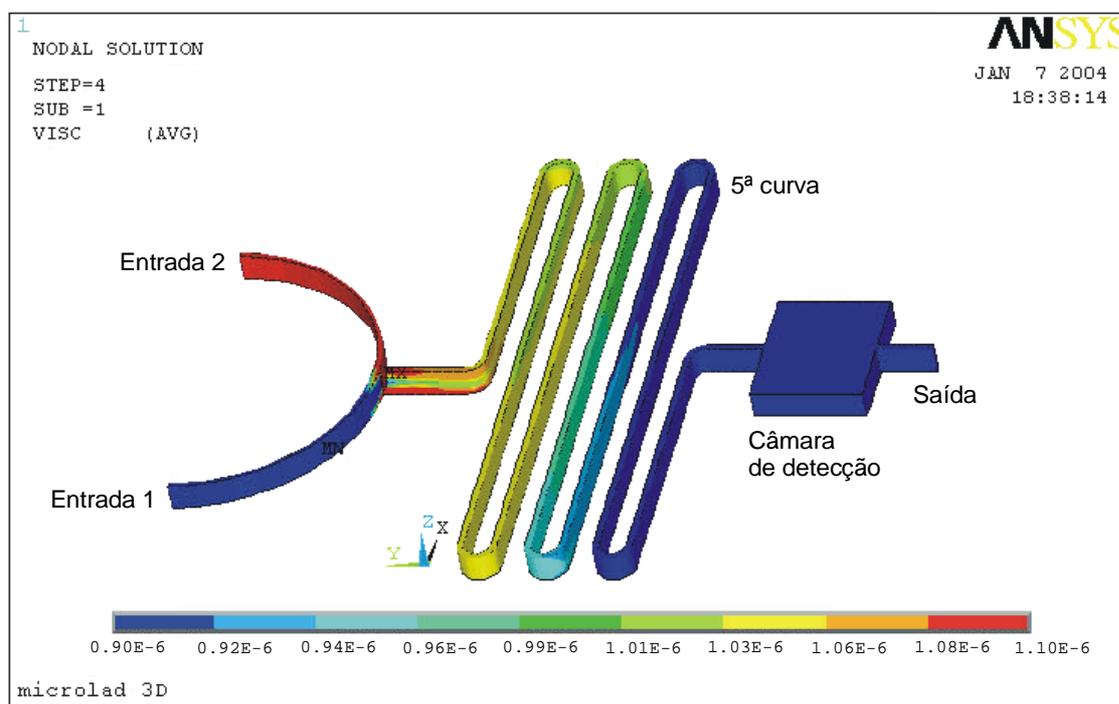


Figura 3.12: Simulação do fluxo do processo de mistura por difusão para um padrão de urina com 1200 mg/l de ácido úrico e com uma largura dos canais de 100 μm . O gráfico ilustra o perfil da viscosidade do modelo.

3.5 Conclusão

Com o objectivo de misturar as biomoléculas de ácido úrico presentes numa amostra de urina com o reagente que possibilita a detecção colorimétrica do ácido úrico, desenvolveu-se um modelo dinâmico tridimensional de fluidos para simular esse processo de mistura. As simulações demonstraram que se atingiu uma mistura completa e homogénea, realizada por difusão, com baixas velocidades de fluxo (inferior a 0.43 $\mu\text{l/s}$), fornecendo um tempo de circulação do fluxo nos canais de pelo menos 30 s. Esta abordagem e modelo geométrico permitem o fabrico do misturador utilizando apenas técnicas de fotolitografia, como as usadas no fabrico de dispositivos semicondutores.

Bibliografia

- [1] WHITE, F. M. - *Fluid mechanics*. 3^a ed. McGraw-Hill, New York, 1994.
- [2] KARNIADAKIS, G.; BESKOK, A. - *Microflows: fundamentals and simulation*. Springer, New York, USA, 2002.
- [3] KOCH, M.; EVANS, A.; BRUNNSCHWEILER, A. - *Microfluidic technology and applications*. Research studies press Ltd., England, 2000.
- [4] GRAVESEN, P. [et al.] - *Microfluidics: a review*. Journal of Micromechanics and Microengineering. Vol. 3 (1993), p. 168-182.
- [5] CHIEM, N. H.; HARRISON, D. J. - *Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination*. Clinical Chemistry, Vol. 44, n° 3 (1998), p. 591-598.
- [6] OSTERGAARD, S. - *Micro systems for bio/chemical analysis: automation by convection-free particle manipulation*. Mikroelektronik Centret, Technical University of Denmark, 1999. Tese de Doutoramento.
- [7] KOVACS, G. T. A. - *Micromachined transducers sourcebook*. McGraw-Hill, New York, USA, 1998, p. 807.
- [8] ASSAN, A. E. - *Método dos elementos finitos: primeiros passos*. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 1999.
- [9] AZEVEDO, A. F. M. - *Método dos elementos finitos*. FEUP, Portugal, 2003.
- [10] <http://www.ansys.com>

- [11] BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. - *Transport Phenomena*. John Wiley & Sons, New York, USA, 1960.
- [12] Biochemistry and Organic Reagents: for bioscience investigation. Sigma-Aldrich Diagnostics[®], 2002.

4

Filtros ópticos

Neste capítulo aborda-se como as estruturas de filmes finos podem ser analisadas, compreendidas e aplicadas no projecto de filtros ópticos baseados em filmes finos.

As cinco primeiras secções descrevem, de uma forma condensada, a teoria básica necessária para o cálculo do comportamento de filtros ópticos, projectados com uma estrutura de multicamadas de filmes finos. Uma análise rigorosa pode ser consultada em [1-7]. As restantes secções apresentam o projecto, a simulação e o desempenho de filtros ópticos passa-banda baseados em filmes finos. Com o objectivo do mesmo Microlab analisar várias biomoléculas na urina, pretende-se construir não apenas um filtro óptico, mas uma matriz de filtros ópticos. A estrutura de cada filtro deve ser projectada para maximizar a selectividade e a intensidade do coeficiente de transmissão de cada filtro óptico, minimizando o número de camadas de filmes finos, de deposições e de máscaras a utilizar no posterior fabrico.

4.1 Filtros ópticos baseados em filmes finos

O assunto dos filtros ópticos com filmes finos começou como uma curiosidade, quando se reparou que algumas lentes de vidro sujas transmitiam ligeiramente mais luz que as limpas. Actualmente, é um assunto com várias aplicações no campo da óptica.

Geralmente, define-se um filme fino como sendo uma camada com uma espessura até 1 μm . Um filme fino é realizado através da deposição de uma camada do material pretendido num substrato adequado, tal como o vidro ou o quartzo e pode ser

representado esquematicamente pela Figura 4.1. O índice de refração, n , é definido como a razão entre as velocidades da onda electromagnética no vazio e no meio em questão. Na maior parte dos casos, os filmes finos são completamente transparentes, pelo que nenhuma energia é absorvida. Nestes casos, a característica do filtro em reflexão é o complemento da característica em transmissão. Assim, da luz incidente no filme, parte é reflectida e a restante é transmitida para o substrato.

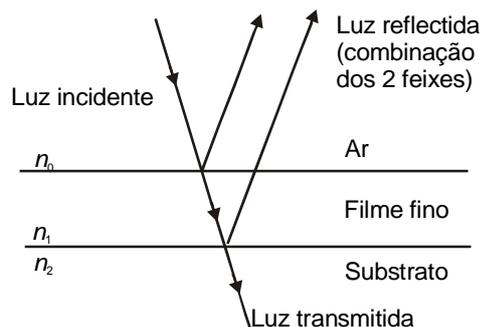


Figura 4.1: Esquema de um filme fino.

Para se compreender o desempenho de um dispositivo óptico de filmes finos de uma maneira qualitativa é necessário aceitarem-se várias afirmações. A primeira é que a amplitude da reflexão da luz em qualquer fronteira entre dois meios é dada por,

$$\frac{1 - \zeta}{1 + \zeta} \quad (4.1)$$

onde ζ é a razão dos índices de refração. A reflectância (razão da irradiação) é o quadrado desta quantidade. A segunda é que existe um desvio de fase de 180° quando a reflectância é produzida por um meio que tem um índice de refração baixo em relação ao meio adjacente. Em oposição, quando o meio tem um índice de refração elevado em relação ao meio adjacente, o desvio de fase é de 0° . A terceira é que, se a luz é dividida em duas componentes pela reflexão das superfícies no topo e no fundo de um filme fino, então os feixes serão combinados de tal forma que a amplitude resultante será a diferença ou a soma dessas duas componentes, se o desvio de fase relativo é de 180° ou de 0° , respectivamente. No primeiro caso diz-se que os feixes interferem destrutivamente e no segundo caso construtivamente.

Uma estrutura de multicamadas de filmes finos pode ser realizada com uma série de camadas depositadas num substrato (representada na Figura 4.2). Se as camadas tiverem um índice de refração elevado e baixo, alternadamente, as várias componentes da luz incidente produzidas pela reflexão das sucessivas superfícies são combinadas

construtivamente, uma vez que aparecem todas em fase na superfície da estrutura. Isto implica que a reflexão efectiva desta estrutura pode ser projectada para ser elevada aumentando apenas o número de camadas. Esta é a forma básica dos revestimentos de reflectância elevada. Quando tal revestimento é construído descobre-se que a reflectância se mantém elevada apenas dentro de uma gama limitada de comprimentos de onda. Fora desta zona a reflectância muda abruptamente para um valor baixo.

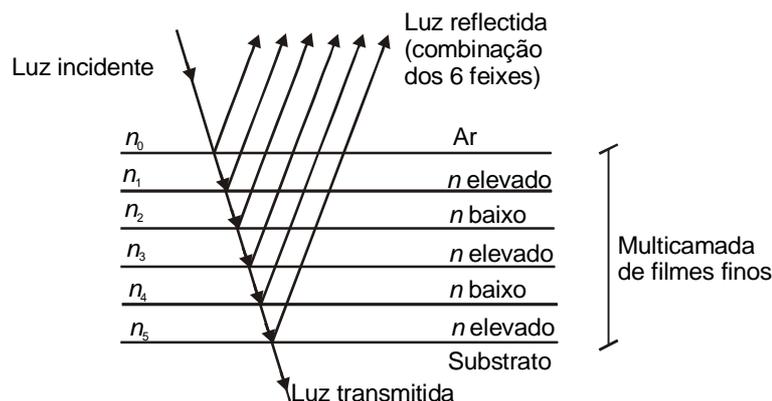


Figura 4.2: Estrutura de multicamadas de filmes finos.

O projecto de uma estrutura de multicamadas de filmes finos com um determinado desempenho requer não apenas o cálculo analítico mas também a experiência, o uso de blocos conhecidos, as simulações computacionais e os refinamentos das soluções simuladas.

Exemplos de dispositivos com filmes finos usados no dia a dia são as lentes das máquinas fotográficas. Algumas delas são revestidas com um determinado filme de forma a reduzir a nebulosidade provocada pela luz difundida internamente (provocada pela interface vidro/ar). Além disso, aumentam ainda o contraste da imagem [2].

4.2 Fundamentos da propagação da onda

Nesta secção, em vez de se fazer uma extensa descrição da teoria óptica de filmes finos, faz-se um resumo dos principais resultados, válidos para meios lineares. Este resumo baseia-se na bibliografia descrita em [1, 5, 8, 9].

4.2.1 Amplitude da onda

A luz é uma onda electromagnética, pelo que, deve começar-se com as equações de *Maxwell* de forma a estudar-se a sua propagação nos filmes finos. Uma onda de luz pode ser representada por expressões da forma,

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{i(\omega t - n\mathbf{K}\cdot\mathbf{r})} \quad (4.2)$$

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_0 e^{i(\omega t - n\mathbf{K}\cdot\mathbf{r})} \quad (4.3)$$

onde \mathbf{E} e \mathbf{H} são o campo eléctrico e magnético, respectivamente e \mathbf{E}_0 e \mathbf{H}_0 as suas amplitudes, ω é a frequência angular, n é o índice de refacção, \mathbf{K} é o vector de propagação cujo módulo define-se como número de propagação, K ($K = 2\pi/\lambda$) e \mathbf{r} é o vector posição. Se o meio de propagação for absorvente, o n deve ser substituído por $n-ik$, onde k é o coeficiente de extinção do meio de propagação. A frequência, f , e o comprimento da onda, λ , são dados por,

$$f = \frac{\omega}{2\pi} \quad (4.4)$$

$$\lambda = \frac{2\pi}{K} \quad (4.5)$$

e $f\lambda = \omega/K = c$, onde c é a velocidade da onda. Esta última está relacionada com as propriedades electromagnéticas do meio no qual a onda se propaga, através da relação [4],

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}} \quad (4.6)$$

onde ϵ é a permissividade eléctrica do meio e μ a permeabilidade magnética. Esta expressão pode também ser descrita na seguinte forma,

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_r \epsilon_0 \mu_r \mu_0}} \quad (4.7)$$

onde ϵ_r e μ_r são os factores da permissividade e permeabilidade do meio e ϵ_0 e μ_0 são a permissividade eléctrica e permeabilidade magnética do vazio, respectivamente. O deslocamento eléctrico, \mathbf{D} , e a densidade de fluxo magnético, \mathbf{B} , são definidos [7],

$$\mathbf{D} = \epsilon\mathbf{E} \quad (4.8)$$

$$\mathbf{B} = \mu\mathbf{H} \quad (4.9)$$

Pode então escrever-se,

$$c = \frac{c_0}{\sqrt{\epsilon_r \mu_r}} \quad (4.10)$$

onde c_0 é a velocidade da onda electromagnética no vazio, $c_0 = 2.998 \times 10^8$ m/s.

Nos materiais dieléctricos $\mu_r \approx 1$ e $\epsilon_r > 1$. A equação anterior pode ser escrita,

$$c \approx \frac{c_0}{\sqrt{\epsilon_r}} \quad (4.11)$$

e note-se que $c < c_0$. A razão c_0/c é, por definição, o índice de refração n de um meio, pelo que,

$$n \approx \sqrt{\epsilon_r} \quad (4.12)$$

ϵ_r é a medida da facilidade com que o meio pode ser polarizado electricamente pela acção de um campo eléctrico externo. Esta polarização depende da mobilidade dos electrões dentro da molécula perante a resistência das forças moleculares. Então ϵ_r dependerá da frequência do campo eléctrico aplicado uma vez que ele dependerá da rapidez de resposta dessas forças. Então a equação anterior será verdadeira apenas se n e ϵ_r se referirem à mesma frequência da onda (note-se que n é dependente da frequência).

Considere-se agora o conteúdo energético da onda. Para um campo eléctrico, a energia por unidade de volume é dada por [10],

$$u_E = \frac{1}{2} \epsilon E^2 \quad (4.13)$$

e para um campo magnético,

$$u_H = \frac{1}{2} \mu H^2 \quad (4.14)$$

Considere-se um meio isotrópico². Das equações de *Maxwell*, para uma determinada onda, a relação entre \mathbf{E} e \mathbf{H} é fixa [3],

² Um meio isotrópico é um meio com propriedades físicas uniformes, no qual o índice de refração não varia com a direcção de propagação no material.

$$\mathbf{H} = \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} n \mathbf{E} \quad (4.15)$$

Também \mathbf{E} , \mathbf{H} e o vector de propagação \mathbf{K} , são todos mutuamente perpendiculares. O sentido da propagação é dado pela regra da mão direita. O fluxo de energia na direcção da propagação da onda é dado pelo vector de *Poynting*,

$$\mathbf{P} = \mathbf{E} \times \mathbf{H} \quad (4.16)$$

Uma vez que se está a trabalhar com a razão de campos, omitiu-se a constante $\sqrt{\epsilon/\mu}$ da equação (4.15). Fazendo a média num período da onda e desprezando o factor 1/2 das equações (4.13 e 4.14), obtém-se,

$$\mathbf{H} = n \mathbf{E} \quad (4.17)$$

$$\mathbf{P} = |\mathbf{E}||\mathbf{H}| = n|\mathbf{E}|^2 \quad (4.18)$$

Estas são as equações fundamentais sobre as quais se irá trabalhar.

4.2.2 Polarização

Considere-se uma onda plana monocromática incidente na superfície plana de separação entre dois meios isotrópicos. Tanto o campo eléctrico como o campo magnético podem decompor-se em duas componentes ortogonais entre si: uma paralela ao plano de incidência (polarização *p*) e outra perpendicular (polarização *s*) [2]. Estas duas polarizações estão representadas na Figura 4.3 para o vector \mathbf{E} .

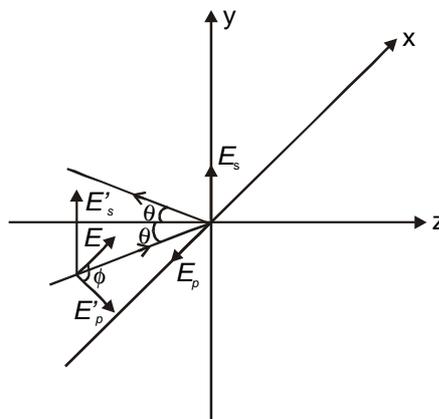


Figura 4.3: Definição das polarizações *p* e *s*. A luz incide no plano *xz* com um ângulo θ relativamente ao eixo dos *zz*. Os vários vectores \mathbf{E} estão representados.

Em geral, uma luz polarizada linearmente terá o seu vector \mathbf{E} com um certo ângulo ϕ relativamente ao plano de incidência (plano xz). Neste caso, pode-se decompor o vector \mathbf{E} em duas componentes:

$$\text{polarização } p \quad E'_p = E \cos \phi \quad (4.19)$$

$$\text{polarização } s \quad E'_s = E \sin \phi \quad (4.20)$$

Como se verá mais adiante nesta secção, é conveniente trabalhar em termos das componentes destes vectores paralelos ao plano de incidência. Assim, definem-se as novas quantidade E_p e E_s :

$$E_p = E'_p \cos \theta = E \cos \phi \cos \theta \quad (4.21)$$

$$E_s = E'_s = E \sin \phi \quad (4.22)$$

Similarmente, define-se H_p e H_s :

$$H_p = H'_p = H \cos \phi \quad (4.23)$$

$$H_s = H'_s \cos \theta = H \sin \phi \cos \theta \quad (4.24)$$

Para uma onda que se propaga para a esquerda, o sinal de H é o inverso. O índice de refração normal n é igual a H/E (da equação (4.17)). Da mesma forma, define-se o índice de refração generalizado para as duas polarizações, u_p e u_s , tal que:

$$u_p = \frac{H_p}{E_p} = \frac{H}{E \cos \theta} = \frac{n}{\cos \theta} \quad (4.25)$$

$$u_s = \frac{H_s}{E_p} = \frac{H \cos \theta}{E} = n \cos \theta \quad (4.26)$$

Das equações (4.17) e (4.18), o fluxo de energia total será,

$$P_p = u_p E_p^2 \quad (4.27)$$

$$P_s = u_s E_s^2 \quad (4.28)$$

Note-se que todos os estados de polarização podem ser decompostos nas componentes p e s , com uma possível deslocação de fase entre eles. Assim, a análise que se seguirá pode ser usada para todos os estados de polarização. Em geral as propriedades de uma estrutura multicamada de filmes finos são diferentes para as duas polarizações, excepto quando a luz incidente é normal à superfície. Neste caso as polarizações p e s são equivalentes [1].

4.2.3 Condições de fronteira

As condições de fronteira em cada interface possibilitam a ligação entre os campos electromagnéticos de um lado da interface e os do outro lado. Estas condições advêm da teoria electromagnética. Referem que as componentes de E e H paralelas à interface devem ser as mesmas em ambos os lados da interface. É por este motivo que se lida com E e H e não com D ou B , pois as condições de fronteira seriam bem mais complexas.

4.3 Propriedades das estruturas com filmes finos

4.3.1 Notação

Uma estrutura multicamada de filmes finos, esquematicamente ilustrada na Figura 4.4, é composta por q interfaces, isto é, $q-1$ filmes. No filme j^{th} observa-se a propagação de uma onda para a direita (E_j^+) e de uma onda para a esquerda (E_j^-). Estas estão inclinadas com um ângulo θ_j em relação à normal da interface. O filme tem um índice de refração n_j e uma espessura d_j . Classificou-se o substrato, ou meio de saída, (à direita) como sendo o filme 0. Os filmes finos foram classificados de 1 a $q-1$. A variável q refere-se ao meio incidente (à esquerda) que, normalmente, é o ar. O feixe incidente é E_q^+ , o reflectido é E_q^- e o transmitido é E_0^+ . Neste caso $E_0^- = 0$, uma vez que não existe feixe incidente na estrutura multicamada vindo do substrato. Pretende-se estudar as relações entre essas três quantidades referidas, E_q^+ , E_q^- e E_0^+ .

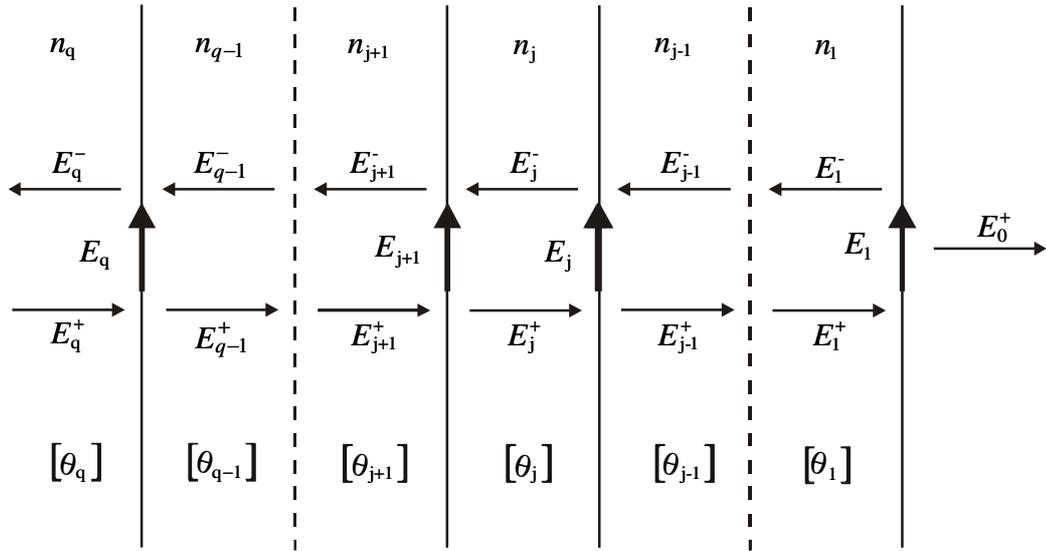


Figura 4.4: Definições dos parâmetros para uma estrutura multicamada de filmes finos. Por simplicidade, a direcção de propagação de cada onda está simplesmente indicada como para a esquerda ou como para a direita e nem os ângulos θ_j nem a espessura dos filmes estão representados.

4.3.2 Caminho óptico

O caminho óptico no filme j é dado pela distância x entre as frentes de onda, marcadas no diagrama esquemático da Figura 4.5, vezes o índice de refração. As frentes de onda são linhas de igual fase. Então, o caminho óptico pode ser definido,

$$LP = n_j x = n_j d_j \cos \theta_j \quad (4.29)$$

A espessura de fase do filme é,

$$g_j = K n_j d_j \cos \theta_j \quad (4.30)$$

Relembre-se que $K = 2\pi/\lambda$. Um filme de quarto de onda ($\lambda/4$), por exemplo, tem $g_j = \pi/2$ (no caso da luz ter incidência normal).

Os ângulos θ_j são determinados pela lei de Snell [2],

$$n_q \sin \theta_q = n_j \sin \theta_j = n_0 \sin \theta_0 \quad (4.31)$$

onde θ_q é o ângulo de incidência e θ_0 é o ângulo de reflexão da luz da estrutura multicamada.

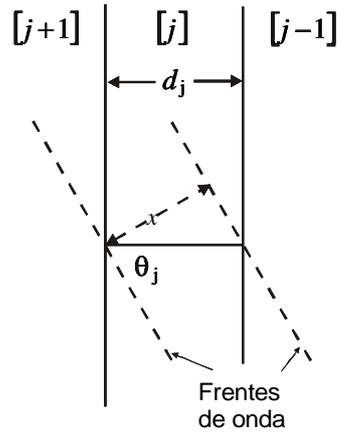


Figura 4.5: Distância entre as frentes de onda (x), usada no cálculo do caminho óptico.

4.3.3 Equações na interface entre dois filmes

Adopta-se a convenção de que a fase da onda do filme j^{th} é zero na interface com o filme $(j-1)^{\text{th}}$, isto é no lado direito do filme (Figura 4.4). Então, na interface $(j+1)/j$ tem-se,

$$\text{À esquerda: } E_{j+1}^+, E_{j+1}^-$$

$$\text{À direita: } E_j^+ e^{ig_j}, E_j^- e^{-ig_j}$$

onde os vectores de fase, e^{ig_j} e e^{-ig_j} , representam o desvio de fase sofrido pela onda ao longo do filme j [4].

Usando as condições de fronteira, pode escrever-se,

$$E_{j+1}^+ + E_{j+1}^- = E_j^+ e^{ig_j} + E_j^- e^{-ig_j} \quad (4.32)$$

na interface $(j+1)/j$, com uma equação similar para H .

Agora, é conveniente definir,

$$E_j = E_j^+ + E_j^- \quad (4.33)$$

$$H_j = H_j^+ + H_j^- \quad (4.34)$$

onde E_j e H_j são os campos totais na interface $j/(j-1)$. Usando $H_j^\pm = \pm u_j E_j^\pm$, obtém-se,

$$\begin{aligned} E_j^+ &= \frac{1}{2}(E_j + H_j / u_j) \\ E_j^- &= \frac{1}{2}(E_j - H_j / u_j) \end{aligned} \quad (4.35)$$

A equação (4.32) torna-se,

$$E_{j+1} = \cos g_j E_j + \frac{i}{u_j} \sin g_j H_j \quad (4.36)$$

e similarmente para H_{j+1} ,

$$H_{j+1} = i u_j \sin g_j E_j + \cos g_j H_j \quad (4.37)$$

Estas duas últimas equações podem ser escritas na forma matricial,

$$\begin{pmatrix} E_{j+1} \\ H_{j+1} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos g_j & \frac{i}{u_j} \sin g_j \\ i u_j \sin g_j & \cos g_j \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_j \\ H_j \end{pmatrix} \quad (4.38)$$

Estas equações mostram que em geral E_j e H_j são complexos.

A matriz 2×2 , denominada de M_j , contém todos os detalhes para o filme j^{th} e relaciona os valores de E e H de um lado do filme com os do outro lado. Note-se que pode, igualmente, escrever-se,

$$\begin{pmatrix} E_{j+2} \\ H_{j+2} \end{pmatrix} = M_{j+1} \begin{pmatrix} E_{j+1} \\ H_{j+1} \end{pmatrix} = M_{j+1} M_j \begin{pmatrix} E_j \\ H_j \end{pmatrix} \quad (4.39)$$

deste modo, pode relacionar-se os valores de E e H no substrato com os do meio incidente, onde $g_0 = 0$, e consequentemente M_0 é a matriz identidade:

$$\begin{pmatrix} E_q \\ H_q \end{pmatrix} = M_{q-1} M_{q-2} \dots M_2 M_1 \begin{pmatrix} E_0 \\ H_0 \end{pmatrix} \quad (4.40)$$

4.3.4 Coeficientes de reflexão e transmissão

A relação de E_q , H_q e E_0 , H_0 com as ondas incidente, reflectida e transmitida pode ser escrita na forma matricial (usando a equação (4.35)),

$$\begin{pmatrix} E_q^+ \\ E_q^- \end{pmatrix} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 1/u_q \\ 1 & -1/u_q \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_q \\ H_q \end{pmatrix} \quad (4.41)$$

e

$$\begin{pmatrix} E_0 \\ H_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ u_0 \end{pmatrix} E_0^+ \quad (4.42)$$

com $E_0^- = 0$. Combinando as equações (4.40), (4.41) e (4.42),

$$\begin{pmatrix} E_q^+ \\ E_q^- \end{pmatrix} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 1/u_q \\ 1 & -1/u_q \end{pmatrix} M_{q-1} \dots M_1 \begin{pmatrix} 1 \\ u_0 \end{pmatrix} E_0^+ \quad (4.43)$$

Desta equação pode obter-se as expressões para a amplitude dos coeficientes de reflexão e transmissão,

$$r = E_q^- / E_q^+ \quad (4.44)$$

$$t = E_0^+ / E_q^+ \quad (4.45)$$

e a intensidade dos coeficientes de reflexão e transmissão, denominada de reflectância e transmitância,

$$R = |r|^2 = |E_q^- / E_q^+|^2 \quad (4.46)$$

$$T = \frac{u_0}{u_q} |E_0^+ / E_q^+|^2 \quad (4.47)$$

É útil aqui definir-se a admitância óptica Y . É igual à razão entre H_q e E_q , e é portanto um índice de refração efectivo para toda a estrutura do filme fino. Assim, Y é, em geral, um número complexo [5],

$$Y = \frac{C}{B} \quad (4.48)$$

onde,

$$\begin{pmatrix} B \\ C \end{pmatrix} = M_{q-1} \dots M_1 \begin{pmatrix} 1 \\ u_0 \end{pmatrix} \quad (4.49)$$

Substituindo esta equação nas equações (4.43), (4.46) e (4.47):

$$R = \left| \frac{u_q - Y}{u_q + Y} \right|^2 \quad (4.50)$$

$$T = \frac{4 \operatorname{Re}(u_q) \operatorname{Re}(Y)}{|u_q + Y|^2} \quad (4.51)$$

Estas equações serão usadas para estudar as propriedades de uma determinada estrutura de filmes finos. Note-se que as equações (4.29) a (4.50) aplicam-se igualmente à polarização s e p com a expressão apropriada para u dada pelas equações (4.25) e (4.26). A única exceção é no caso em que existe absorção pelos filmes (índice de refração complexo). Nestes casos $T + R \neq 1$ e a expressão para T definida pela equação (4.51) não pode ser usada. Contudo, pode ser deduzida de (4.43) e (4.47). Para uma incidência normal u_s , u_p e n são iguais, equações (4.25) e (4.26).

4.3.5 Coeficiente de absorção

O fenómeno da absorção traduz-se quando a luz incidente num filme é convertida para outra forma de energia, normalmente calor, dentro do próprio filme. A absorvência está ligada a R e a T através de,

$$1 = R + T + A \quad (4.52)$$

Normalmente, o meio incidente não é absorvente, ou pelo menos, não é o suficiente a tal ponto que, se for considerado sem absorção não será uma perda grave da generalidade do problema. Assim, considere-se que o meio incidente q na Figura 4.4 é transparente, pelo que u_q apenas tem parte real. Combinando a equação (4.48) e (4.50) pode-se reescrever a reflectância de uma estrutura multicamada de filmes finos:

$$R = \left(\frac{u_q B - C}{u_q B + C} \right) \left(\frac{u_q B - C}{u_q B + C} \right)^* \quad (4.53)$$

No caso em que existe absorção pelos filmes, a transmitância é dada por [1],

$$T = \frac{(1 - R) \operatorname{Re}(u_0)}{\operatorname{Re}(BC^*)} = \frac{4u_q \operatorname{Re}(u_0)}{(u_q B + C)(u_q B + C)^*} \quad (4.54)$$

Relembre-se que o índice 0 representa o meio substrato/saída. Da equação (4.52), a absorvência da estrutura multicamada será,

$$A = (1 - R) \left[1 - \frac{\text{Re}(u_0)}{\text{Re}(BC^*)} \right] \quad (4.55)$$

onde,

$$1 - R = \frac{2u_q(BC^* + B^*C)}{(u_qB + C)(u_qB + C)^*} \quad (4.56)$$

4.4 Aplicação do método a uma interface

Pode parecer estranho derivar uma teoria para uma situação complexa e aplicá-la agora a uma situação simples. Contudo, é o melhor exemplo para ilustrar como o método pode ser aplicado. Seguidamente tentar-se-á saber quanta luz é reflectida da superfície de um meio de índice de refração n_0 . Neste caso não existe filme fino, mas a teoria da secção 4.3 pode ser aplicada fazendo $q = 1$. Assim, $Y = u_0$ e em consequência,

$$r = \frac{(u_q - u_0)}{(u_q + u_0)} \quad (4.57)$$

$$t = \frac{2u_q}{(u_q + u_0)} \quad (4.58)$$

nas quais se assume que u_0 e u_q são reais. Estas equações são conhecidas como as equações de *Fresnel*. Podem ser escritas em termos dos campos eléctricos totais E_q^{\pm} e E_0^{\pm} . Para isso, usam-se as equações (4.21) e (4.22) e substitui-se o u das equações anteriores pelas equações (4.25) e (4.26), obtendo-se,

polarização s:

$$r' = \frac{E_q^-}{E_q^+} = \frac{n_q \cos \theta_q - n_0 \cos \theta_0}{n_q \cos \theta_q + n_0 \cos \theta_0} = \frac{\text{sen}(\theta_0 - \theta_q)}{\text{sen}(\theta_0 + \theta_q)} \quad (4.59)$$

$$t' = \frac{E_0^+}{E_q^+} = \frac{2n_q \cos \theta_q}{n_q \cos \theta_q + n_0 \cos \theta_0} = \frac{2 \text{sen} \theta_0 \cos \theta_q}{\text{sen}(\theta_0 + \theta_q)} \quad (4.60)$$

polarização p :

$$r' = \frac{E_q^-}{E_q^+} = \frac{n_q \cos \theta_0 - n_0 \cos \theta_q}{n_q \cos \theta_0 + n_0 \cos \theta_q} = \frac{\tan(\theta_0 - \theta_q)}{\tan(\theta_0 + \theta_q)} \quad (4.61)$$

$$t' = \frac{E_0^+}{E_q^+} = \frac{2n_q \cos \theta_q}{n_q \cos \theta_0 + n_0 \cos \theta_q} = \frac{2 \operatorname{sen} \theta_0 \cos \theta_q}{\operatorname{sen}(\theta_q + \theta_0) \cos(\theta_q - \theta_0)} \quad (4.62)$$

No caso da luz ter uma incidência normal obtém-se para ambas as polarizações,

$$r' = r = \frac{(n_q - n_0)}{(n_q + n_0)} \quad (4.63)$$

$$t' = t = \frac{2n_q}{(n_q + n_0)} \quad (4.64)$$

Na Figura 4.6 representa-se a reflectância do vidro ($n = 1.52$) em função do ângulo da luz incidente. Note-se que para a polarização p , a reflectância anula-se (ver equação (4.61)) quando,

$$\theta_0 + \theta_q = \pi/2 \quad (4.65)$$

O valor de θ_q é chamado de ângulo de *Brewster* e é dado por [1],

$$\theta_B = \tan^{-1} n \quad (4.66)$$

Para o vidro o ângulo de *Brewster* é aproximadamente 56° . À incidência normal, tanto a polarização p como a s têm uma reflexão de 4%.

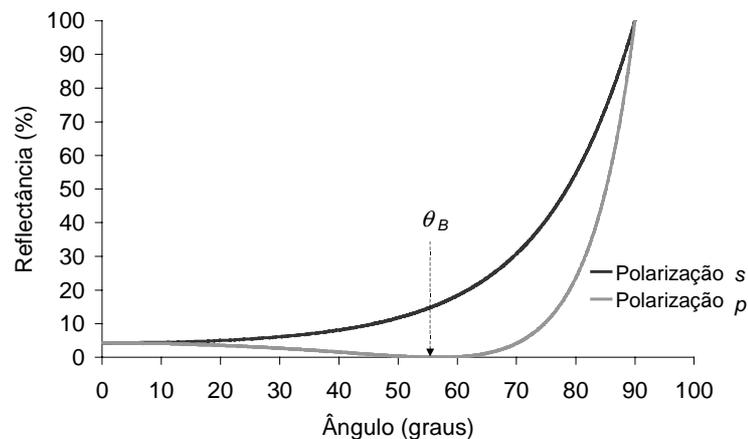


Figura 4.6: Reflectância de uma superfície de vidro em função do ângulo incidente, para a polarização s e p .

4.5 Aplicação do método a um único filme num substrato

4.5.1 Filme dieléctrico

Nesta secção investigar-se-á as propriedades de um filme fino dieléctrico depositado num substrato. A admitância óptica para um único filme depositado sobre um substrato é deduzida das equações (4.48) e (4.49),

$$Y = \frac{C}{B} \quad \text{onde} \quad \begin{pmatrix} B \\ C \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos g & \frac{i}{u_1} \sin g \\ i u_1 \sin g & \cos g \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ u_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos g + \frac{i u_0}{u_1} \sin g \\ i u_1 \sin g + u_0 \cos g \end{pmatrix} \quad (4.67)$$

então,

$$Y = \frac{u_0 \cos g + i u_1 \sin g}{i \left(\frac{u_0}{u_1} \right) \sin g + \cos g} \quad (4.68)$$

A Figura 4.7 mostra um gráfico da reflectância R , calculada das equações (4.50) e (4.68), em função de g (equação (4.30)). As curvas foram calculadas para um ângulo de incidência normal, $\theta = 0^\circ$.

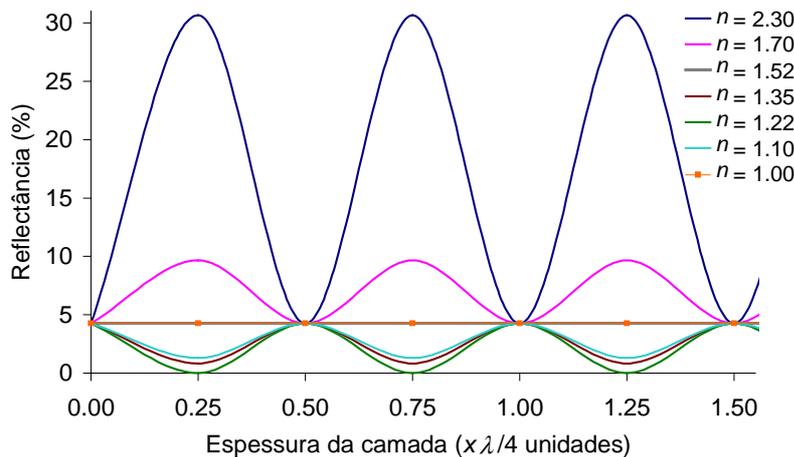


Figura 4.7: Reflectância de filmes dieléctricos com diferentes índices de refração em função da espessura do seu caminho óptico. Substrato de vidro com $n_0 = 1.5$. Meio incidente ar com $n_q = 1.0$. Ângulo de incidência $\theta_q = 0^\circ$. x é um inteiro. Se $\lambda_q = 550$ nm, então a região visível do espectro electromagnético estende-se de $\lambda_q/\lambda = 0.78$ a 1.38 .

Quando $g = \pi/2$, $\cos g = 0$ e $\sin g = 1$. A matriz M é dada por,

$$M = \begin{pmatrix} 0 & \frac{i}{u_1} \\ iu_1 & 0 \end{pmatrix}$$

e

$$Y = \frac{u_1^2}{u_0} \quad (4.69)$$

Isto significa que o índice de refração efectivo foi alterado de u_0 para u_1^2/u_0 , quando o filme é aplicado. Assim, ao aplicar-se o filme, a reflectância diminui se $u_q < u_1 < u_0$ (usado para fazer revestimentos sem reflexão) e aumenta se $u_q < u_0 < u_1$ (usada para fazer revestimentos de elevada reflexão). A estrutura comporta-se como se tivesse um substrato de índice de refração u_1^2/u_0 para esse comprimento de onda ($\lambda/4$). Deste modo é possível prever o comportamento de uma estrutura de filmes de materiais diferentes, em que cada filme tem uma espessura do caminho óptico de $\lambda/4$. A essa estrutura denomina-se de “pilha de quarto de onda”. É utilizada como um bloco básico para a construção de muitos tipos de filtros de filmes finos (por exemplo: filtro passa-banda larga, filtro passa-banda estreita, filtro rejeita-banda) [5].

Para $g = \pi$, $\cos g = 1$ e $\sin g = 0$. A matriz M pode ser escrita,

$$M = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$$

e

$$Y = u_0 \quad (4.70)$$

Neste caso, o índice de refração efectivo é o mesmo que o do substrato (sem camada) e a estrutura comporta-se como se no substrato não estivesse depositado nenhum filme, para esse comprimento de onda ($\lambda/2$).

Da equação (4.30) pode definir-se $LP = nd$, à incidência normal, como sendo a espessura do caminho óptico, onde d é a espessura do filme. Da análise realizada, conclui-se que, quando se usa um filme cuja espessura do caminho óptico tem valores tais como $\lambda_q/4$, $3\lambda_q/4$, $5\lambda_q/4$, ..., $x\lambda_q/4$, onde x é um inteiro ímpar, a reflectância da estrutura tem o seu pico máximo ou mínimo, consoante o índice de refração do filme é

maior ou menor que o índice de refração do substrato, respectivamente. Para um filme com espessuras do caminho óptico de $\lambda_q/2, 2\lambda_q/2, 3\lambda_q/2, \dots, x\lambda_q/2$, onde x é um inteiro, não existe variação na reflectância da estrutura em relação ao valor da reflectância do substrato sem filme.

É importante notar que as camadas com espessuras de caminho óptico $\lambda/4$ e $\lambda/2$, terão propriedades diferentes à medida que o comprimento de onda varia. Isto ocorre porque g depende de λ , segundo a equação (4.30). Note-se ainda que um filme com uma espessura de caminho óptico de $\lambda/4$ à incidência normal, não será mais um filme de $\lambda/4$ se o ângulo de incidência for diferente (equação (4.30)).

4.5.2 Filme metálico

A principal característica dos meios condutores é a presença de cargas eléctricas livres (no sentido em que não estão ligadas e podem circular no interior do metal). Nos metais estas cargas são electrões, e o seu movimento pode dar origem a correntes eléctricas. Quando se aplica um campo \mathbf{E} exterior, a corrente que flui através da área unitária, relaciona-se com a condutividade do meio (um condutor ideal teria uma condutividade infinita). A absorção da energia radiante por um material é portanto função da sua condutividade [2].

Uma vez que existe uma elevada taxa de absorção nos filmes metálicos, utilizam-se normalmente filmes metálicos muito finos, muito menores que a espessura de um comprimento de onda. A reflectância de um filme muito fino pode ser calculada de (4.63) para a incidência normal, considerando que n_0 é complexo. Para o alumínio, por exemplo, obtém-se $R = 92\%$ e para a prata obtém-se $R = 96\%$ (Figura 4.8). Neste caso $T = 0\%$ devido à absorção do filme.

A Figura 4.9 representa a reflectância espectral, à incidência normal, para vários filmes metálicos (os mais utilizados). O ouro é provavelmente o melhor material para revestimentos reflectores na região infravermelha do espectro. O alumínio e a prata são os que têm melhor reflectância na zona visível. O alumínio é o material mais adequado em termos de compatibilidade de fabrico, mas infelizmente tem maiores perdas por absorção do que a prata e mesmo do que o ouro, na região visível. Para esta região do espectro a prata parece ser o melhor material. Contudo, oxida quando exposta ao ar. Este problema pode ser contornado se o filtro for selado [1].

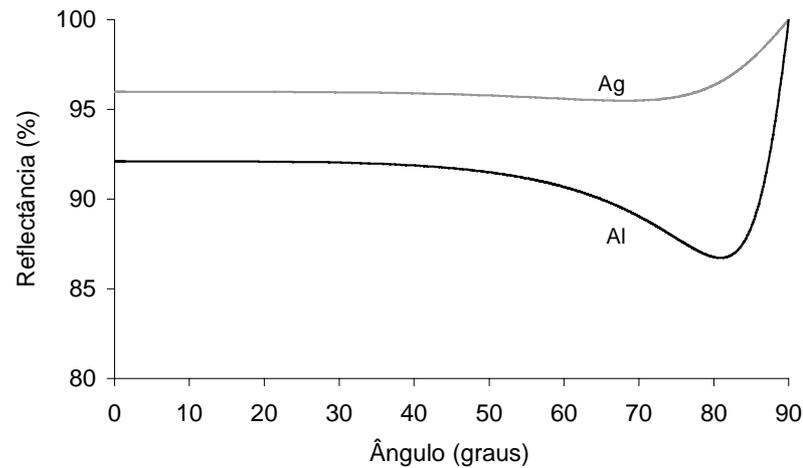


Figura 4.8: Reflectância de uma superfície de alumínio e prata em função do ângulo.

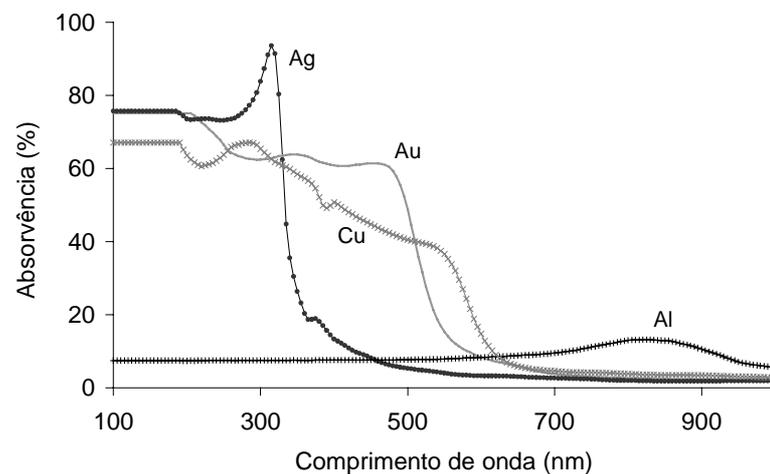


Figura 4.9: Reflectância da prata, do cobre, do ouro e do alumínio, em função do comprimento de onda.

Os filmes metálicos são bastante utilizados para revestimentos de elevada reflexão e são frequentemente revestidos com um filme fino dielétrico de modo a reduzir as perdas por absorção e a proteger o metal da atmosfera. As suas outras utilidades comuns são em filmes finos para os interferômetros e polarizadores birrefringentes [3]. Contudo, fora destas aplicações, os filmes metálicos não são muito utilizados devido às suas perdas por absorção. Por este motivo o filtro óptico será implementado com materiais dielétricos.

4.6 Aplicação do método a uma estrutura multicamada de filmes finos dieléctricos

A combinação de camadas com índices de refacção elevados e baixos e com determinadas espessuras resulta, conforme foi referido no estudo teórico, num espectro de reflexão da estrutura multicamada com máximos e mínimos em determinados comprimentos de onda. Como nos filmes dieléctricos a absorção é muito pequena, o espectro da transmissão é praticamente o inverso do da reflexão.

Das equações (4.48) e (4.49), para um par de filmes, uns de baixo (u_L) e outros de elevado (u_H) índice de refacção, obtém-se (assumindo, por simplicidade de cálculo, camadas de $\lambda/4$ de espessura do caminho óptico),

$$\begin{pmatrix} B \\ C \end{pmatrix} = M_H M_L \begin{pmatrix} 1 \\ u_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 & \frac{i}{u_H} \\ i u_H & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 0 & \frac{i}{u_L} \\ i u_L & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 \\ u_0 \end{pmatrix} \quad (4.71)$$

isto é,

$$Y = \frac{C}{B} = \left(\frac{u_H^2}{u_L^2} \right) u_0 \quad (4.72)$$

O efeito de serem utilizadas duas camadas é o de multiplicar a admitância do substrato pelo factor (u_H^2 / u_L^2) . Se se adicionar mais um par à dupla camada já existente, a admitância será multiplicada por mais um factor de (u_H^2 / u_L^2) . De um modo geral,

$$Y = \left(\frac{u_H}{u_L} \right)^{2N} u_0 \quad (4.73)$$

onde N é o número de pares de camadas HL . Combinando numa estrutura camadas de $\lambda/4$ e camadas de $\lambda/2$, consegue-se para determinados comprimentos de onda reduzir a reflexão e assim implementar filtros passa-banda ou rejeita-banda através de determinados arranjos dessas camadas. A Figura 4.7 ilustra esses princípios.

Dois exemplos da combinação de camadas de $\lambda/4$ e de $\lambda/2$ são as estruturas seguintes,

$$\text{Ar } HLH \text{ LL } HLH \text{ Vidro} \quad (4.74)$$

ou,

$$\text{Ar } HLHL \text{ HH LHLH Vidro} \quad (4.75)$$

onde H e L representam materiais dieléctricos com índice de refração elevado e baixo, respectivamente.

A matriz característica do primeiro caso é:

$$M = M_H M_L M_H M_L M_L M_H M_L M_H$$

Da equação (4.67), a matriz M pode ser escrita, à incidência normal,

$$M = \begin{pmatrix} -\frac{n_2}{n_1} & 0 \\ 0 & -\frac{n_1}{n_2} \end{pmatrix} \quad (4.76)$$

então,

$$M_L M_L = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} = -M_0$$

onde M_0 é a matriz identidade. A espessura do par central é de $\lambda/2$, o que não altera o valor da reflectância para o comprimento de onda projectado (ver secção 4.5.1, equação (4.70)). Se o seu efeito é nulo, a matriz característica do sistema é equivalente a:

$$M = -M_H M_L M_H M_H M_L M_H$$

Verifica-se novamente a mesma situação para o novo par central,

$$M_H M_H = \begin{pmatrix} -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} = -M_0$$

O resultado final é dado por:

$$M = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} = M_0$$

Para a frequência para a qual o filtro foi projectado, o coeficiente de reflexão para a incidência normal é, com base na equação (4.50),

$$r = \frac{n_q - n_0}{n_q + n_0} \quad (4.77)$$

O resultado é idêntico ao de um substrato não revestido (equação (4.63)). Em particular, para o vidro ($n_0 = 1.52$) e ar ($n_q = 1$), a reflectância mínima (teórica) é de $R = |r|^2 = 0.043$, logo a transmitância máxima (teórica) é de $T = 95.7\%$ (desprezando as reflexões na superfície posterior do substrato e todas as perdas nos filmes). É importante lembrar que as camadas com espessuras de caminho óptico $\lambda/4$ e $\lambda/2$, terão propriedades diferentes à medida que o comprimento de onda varia.

4.7 Projecto do filtro óptico

Na secção 1.2.2 referiu-se que a utilidade dos filtros ópticos no Microlab é a de permitir a medição do valor da concentração de uma determinada biomolécula na urina utilizando luz branca como fonte emissora de luz, evitando assim o recurso a uma fonte de luz monocromática específica.

Relembre-se que a medição da concentração é baseada na absorção óptica da luz pelas moléculas presentes na amostra, para um comprimento de onda bem definido da região visível do espectro electromagnético. Assim, o filtro óptico deve ser um filtro passa-banda cuja função é seleccionar o comprimento de onda adequado à biomolécula em análise. Uma vez que esse comprimento de onda é bem definido, o filtro passa-banda deve ter elevada selectividade (passa-banda estreita). A importância desta característica será abordada na secção 4.8.

4.7.1 Selectividade de um filtro passa-banda

O espectro de transmissão dos filtros passa-banda pode ser representado pela Figura 4.10. Um parâmetro importante para caracterizar a selectividade/largura de banda do filtro é a FWHM (*Full-Width-Half-Maximum*), ou seja a largura do pico a metade da sua intensidade máxima,

$$\text{FWHM} = \lambda_2 - \lambda_1 \quad (4.78)$$

onde λ_2 e λ_1 correspondem ao comprimento de onda a metade da sua intensidade máxima, à direita e à esquerda do centro do pico, respectivamente (Figura 4.10). O valor do FWHM traduz a qualidade do filtro óptico em termos da sua capacidade para seleccionar uma banda estreita do espectro electromagnético.

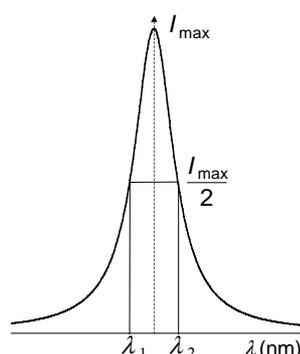


Figura 4.10: Esquema do cálculo da FWHM de um filtro passa-banda.

4.7.2 Canal óptico

A Figura 4.11 apresenta, esquematicamente, a estrutura do canal óptico do Microlab (secção em corte). A sua operação é baseada na absorção óptica para um comprimento de onda bem definido do espectro visível. O feixe emissor de luz branca incidente no Microlab é processado, pelo filtro óptico, de modo a obter-se apenas uma banda estreita de comprimentos de onda. A intensidade das componentes espectrais transmitidas através do fluido é medida usando um fotodetector posicionado por baixo do filtro óptico. O canal óptico é constituído por:

- Ar como meio de incidência.
- Camadas de filmes finos.
- Vidro como substrato.
- Camada de cerca de 650 nm de SiO_2 (inerente ao processo de fabrico do fotodetector, ver secção 5.3).
- Silício como meio de saída.

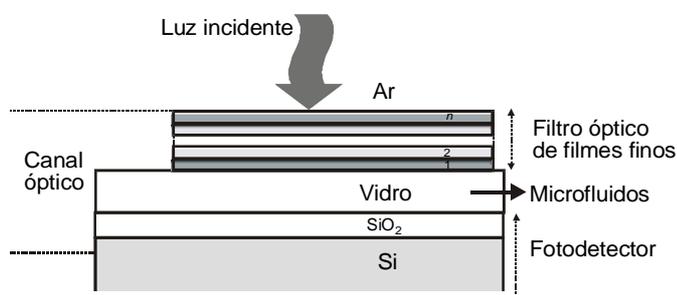


Figura 4.11: Estrutura do canal óptico do Microlab.

4.7.3 Requisitos para o espectro de transmissão do filtro óptico

O espectro de transmissão do filtro passa-banda deve ter uma selectividade tal que a sua FWHM seja inferior a 10 nm, quando o Microlab é fabricado apenas para analisar uma biomolécula (este valor é obtido das características espectrais das biomoléculas a utilizar). Os requisitos para a análise de mais que uma biomolécula serão apresentados em 4.8.2. O valor do pico do espectro de transmissão deve ser o mais elevado possível. Esse valor deve ter no mínimo o dobro do valor de qualquer pico indesejável (de ruído) que apareça dentro da gama visível do espectro electromagnético (Figura 4.12).

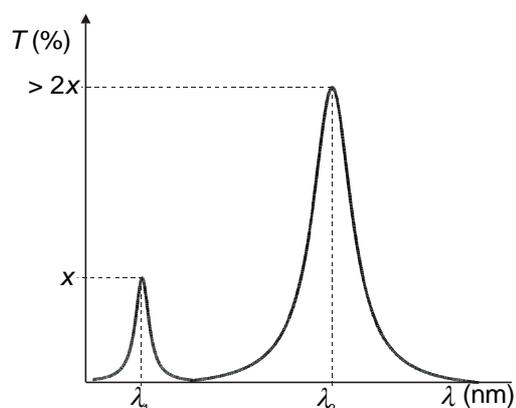


Figura 4.12: Requisito para a intensidade da transmissão do pico.

Pretende-se também que o filtro tenha o menor número possível de camadas, para facilitar o processo de fabrico. Da teoria, viu-se que quanto maior o número de camadas mais selectivo é o filtro. Contudo, é necessário encontrar um compromisso entre o número de camadas e os valores pretendidos para a transmitância e a FWHM.

4.7.4 Escolha dos materiais

O substrato no qual serão depositadas as camadas é de vidro (*Corning 7059*), com 500 μm de espessura e com um índice de refração de $n = 1.52$ [11]. Escolheu-se o vidro porque é um material transparente e também porque foi neste material que foi realizado o protótipo do sistema de microfluidos. Numa solução totalmente integrada, os filtros seriam depositados na lamela que contém os orifícios.

Os filmes metálicos têm elevadas perdas por absorção, pelo que, tal como foi referido, não serão utilizados. Assim, a estrutura multicamada de filmes finos é constituída apenas por filmes dieléctricos, que, quando bem projectados, e obviamente

bem fabricados, produzem elevada transmissão e baixas perdas por absorção. Os dielétricos escolhidos foram o SiO_2 (dióxido de silício) e o TiO_2 (dióxido de titânio). Esta escolha deveu-se em primeiro lugar ao facto de ambos serem materiais duros pelo que são extremamente difíceis, ou mesmo quase impossíveis, de remover do substrato. Em segundo lugar, a estrutura multicamada deve ser implementada com materiais que tenham um índice de refacção baixo e elevado intercaladamente (ver secção 4.5). Em terceiro lugar, de entre os dielétricos com índices de refacção baixos, escolheu-se o SiO_2 porque a sua dependência do índice de refacção dentro da gama visível de comprimentos de onda é praticamente constante (1.47 a 1.45). Por fim, a escolha de um dielétrico com índice de refacção elevado recaiu sobre o TiO_2 devido à facilidade de fabrico, uma vez que o processo para a sua deposição encontrava-se bem caracterizado [12].

Na Figura 4.13 apresenta-se o espectro de transmissão e reflexão destes dois materiais em função da espessura do filme. Note-se que ambos os filmes não absorvem nos comprimentos de onda da gama visível, uma vez que os seus índices de refacção têm apenas componentes reais. Assim, $R + T = 100\%$ conforme visualizado na Figura 4.13. Os valores utilizados para os índices de refacção dos materiais descritos ao longo desta tese são os fornecidos pela base de dados da *Sopra Company* [13]. Caso contrário será referido. As tabelas com os índices de refacção destes dois materiais encontram-se no Anexo II.

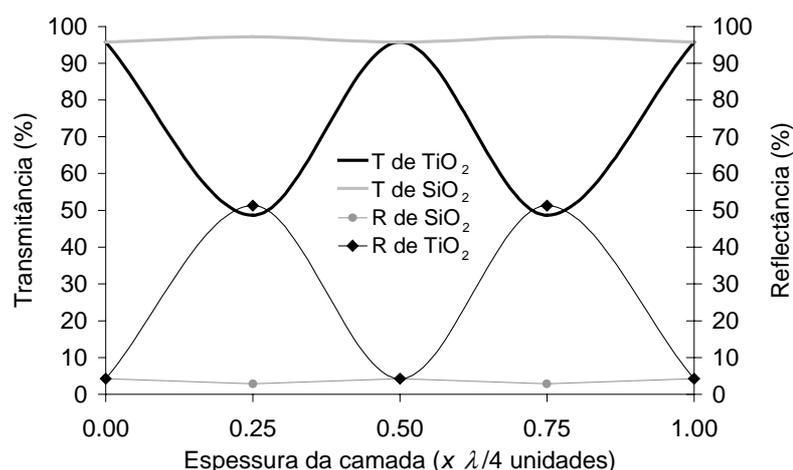


Figura 4.13: Valores da transmitância e da reflectância do TiO_2 e SiO_2 em função da espessura da camada. Considerou-se cada camada independente e depositada num substrato de vidro com $n = 1.52$.

4.7.5 *Software* de simulação de filmes finos

Da teoria de filmes finos constatou-se que os métodos matemáticos são bastante úteis para o projecto de uma estrutura inicial, que será apenas uma aproximação grosseira ao pretendido. Uma vez que existem imensos parâmetros a variar, devem ser utilizadas técnicas de optimização computacional que partem dessa estrutura grosseira em direcção a uma estrutura melhorada. Contudo, o resultado final pode ficar aquém da característica ideal, pelo que devem ser realizados refinamentos para ajuste de alguns parâmetros.

Um *software* profissional de projecto de filmes finos “TFCalc 3.4” (fornecido pela *Software Spectra, Inc.*) [14], desenvolvido especialmente para o tipo de cálculos ópticos pretendido, foi utilizado em todas as simulações computacionais dos filtros ópticos. Essas simulações incluem a dependência do comprimento de onda das propriedades ópticas dos materiais.

4.7.6 Simulações ópticas

O ácido úrico foi a primeira biomolécula candidata ao Microlab. Assim, o filtro óptico foi projectado para ter um máximo de transmitância a 495 nm. Este comprimento de onda é o valor para o qual as moléculas de ácido úrico, após reagirem com o reagente adequado, têm o máximo de absorvência [15].

A Tabela 4.1 apresenta um arranjo de camadas dieléctricas com uma combinação de espessuras das camadas de forma a obter-se o melhor desempenho possível, dentro dos requisitos propostos. A estrutura é composta por 11 camadas. A simulação do espectro de transmissão (Figura 4.14) revela que o desempenho do filtro satisfaz os requisitos propostos, uma vez que o valor máximo da transmitância é de 91.4% e a FWHM é de 5.5 nm. Se se reduzisse o número de camadas, a FWHM seria maior que 10 nm.

Tabela 4.1: Material e espessura das camadas do filtro passa-banda.

Camada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Material	TiO ₂	SiO ₂	TiO ₂								
Espessura (nm)	60	45	45	80	65	75	80	75	45	50	45

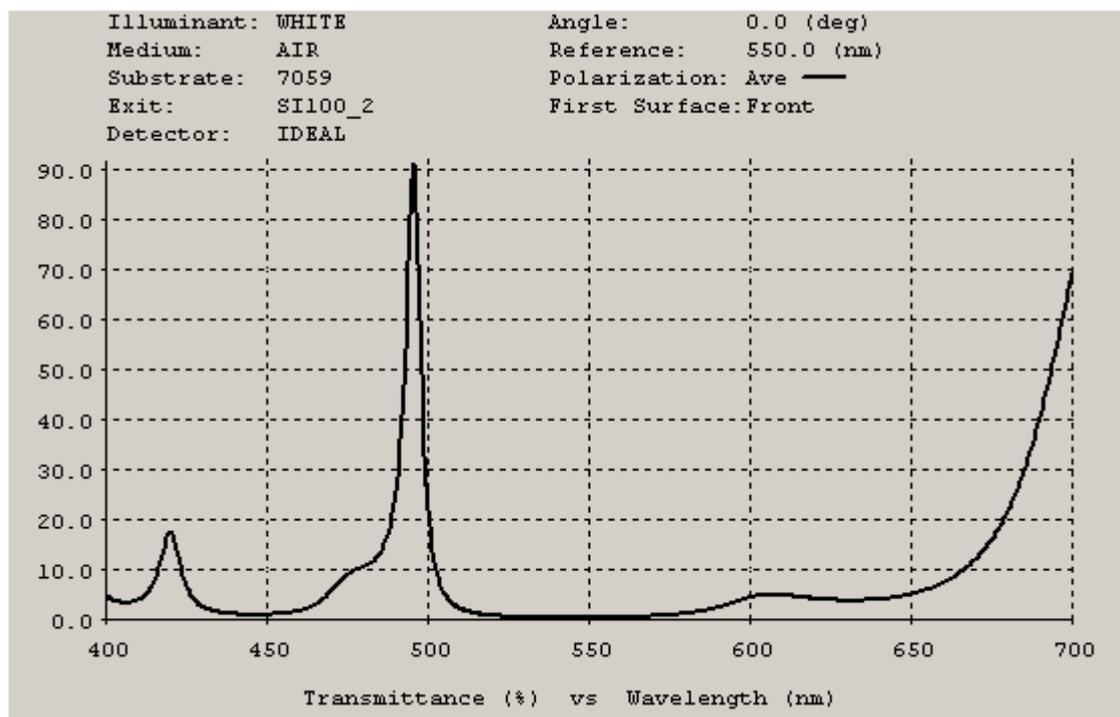


Figura 4.14: Simulação do espectro de transmissão, em função do comprimento de onda, do filtro passa-banda com a estrutura da Tabela 4.2. $T_{\max} = 91.4\%$, FWHM = 5.5 nm.

Um arranjo baseado na estrutura referida em (4.75), ou seja, Ar *HLHL HH LHLH* Vidro, apresenta-se na Tabela 4.2. A estrutura é composta por 9 camadas dielétricas. A simulação óptica, apresentada pelo espectro de transmissão da Figura 4.15, revela que esta estrutura é a melhor opção para o filtro passa-banda em termos de características ópticas e praticabilidade. O seu desempenho satisfaz os requisitos pretendidos, uma vez que o valor máximo da transmitância é de 94.2% e a FWHM é de 7.5 nm. Para além de satisfazer os requisitos, esta estrutura apresenta menos duas camadas do que a anterior (ver Tabela 4.1), o que é vantajoso em termos de facilidade de fabrico.

Tabela 4.2: Material e espessura das camadas do filtro passa-banda com a estrutura dos filmes: *HLHL HH LHLH*.

Camada	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Material	TiO ₂	SiO ₂	TiO ₂						
Espessura (nm)	41	85	41	85	80	85	41	85	41

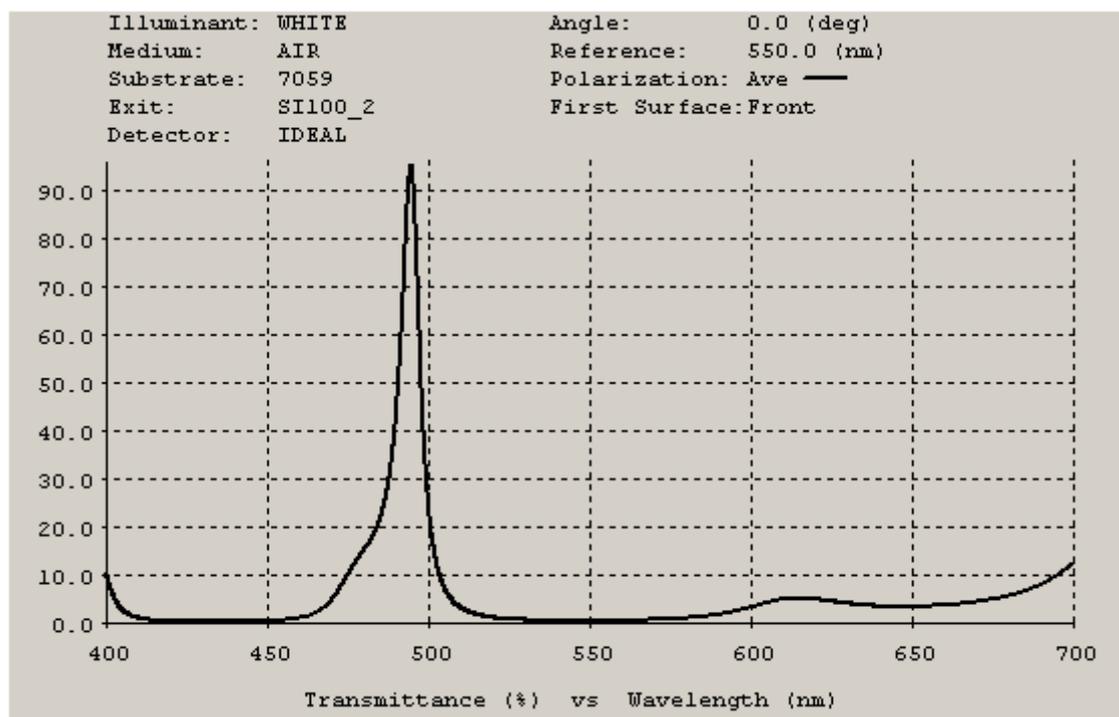


Figura 4.15: Simulação do espectro de transmissão, em função do comprimento de onda, do filtro passa-banda com a estrutura da Tabela 4.2. $T_{\max} = 94.2\%$, FWHM = 7.5 nm.

O desempenho do filtro passa-banda pode ser melhorado aumentando o número de camadas dielétricas (Tabela 4.3, Figura 4.16). Contudo, a complexidade do processo de fabrico aumenta. Note-se que esta estrutura tem o mesmo número de camadas da apresentada na Tabela 4.1 e um desempenho bastante melhor. Assim, a estrutura com uma combinação de camadas de $\lambda/4$ e $\lambda/2$, conforme apresentado em (4.74) ou (4.75), parece ser a mais adequada para o Microlab, em especial a estrutura descrita na Tabela 4.2.

Tabela 4.3: Material e espessura das camadas do filtro passa-banda com a estrutura dos filmes: *HLHLH LL HLHLH*.

Camada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Material	TiO ₂	SiO ₂	TiO ₂								
Espessura (nm)	41	85	41	85	41	170	41	85	41	85	41

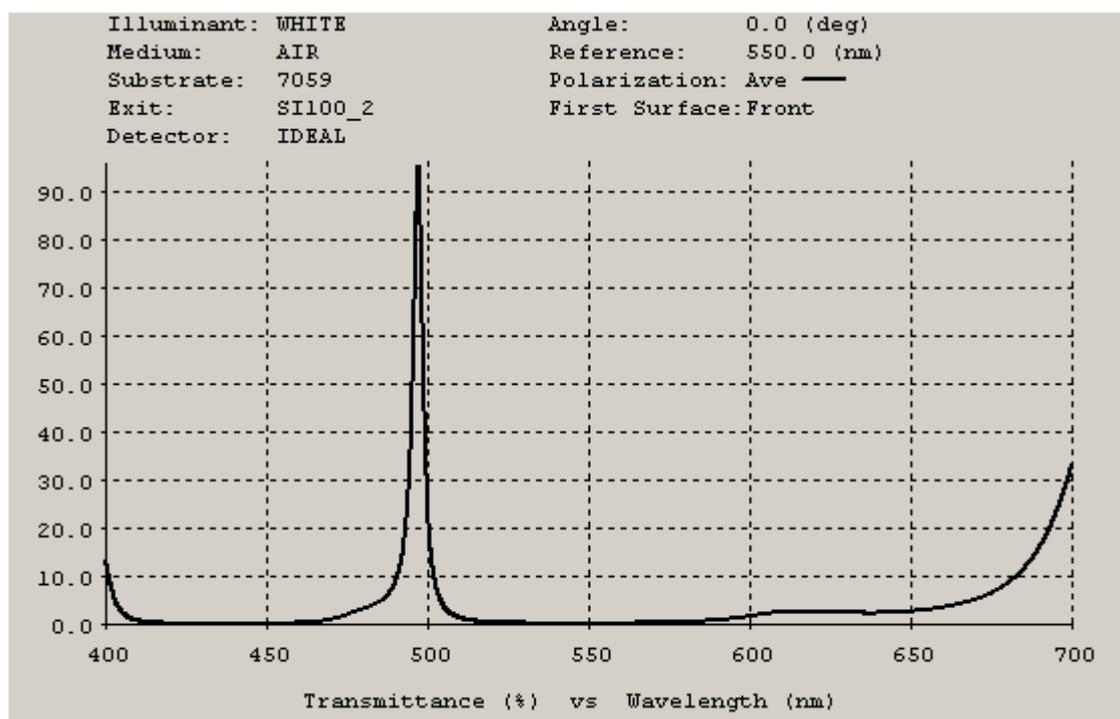


Figura 4.16: Simulação do espectro de transmissão, em função do comprimento de onda, do filtro passa-banda com a estrutura da Tabela 4.3. $T_{\max} = 94.7\%$, FWHM = 3.6 nm.

O *software* utilizado permite introduzir a eficiência quântica do detector real. Se os espectros fossem simulados considerando o detector real, o valor de pico da transmitância descia para cerca de 60% (para $\lambda = 495$ nm). No final da secção 4.8.3, ilustra-se uma simulação considerando o díodo real fabricado.

O filtro passa-banda da Figura 4.15 é, portanto, adequado e necessário para, no Microlab, se medir a concentração de ácido úrico na urina. Contudo, para se utilizar como fonte emissora de luz uma luz branca convencional, é necessário suprimir a região não visível do espectro electromagnético. Uma lâmpada convencional de filamento incandescente, como por exemplo a lâmpada de tungsténio, tem um espectro de emissão, tipicamente, entre 320 nm a 2600 nm [16]. Para suprimir a gama espectral não visível, um filtro passa-banda comercialmente disponível, deve ser colocado no topo do Microlab. Um exemplo pode ser o filtro com a referência BG40 ou VG6, da *Schott* [17]. As especificações técnicas destes dois filtros encontram-se no Anexo III.

Analisando a estrutura da multicamada do filtro óptico seleccionado para o Microlab, constata-se que é similar à estrutura denominada de “interferómetro de *Fabry-Perot*”. Uma descrição completa da sua teoria pode ser consultada em [1, 6, 18]. Sucintamente, a sua estrutura é composta por duas superfícies, denominadas de “espelhos”, posicionados paralelamente um ao outro, geralmente separados por ar. A expressão que relaciona a distância entre os espelhos e o comprimento de onda que é transmitido, é dada por,

$$2nd = \lambda m \quad (4.79)$$

onde n é o índice de refração do meio de espaçamento entre os espelhos, d é a distância entre os espelhos (ou a espessura desse meio de espaçamento), λ é o comprimento de onda da luz incidente e m é a ordem de interferência. No caso da estrutura escolhida para o filtro óptico, *HLHL HH LHLH*, pode dizer-se que as quatro primeiras camadas são o espelho 1, a camada 5 é a camada de espaçamento e as quatro últimas camadas são o espelho 2.

4.8 Projecto da matriz de filtros ópticos

4.8.1 Princípio

Da teoria de filmes finos (secção 4.3) sabe-se que as camadas têm propriedades diferentes à medida que o comprimento de onda varia. Esta dependência pode ser usada para desviar a banda espectral de transmissão para outros comprimentos de onda, mexendo na espessura de alguma, ou algumas, camadas. Assim, em vez de se projectar um único filtro óptico, porque não projectar mais filtros ópticos de tal forma que, com o mesmo Microlab, se consiga analisar mais biomoléculas na urina? Para tal, é necessário verificar se existem mais biomoléculas que possam ser analisadas por detecção colorimétrica. Na Tabela 4.4 encontram-se 16 biomoléculas que preenchem esse requisito, assim como o valor do comprimento de onda para o qual cada uma delas tem o máximo de absorvência (necessário para projectar os filtros). Uma terceira coluna informa ainda que algumas dessas biomoléculas podem ser analisadas não só na urina como também no plasma, no soro sanguíneo e no fluido cerebrospinal. Toda esta informação foi retirada do manual de diagnóstico da *Sigma-Aldrich* [15], de informação fornecida por laboratórios de análises clínicas e de medições por espectrofotometria realizadas no Departamento de Física da UM.

Tabela 4.4: Dezasseis biomoléculas que podem ser analisadas por detecção colorimétrica. U (Urina), S (Soro sanguíneo), P (Plasma sanguíneo), CSF (Fluido cerebrospinal) [15].

Biomolécula a analisar	Comprimento de onda do máximo de absorvência	Fluido biológico
17- Cetosteróides	480	U
Cloro	488	U, S
Ácido úrico	495	U, CSF
Colesterol	503	U, S
Glicose	512	U, S
Magnésio	520	U, S
Creatinina	528	U, S, P
Ureia	536	U
Hemoglobina	544	U, P
β glucuronidase	552	U, S
Bilirrubina	560	U, S
Leucina aminopeptidase	568	U
Cálcio	575	U, S
Oxalato	583	U
Proteína Total	591	U
Albumina	600	U, S

4.8.2 Requisitos para o projecto da matriz de filtros ópticos

Da Tabela 4.4 concluiu-se que os comprimentos de onda para os quais as biomoléculas têm os seus máximos de absorvência são próximos. Distam, em média, 8 nm. É pois necessário que os filtros ópticos tenham elevada selectividade. Assim, cada filtro óptico deve ter uma FWHM menor que 6 nm, de forma a evitar que a medida da concentração de uma dada biomolécula não seja afectada pelas biomoléculas que se encontram na sua vizinhança, uma vez que os seus espectros de absorvência se sobrepõem (ver secção 7.1).

Os 16 filtros ópticos podem ser dispostos em forma de uma matriz 4×4 . Uma impressão artística encontra-se na Figura 4.17. Essa matriz seria colocada por cima da câmara de detecção. Por baixo desta estariam 16 fotodetectores alinhados com os filtros ópticos. Ter-se-ia assim 16 canais ópticos como o da Figura 4.11.

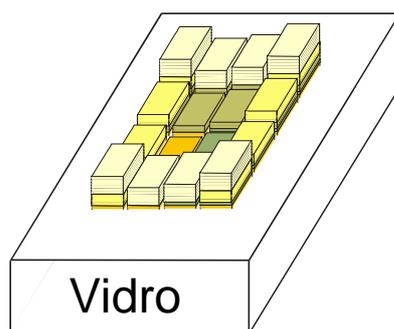


Figura 4.17: Impressão artística dos 16 filtros ópticos.

Pretende-se que a complexidade do processo de fabrico dos 16 filtros ópticos não aumente 16 vezes. Para tal, é necessário cumprir mais alguns requisitos. Em primeiro lugar, os filtros devem ter o menor número possível de camadas, cumprindo o requisito de cada filtro ter uma $FWHM < 6$ nm. Em segundo lugar, deve arranjar-se uma combinação de espessuras das camadas que permita que o número de deposições de filmes seja a menor possível. Caso contrário, com 16 filtros ópticos de 11 camadas seriam necessárias $11 \times 16 = 176$ deposições. Isto não é viável (seria um processo de fabrico muito complexo e demorado). Da teoria de filmes finos, a banda espectral de transmissão é desviada para outros comprimentos de onda, se a espessura de uma camada for alterada. Esta dependência, neste caso particular, é vantajosa e deve ser bem trabalhada de tal forma que sejam alteradas as espessuras do menor número possível de camadas. Em terceiro lugar, pretende-se que os 16 filtros ópticos sejam fabricados na mesma sequência e processo de fabrico. Para tal são necessárias máscaras para que as deposições das camadas específicas a um só filtro óptico não afectem os outros filtros ópticos. Aqui é de igual modo necessário encontrar um arranjo para a disposição dos filtros ópticos na matriz que minimize o número de máscaras a usar. Em resumo, é necessário arranjar um compromisso entre as espessuras das camadas, o número de camadas, o número de máscaras, o número de deposições e o desempenho dos filtros ópticos.

4.8.3 Simulações ópticas da matriz de filtros ópticos

Os resultados das simulações ópticas são apresentados através dos espectros de transmissão para os 16 filtros ópticos (Figura 4.18). Esses resultados revelam que a estrutura da Tabela 4.5 é a melhor opção em termos de características ópticas, requisitos propostos e praticabilidade. Cada filtro óptico necessita de 11 camadas para cumprir uma $FWHM < 6$ nm. A estrutura dessas camadas será então, *HLHLH LL HLHLH*. A camada 6 (camada central – *LL*) foi projectada conjuntamente com as outras, de tal

forma que, variando apenas a sua espessura (mantendo a espessura das restantes) consegue-se obter os 16 filtros ópticos. A sua espessura varia de 140 nm a 230 nm com incrementos de 6 nm. Essa variação resulta num varrimento do comprimento de onda em 120 nm (480 nm a 600 nm). Os picos distam entre si de 8 nm, em média. Os 12 picos centrais têm uma FWHM ≤ 3.5 nm. Os 2 primeiros picos ($\lambda_1 = 480$ nm, $\lambda_2 = 488$ nm) têm uma FWHM = 5 nm e os 2 últimos picos ($\lambda_{15} = 591$ nm e $\lambda_{16} = 600$ nm) têm uma FWHM = 6 nm. O valor de pico da transmitância varia de 86% a 92%. Os picos indesejados, que no presente caso encontram-se à volta dos 425 nm, têm uma intensidade menor que a metade da transmitância máxima do seu pico correspondente. As espessuras das camadas foram optimizadas para obter-se o menor número de máscaras e deposições, conforme se verá na secção 6.2 que descreve o fabrico dos filtros ópticos.

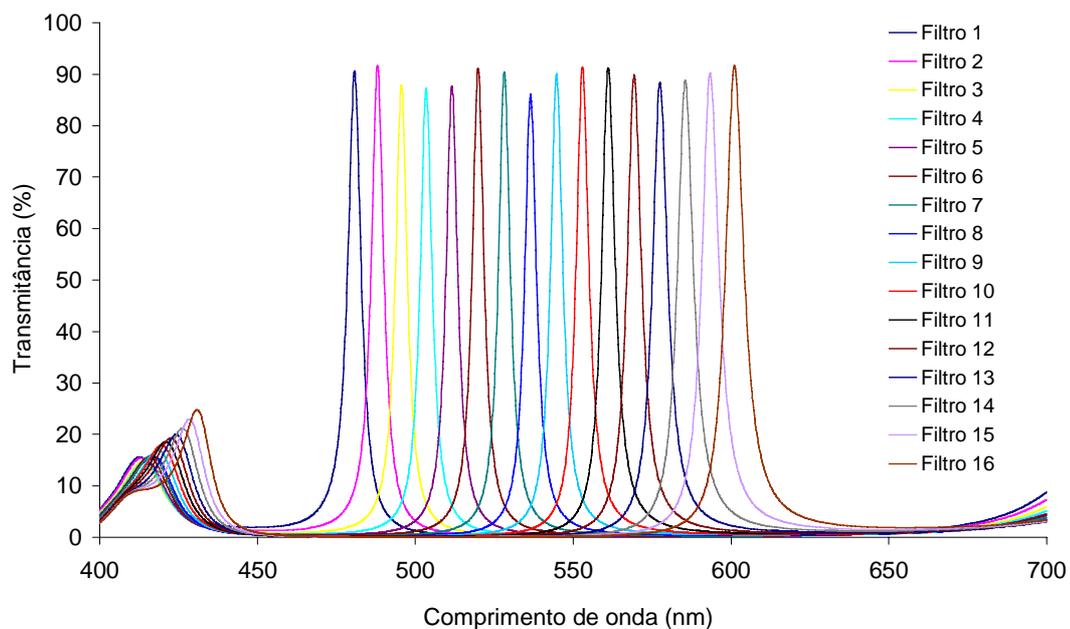


Figura 4.18: Simulação da transmitância, em função do comprimento de onda, para a matriz de 16 filtros ópticos. A estrutura dos filtros encontra-se na Tabela 4.5. A camada 6 é de SiO_2 e a sua espessura varia de 140 nm a 230 nm com incrementos de 6 nm para fornecer o deslocamento do pico de transmissão.

Tabela 4.5: Material e espessura das camadas da matriz de filtros ópticos passa-banda, com a estrutura *HLHLH LL HLHLH*.

Nº. Camada	Material	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3	Filtro 4	Filtro 5
		Pico = 480 nm	Pico = 488 nm	Pico = 495 nm	Pico = 503 nm	Pico = 512 nm
		Espessura (nm)				
1	TIO2	45	45	45	45	45
2	SIO2	95	95	95	95	95
3	TIO2	45	45	45	45	45
4	SIO2	95	95	95	95	95
5	TIO2	45	45	45	45	45
6	SIO2	140	146	152	158	164
7	TIO2	45	45	45	45	45
8	SIO2	95	95	95	95	95
9	TIO2	45	45	45	45	45
10	SIO2	95	95	95	95	95
11	TIO2	45	45	45	45	45

Nº. Camada	Material	Filtro 6	Filtro 7	Filtro 8	Filtro 9	Filtro 10
		Pico = 520 nm	Pico = 528 nm	Pico = 536 nm	Pico = 544 nm	Pico = 552 nm
		Espessura (nm)				
1	TIO2	45	45	45	45	45
2	SIO2	95	95	95	95	95
3	TIO2	45	45	45	45	45
4	SIO2	95	95	95	95	95
5	TIO2	45	45	45	45	45
6	SIO2	170	176	182	188	194
7	TIO2	45	45	45	45	45
8	SIO2	95	95	95	95	95
9	TIO2	45	45	45	45	45
10	SIO2	95	95	95	95	95
11	TIO2	45	45	45	45	45

Nº. Camada	Material	Filtro 11	Filtro 12	Filtro 13	Filtro 14	Filtro 15	Filtro 16
		Pico = 560 nm	Pico = 568 nm	Pico = 575 nm	Pico = 583 nm	Pico = 591 nm	Pico = 600 nm
		Espessura (nm)					
1	TIO2	45	45	45	45	45	45
2	SIO2	95	95	95	95	95	95
3	TIO2	45	45	45	45	45	45
4	SIO2	95	95	95	95	95	95
5	TIO2	45	45	45	45	45	45
6	SIO2	200	206	212	218	224	230
7	TIO2	45	45	45	45	45	45
8	SIO2	95	95	95	95	95	95
9	TIO2	45	45	45	45	45	45
10	SIO2	95	95	95	95	95	95
11	TIO2	45	45	45	45	45	45

Um outro arranjo com 11 camadas dielétricas apresenta-se na Tabela 4.6. Tentou otimizar-se as camadas e as suas espessuras para o mesmo número de camadas, o mesmo número de máscaras e de deposições e a mesma gama de comprimentos de onda do filtro projectado anteriormente. No arranjo que mais se aproximou dos objectivos, a variação das espessuras das camadas 5 e 7 resulta na obtenção dos 16 filtros ópticos. Em qualquer dos casos, a utilização do *software* de simulação de filmes finos é fundamental. Contudo, neste caso particular, sem as simulações seria extremamente difícil obter-se resultados viáveis. O desempenho desta estrutura é ilustrado pela Figura 4.19. Para manter o mesmo número de camadas, de máscaras e de deposições do filtro anterior (Figura 4.18), a gama de comprimentos de onda varrida é menor, 84 nm (496 nm a 580 nm). A FWHM é ligeiramente pior. Os 10 picos centrais têm uma FWHM = 4 nm. Os filtros 3 e 14 têm uma FWHM = 6 nm. Os filtros 1 e 2 têm

uma FWHM = 10 nm e os filtros 15 e 16 têm uma FWHM = 7 nm. Além disso os picos não se encontram espaçados uniformemente. O valor da transmitância, para alguns filtros, é ligeiramente superior relativamente à estrutura anterior. Esta estrutura poderá ter vantagens em certos processos de fabrico, uma vez que as camadas têm valores de espessuras mais aproximados umas das outras que no caso anterior.

Tabela 4.6: Material e espessura das camadas da matriz de filtros ópticos passa-banda, com um arranjo de camadas dieléctricas.

Nº. Camada	Material	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3	Filtro 4	Filtro 5
		Pico = 496 nm	Pico = 503 nm	Pico = 508 nm	Pico = 512 nm	Pico = 519 nm
		Espessura (nm)				
1	TiO2	65	65	65	65	65
2	SiO2	60	60	60	60	60
3	TiO2	55	55	55	55	55
4	SiO2	80	80	80	80	80
5	TiO2	60	65	60	65	60
6	SiO2	85	85	85	85	85
7	TiO2	75	75	80	80	85
8	SiO2	70	70	70	70	70
9	TiO2	55	55	55	55	55
10	SiO2	65	65	65	65	65
11	TiO2	55	55	55	55	55

Nº. Camada	Material	Filtro 6	Filtro 7	Filtro 8	Filtro 9	Filtro 10
		Pico = 523 nm	Pico = 530 nm	Pico = 535 nm	Pico = 543 nm	Pico = 548 nm
		Espessura (nm)				
1	TiO2	65	65	65	65	65
2	SiO2	60	60	60	60	60
3	TiO2	55	55	55	55	55
4	SiO2	80	80	80	80	80
5	TiO2	65	60	65	60	65
6	SiO2	85	85	85	85	85
7	TiO2	85	90	90	95	95
8	SiO2	70	70	70	70	70
9	TiO2	55	55	55	55	55
10	SiO2	65	65	65	65	65
11	TiO2	55	55	55	55	55

Nº. Camada	Material	Filtro 11	Filtro 12	Filtro 13	Filtro 14	Filtro 15	Filtro 16
		Pico = 555 nm	Pico = 559 nm	Pico = 564 nm	Pico = 569 nm	Pico = 575 nm	Pico = 580 nm
		Espessura (nm)					
1	TiO2	65	65	65	65	65	65
2	SiO2	60	60	60	60	60	60
3	TiO2	55	55	55	55	55	55
4	SiO2	80	80	80	80	80	80
5	TiO2	60	65	60	65	60	65
6	SiO2	85	85	85	85	85	85
7	TiO2	100	100	105	105	110	110
8	SiO2	70	70	70	70	70	70
9	TiO2	55	55	55	55	55	55
10	SiO2	65	65	65	65	65	65
11	TiO2	55	55	55	55	55	55

Independentemente da estrutura das camadas, um filtro comercial terá, de igual modo, que ser utilizado no topo do Microlab. As razões da sua utilização e tipo de filtro são as mesmas descritas em 4.7.6.

Analisando o desempenho destas duas estruturas, conclui-se que, se o processo de fabrico for fiável e preciso, a melhor opção será a estrutura da Tabela 4.5. A estrutura apresentada na Tabela 4.6 tem uma transmitância ligeiramente mais elevada em alguns

filtros. Contudo, para as medições pretendidas, esta vantagem não é relevante, uma vez que essas medições são realizadas sempre em relação a um reagente e a um calibrador de concentração conhecida. Por isso, é mais relevante que a gama de comprimentos de onda percorrida seja maior, o que se traduz num maior número de biomoléculas a analisar.

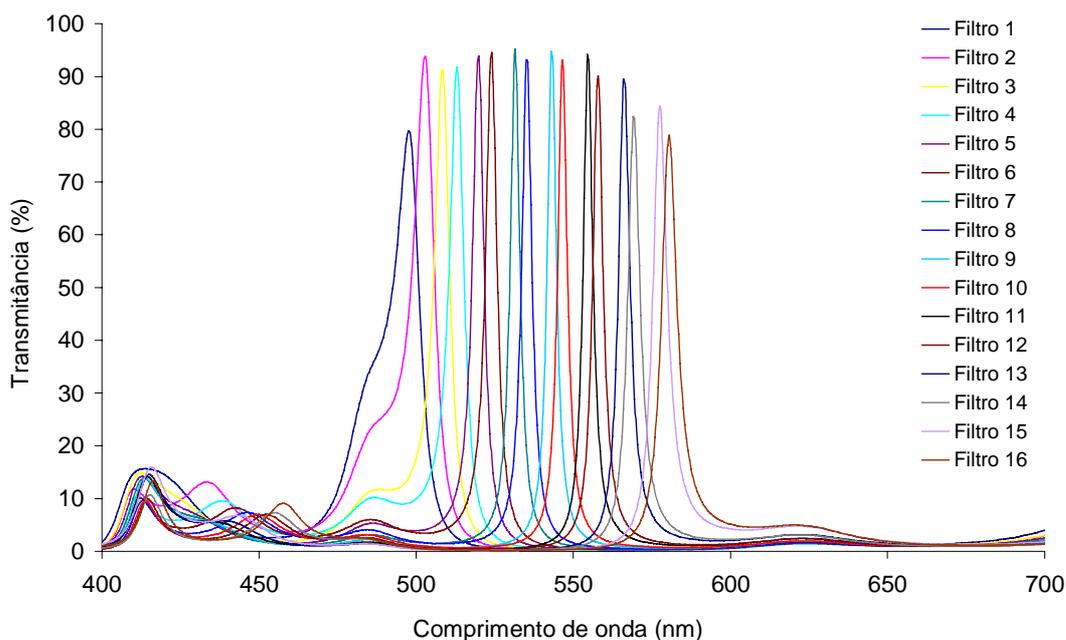


Figura 4.19: Simulação da transmittância, em função do comprimento de onda, para uma matriz de 16 filtros ópticos com a estrutura da Tabela 4.6. A variação das espessuras das camadas 5 e 7 fornecem o deslocamento do pico de transmissão.

A Figura 4.20 apresenta os espectros de transmissão, para a estrutura da Tabela 4.5, simulados com o detector real. Observa-se que o valor máximo dos 16 espectros forma uma envolvente representada pela linha a tracejado na Figura 4.20. Essa envolvente está relacionada com a camada de SiO_2 de 650 nm de espessura do fotodetector (ver Figura 4.11). Relembre-se que as medições pretendidas são realizadas sempre em relação a um reagente e a um calibrador com um padrão de concentração conhecida. Assim, quer o efeito do fotodetector, quer a flutuação da luz branca, podem ser desprezados neste tipo de medições relativas.

Duas outras soluções para a matriz de filtros ópticos encontram-se em [19, 20]. Na primeira, devido ao processo de fabrico, eram necessárias espessuras das camadas dieléctricas maiores que 100 nm. Na segunda, é descrito um interferómetro de *Fabry-Perot* com espelhos metálicos. Em ambas, o desempenho dos filtros ópticos é pior que o apresentado neste documento.

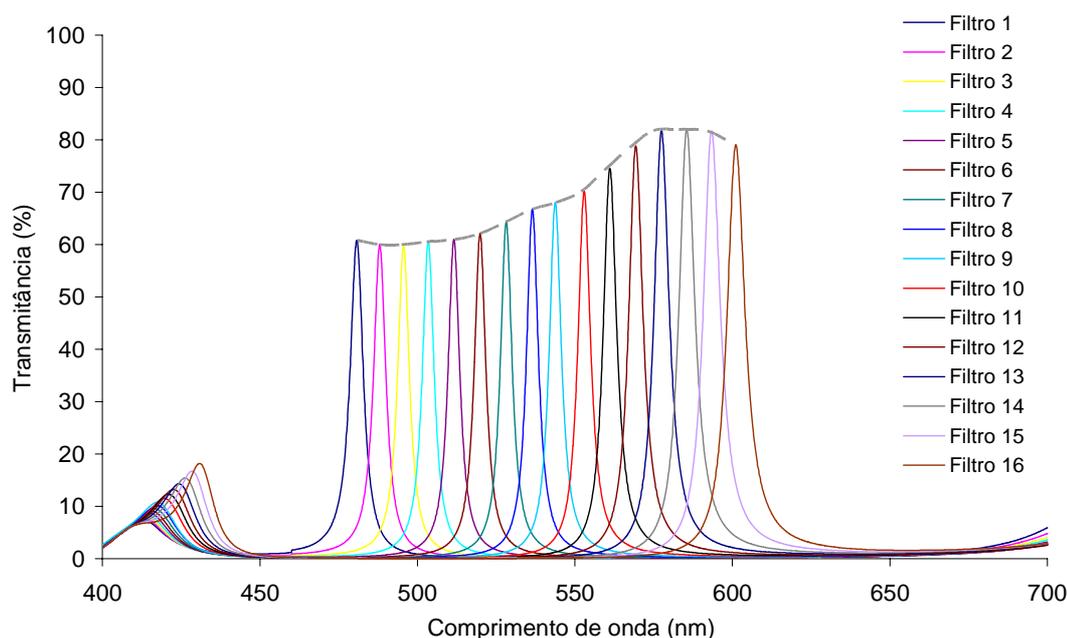


Figura 4.20: Simulação da transmissância, em função do comprimento de onda, para a matriz de 16 filtros ópticos com a estrutura da Tabela 4.5. Esta simulação foi realizada considerando como detector o fotodíodo fabricado.

4.9 Conclusão

A medida, por absorção óptica, da concentração de 16 biomoléculas da urina com o mesmo Microlab é conseguida com uma matriz de 16 filtros ópticos. Foi demonstrado que, para o projecto dos 16 filtros ópticos, a estrutura baseada em camadas dieléctricas dispostas tipo *HLHLH LL HLHLH* é a melhor opção em termos de características ópticas e praticabilidade. Essa estrutura foi otimizada para se obter elevada selectividade para cada filtro e facilidade no processo de fabrico, ou seja, minimizando o número de camadas, de deposições e de máscaras. Os 16 filtros ópticos varrem comprimentos de onda desde 480 nm a 600 nm em intervalos de aproximadamente 8 nm, com $FWHM \leq 6$ nm. Assim, para as medições, o Microlab necessita apenas de uma fonte emissora de luz branca convencional, tornando-o num dispositivo portátil. As oscilações da luz branca são compensadas pela medição simultânea em cada análise de um padrão de concentração conhecida – calibrador.

Bibliografia

- [1] MACLEOD, H. A. - *Thin-film optical filters*. 3^a ed. Institute of Physics Publishing, Philadelphia, USA, 2001.
- [2] HENCHT, E. - *Óptica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, 1991.
- [3] BORN, M.; WOLF, E. - *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*. 7^a ed. Capítulos 1, 2 e 14, Cambridge University Press, 1999.
- [4] YEH, P. - *Optical waves in layered media*. John Wiley & Sons, 1988.
- [5] FLORY, F. R. - *Thin films for optical systems*. Marcel Dekker, 1995.
- [6] FERREIRA, M. - *Óptica e fotónica*. Lidel-edições técnicas, Lisboa, 2003.
- [7] DANKIN, J.; CULSHAW, B. - *Optical-fiber sensors: principles and components*. Artech House, Boston, 1988.
- [8] THOMPON, R. C. - *Thin film optics*. Imperial college of Science, Technology and Medicine, 1999.
- [9] POENAR, D. P. - *Thin film, colour sensors*. Delft University Press, 1996. Tese de Doutoramento.
- [10] BLEANEY, P. I.; BLEANEY, B. - *Electricity and magnetism*. Clarendon Press, Oxford, 1959, p. 243-245.
- [11] <http://www.corning.com>
- [12] RIBEIRO, E. [et al.] - Surf. Coat. Technol. Vol. 515 (2002) p. 151-152.
- [13] *Optical properties of coating material*. SOPRA S.A., Web site: <http://www.sopra-sa.com/indices.htm>, 2000.
- [14] <http://www.sspectra.com>.
- [15] Biochemistry and Organic Reagents: for bioscience investigation. Sigma, 2002.
- [16] JUREK, A. M.; DANDRIDGE, A. - *Optical sources*. In **Optical fiber sensors**. DAKIN, J. P.; CLUSHAW, B. ed. Lit. Norwood, MA: Artech House (1988), Cap. 5, p. 151-187.
- [17] http://www.schott.com/optics_devices/english/products/filter/glass_filter.html.
- [18] CORREIA, J. H. - *Optical Microsystems in silicon based on a Fabry-Perot resonance cavity*. Delft University Press, 1999. Tese de Doutoramento.

- [19] MINAS, G. [et al.] - *Biosystem with 16 Highly-Selective Optical-Channels for Biological Fluids Analysis in the Visible Spectrum*. Proceedings of Transducers'03, Boston-USA, 8-12 de Junho de 2003, p. 1251-1254.
- [20] MINAS, G. [et al.] - *A 16 Fabry-Perot Optical-Channels Array for Biological Fluids Analysis using White Light*. Proceedings of Eurosensors XVII, Guimarães, Portugal, 21-24 de Setembro de 2003, p. 28-30.

5

Fotodetector e electrónica em tecnologia CMOS

Cada canal óptico tem um fotodetector, alinhado verticalmente com o filtro óptico, o qual permite medir a intensidade do feixe de luz transmitido através da mistura. O fotodetector, a electrónica de leitura do seu sinal e circuitos suplementares podem, todos eles, ser integrados num único *chip*, constituindo o sistema de detecção e leitura.

Este capítulo apresenta o motivo da escolha da tecnologia CMOS em silício para o fabrico do sistema de detecção e leitura. Seguidamente, discutem-se as opções disponíveis em tecnologia CMOS para o fotodetector. O capítulo termina com uma secção dedicada à electrónica de leitura e de conversão do sinal analógico vindo do fotodetector num sinal digital.

5.1 Tecnologia CMOS *standard* em silício

A tecnologia CMOS é, actualmente, a mais utilizada no fabrico de electrónica. Esta tecnologia ganhou popularidade devido ao seu baixo consumo de energia, à disponibilidade de integrar num *chip* ambos os transístores NMOS e PMOS e à área de silício necessária para um transístor ser normalmente menor, quando comparada, por exemplo, com a de um transístor bipolar equivalente [1]. O pequeno tamanho dos transístores favorece a integração a uma taxa muito elevada (VLSI - *Very Large Scale Integration*), na qual, actualmente, podem encontrar-se no fabrico de circuitos digitais

cerca de 14 milhões de transístores por centímetro quadrado (caso das memórias comercializadas pela INTEL).

Os circuitos analógicos em tecnologia CMOS têm tido uma incrível importância e desenvolvimento ao longo dos anos. Actualmente consegue-se integrar desde simples chaves a circuitos extremamente complexos num único *chip*. Mais ainda, esta tecnologia pode comportar várias estruturas fotossensíveis, nomeadamente fotodetectores. Com base nos pressupostos descritos a tecnologia CMOS parece ser a escolha mais apropriada para o fabrico dos fotodetectores integrados com a electrónica de leitura.

5.2 Fotodetectores em tecnologia CMOS

Na tecnologia CMOS *standard* com *n-well* são possíveis várias estruturas fotossensíveis para fotodíodos e fototransístores de junção. Podem ainda ser realizadas *photogates*, dependendo das características do processo escolhido (o material da gate deve ser altamente transmissivo, i.e., não deve ser um composto de silício ou metal) [2, 3]. Adicionalmente podem ainda ser realizados fotodíodos de avalanche. Contudo, estes não permitem a implementação no mesmo *chip* de circuitos electrónicos, uma vez que, normalmente, são polarizados com tensões de algumas dezenas de volts [1]. Neste trabalho discutir-se-ão apenas os fotodíodos verticais e o fototransístor vertical, uma vez que, pela análise realizada por Moini em [4], constatou-se serem esses os mais adequados para detecção de luz na gama visível do espectro electromagnético, mais precisamente entre 400 e 650 nm.

5.2.1 Fotodíodos em silício

Os três tipos de fotodíodos verticais são criados usando a junção *n-well / p-epilayer*, a junção *p+ / n-well*, e a junção *n+ / p-epilayer* (Figura 5.1). O princípio de operação destes três tipos de fotodíodos é idêntico. Apenas variam na profundidade da junção. Um fotodíodo usa o efeito fotoeléctrico [5] para converter luz numa corrente eléctrica, ou seja, converte fótons em pares electrão-lacuna. Esta conversão dá-se quando os fótons incidentes têm uma energia superior à largura de banda entre as bandas de condução e de valência (denominada de “*band gap energy*”), que no caso do silício é de 1.14 eV. Esses fótons incidentes são absorvidos por electrões na banda de valência, que, ao adquirirem energia são excitados para a banda de condução, deixando uma lacuna na banda de valência. Muitos dos electrões gerados na

banda de condução recombinam-se rapidamente com lacunas existentes na banda de valência. Por isso, é necessário remover os electrões gerados da banda de condução. Para tal, utiliza-se uma junção *pn* polarizada inversamente, dando origem a uma região que fica destituída de cargas móveis, conhecida por região de depleção. Verifica-se aí a existência de um campo eléctrico cujo sentido é tal que contraria a movimentação de cargas adicionais nessa região [6].

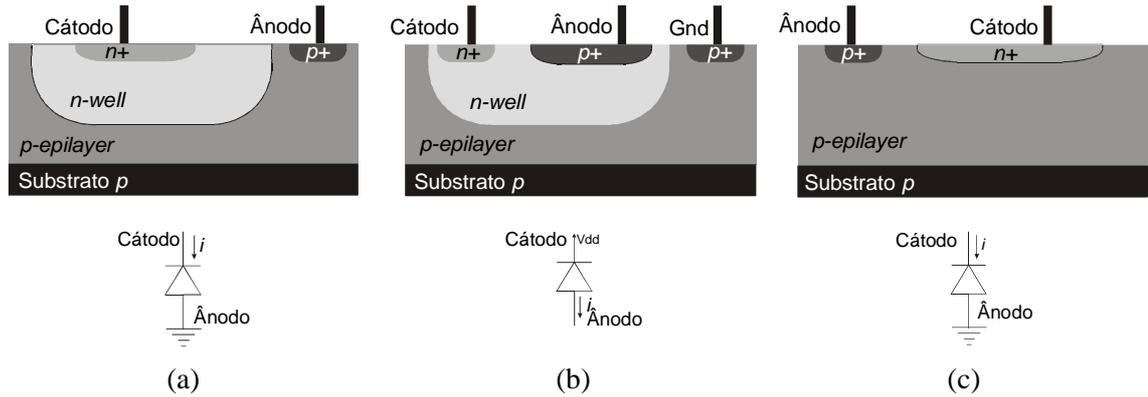


Figura 5.1: Vista em corte dos três tipos de fotodíodos em silício disponíveis na tecnologia CMOS *standard* com *n-well*: (a) *n-well / p-epilayer*; (b) *p+ / n-well*; (c) *n+ / p-epilayer*.

Os electrões gerados pela absorção de fotões, próximo ou dentro da região de depleção, são deslocados para a zona tipo *n*, antes que se possam recombinar na zona tipo *p*. A situação inversa acontece com as lacunas geradas. Este processo origina uma corrente eléctrica que é proporcional à intensidade da luz incidente [7],

$$I_p = \frac{q\eta\lambda P_i}{hc} \quad (5.1)$$

onde η é a eficiência quântica do fotodíodo, P_i é a potência óptica incidente, h é a constante de *Plank*, q é o valor da carga do electrão, λ é o comprimento de onda da luz e c é a velocidade da luz. A eficiência quântica é definida como,

$$\eta = \frac{\text{Taxa de geração de electrões}}{\text{Taxa de incidência de fotões}} \quad (5.2)$$

ou seja, é a probabilidade dos fotões gerarem pares electrão-lacuna que são recolhidos antes que se possam recombinar. Os fotodetectores são caracterizados pela eficiência quântica e pela sua responsividade. A primeira indica, basicamente, a capacidade do fotodetector absorver a luz incidente e, normalmente, é expressa em percentagem. É dependente do tipo de semiconductor, da profundidade da junção, da largura da camada

de depleção W_d , da distância entre a região do espaço de carga e o contacto óhmico L_d , dos revestimentos dieléctricos existentes sobre a superfície do silício, e da área fotossensível efectiva. Pode ser descrita por [8],

$$\eta = (1 - R) \left(1 - \frac{e^{-\alpha_{Si} W_d}}{\alpha_{Si} L_d + 1} \right) \quad (5.3)$$

onde R é a reflectância óptica da superfície do silício (caso existam camadas dieléctricas sobre o silício, R é a reflectância total da estrutura) e α_{Si} é o coeficiente de absorção do silício. A segunda, a responsividade de um fotodíodo, \mathfrak{R} (A/W), relaciona a corrente produzida I_p e a potência óptica incidente P_i ,

$$\mathfrak{R} = \frac{I_p}{P_i} = \frac{q\eta\lambda}{hc} \quad (5.4)$$

Características espectrais

A resposta espectral dos fotodetectores baseados em silício é afectada pela transmissão da luz incidente no silício, pela capacidade de geração de pares electrão-lacuna e pela capacidade de recolher esses pares antes que se possam recombinar. As duas últimas dependências já foram referidas nesta secção. A primeira, será abordada em seguida e depende dos parâmetros ópticos e da composição do silício.

A absorção da luz no silício, na gama visível do espectro electromagnético, é dependente do comprimento de onda. Radiações com comprimentos de onda baixos, i.e., fótons de elevada energia, são rapidamente absorvidos a pequenas profundidades e radiações com comprimentos de onda elevados, i.e., fótons de baixa energia, penetram muito mais profundamente no silício antes de serem absorvidos. Este efeito deve-se ao comprimento de onda da luz no silício ser fortemente dependente do coeficiente de absorção do silício, tal como ilustrado na Figura 5.2 [9], de tal forma que a profundidade de penetração da luz no silício $d(\lambda)$, seja dependente do comprimento de onda e expressa por,

$$d(\lambda) = \frac{1}{\alpha(\lambda)} \quad (5.5)$$

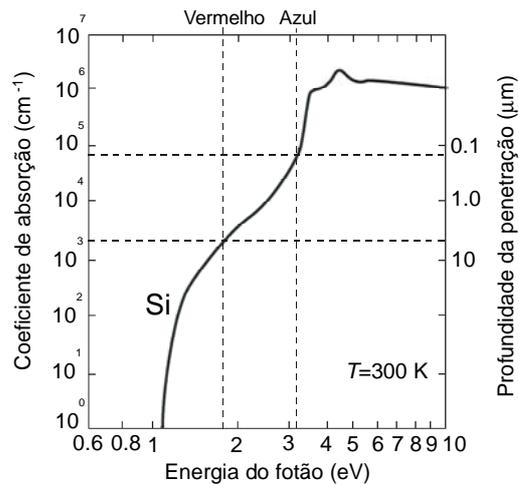


Figura 5.2: Coeficiente de absorção e profundidade da penetração da luz no silício.

Da Figura 5.2 conclui-se que os fótons incidentes com comprimento de onda de cerca de 400 nm (azul) são absorvidos dentro de uma camada até 0.1 μm abaixo da superfície do silício, enquanto que a luz vermelha a 600 nm penetra cerca de 10 μm no silício [10]. Este comportamento está relacionado com a probabilidade de fótons com uma determinada energia, excitarem um portador da banda de valência para a banda de condução. Fótons de elevada energia têm uma elevada probabilidade de excitarem um portador da banda de valência para a banda de condução e fótons de baixa energia têm uma baixa probabilidade de excitarem um portador da banda de valência para a banda de condução. Desta análise concluiu-se que os fotodetectores formados a partir de junções *pn* com profundidades diferentes terão respostas espectrais diferentes. Em [4] Moini deduziu a eficiência quântica em função do comprimento de onda para os três tipos de fotodíodos verticais da Figura 5.1. Na Figura 5.3 apresenta-se o gráfico dessa eficiência.

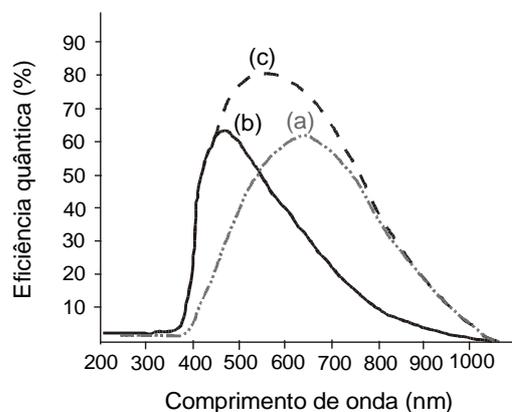


Figura 5.3: Eficiência quântica para os três tipos de fotodíodos verticais, apresentados na Figura 5.1 e fabricados em tecnologia CMOS *standard*. (a) *n-well / p-epilayer*; (b) *p+ / n-well*; (c) *n+ / p-epilayer* [4].

Corrente de fuga e outras fontes de ruído

Existem uma série de fontes de ruído inerentes ao processo de detecção de fótons que limitam a relação sinal/ruído à saída do fotodíodo. O ruído é caracterizado pela variância das flutuações da corrente eléctrica, em torno de um valor médio. A variância das flutuações da corrente eléctrica à saída do fotodetector devido ao ruído é a soma das variâncias associadas com cada fonte de ruído. Seguidamente, descreve-se de um modo sucinto algumas das fontes de ruído mais relevantes para este trabalho.

A corrente de fuga de um fotodíodo é a corrente existente mesmo quando este não está exposto à luz. Esta corrente depende de vários factores. Um deles é da tecnologia utilizada, i. e., das características da dopagem da junção. Outro factor é a sua dependência com a temperatura, que, para os fotodíodos de silício, aumenta uma ordem de grandeza se a temperatura aumenta 30 °C. Por fim, a corrente de fuga aumenta com o aumento da tensão de polarização inversa, devido ao aumento da largura da camada de depleção [11].

Outra fonte de ruído de um fotodíodo é o chamado “ruído quântico”. Este deve-se ao facto de a corrente eléctrica gerada ser constituída por pacotes de cargas discretos que são gerados aleatoriamente. Mesmo quando um fotodíodo é iluminado por uma potência óptica constante, devido ao carácter aleatório da geração de pares electrão-lacuna, a corrente flutua em torno de um valor médio. O ruído quântico é aleatório com um valor médio nulo e com uma variância dada por [12],

$$\sigma_q^2 = 2qI_s BW \quad (5.6)$$

onde q é a carga do electrão, I_s é a corrente média gerada pelo sinal e BW é a largura de banda eléctrica do fotodíodo na qual o ruído é detectado. A largura de banda do fotodíodo depende do tempo de trânsito dos portadores gerados ao longo da região de depleção, dos portadores gerados fora da região de depleção e da resposta em frequência do circuito eléctrico, constituído pela capacidade da junção e pela resistência de carga utilizada para polarizar o fotodíodo. Existe um compromisso entre a resposta em frequência e a responsividade do fotodíodo. Se a espessura da zona de depleção for pequena, a resposta em frequência aumenta mas diminui a potência absorvida e, consequentemente, também a responsividade.

Outra fonte de ruído é o chamado “ruído de padrão fixo” e define-se como sendo a variação da resposta entre fotodíodos adjacentes. Esta variação é dominada pela área dos fotodíodos (inversamente proporcional à área). Numa tecnologia CMOS *standard*,

este ruído é controlado pela relação entre as dimensões do fotodíodo e as dimensões mínimas do processo litográfico. Uma vez que essa relação é elevada (geralmente superior a 10), o ruído de padrão fixo, normalmente, representa menos de 1% do ruído total produzido por um fotodíodo [7].

5.2.2 Fototransísttor em silício

O fototransísttor bipolar de junção vertical pode ser criado usando as junções $p^+ / n\text{-well} / p\text{-epilayer}$ (Figura 5.4). Variantes desta estrutura podem ser consultadas em [13]. O fototransísttor vertical usa, tal como os fotodíodos, o efeito fotoeléctrico para converter fotões em pares electrão-lacuna. Estes pares são separados e reunidos usando uma junção pn inversamente polarizada muito próxima de uma junção pn directamente polarizada. Tal como num fotodíodo, a radiação incidente na junção pn inversamente polarizada, i.e., a junção colector-base, causa uma corrente eléctrica que é proporcional à intensidade da luz incidente. À medida que essa corrente entra na região da base do transísttor é multiplicada por β , o ganho em corrente do transísttor. Como β é tipicamente muito maior que um, o fototransísttor pode ter uma eficiência quântica maior que um [4].

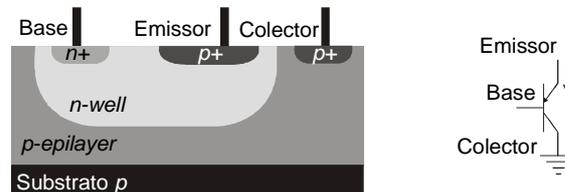


Figura 5.4: Vista em corte do fototransísttor bipolar de junção vertical em silício disponível na tecnologia CMOS *standard* com *n-well*.

Características espectrais

As características espectrais do fototransísttor são dominadas pelos mesmos efeitos descritos na secção anterior para os fotodíodos, ou seja, a profundidade da junção. A eficiência quântica em função do comprimento de onda para um fototransísttor pnp fabricado em tecnologia CMOS *standard*, foi descrita em [4] e apresenta-se na Figura 5.5. Como se pode observar, devido ao ganho em corrente do fototransísttor, a eficiência quântica é maior que 100%.

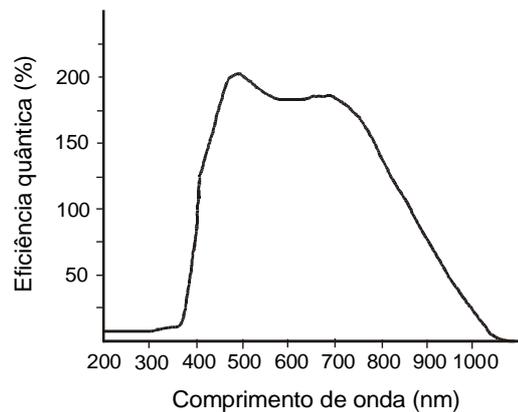


Figura 5.5: Eficiência quântica para o fototransistor *pnp*, apresentado na Figura 5.4 e fabricado em tecnologia CMOS *standard* [4].

Corrente de fuga e outras fontes de ruído

A corrente de fuga de um fototransistor é o resultado da polarização inversa da junção base-colector. Esta corrente é multiplicada por β e a corrente de emissor resultante é a corrente de fuga total do fototransistor. Como β é tipicamente maior que um, essa corrente será maior que a de um fotodíodo com a mesma área.

O ruído quântico de um fototransistor é traduzido pelo ruído quântico em cada junção díodo. A sua variância, no emissor, é dada por,

$$\sigma_q^2 = 2qI_s BW(\beta + 1) \quad (5.7)$$

Comparando as expressões (5.6) e (5.7), o ruído quântico de um fototransistor é maior ($\beta + 1$) do que num fotodíodo com a mesma área.

Relativamente ao ruído de padrão fixo, também este é superior no fototransistor, uma vez que o β pode variar cerca de 20% de transistor para transistor (ainda que sejam fabricados na mesma série de fabrico). Esta variação é causada por um deficiente controlo da largura da base e pelo facto do β ser extremamente sensível a variações de temperatura [7].

5.2.3 Fotodíodos *versus* fototransistor

Os fotodíodos apresentam menor corrente de fuga e menor ruído por unidade de área do que o fototransistor. Se for necessária uma disposição em matriz, os fotodíodos são mais adequados, uma vez que têm menor ruído de padrão fixo e são mais facilmente

reprodutíveis que os fototransístores. A vantagem do fototransístor face aos fotodíodos é a maior eficiência quântica. Contudo, para níveis de luz baixos, em que a corrente do emissor do fototransístor é baixa ($\leq 100 \text{ pA}$), a sua eficiência quântica torna-se aproximadamente igual à dos fotodíodos, devido ao β ser uma função decrescente da corrente do emissor [14].

5.3 Projecto do fotodíodo em silício

Da secção anterior conclui-se que os fotodíodos apresentam menor ruído por unidade de área do que os fototransístores. Por isso, neste trabalho, será utilizado um dos três tipos de fotodíodos verticais apresentados na Figura 5.1. Qualquer um deles tem uma estrutura que se enquadra dentro da tecnologia CMOS *standard* com *n-well* e podem ser fabricados usando apenas as camadas disponíveis desse processo, sem passos adicionais compatíveis.

5.3.1 Escolha do fotodíodo

Da Figura 5.3 apresentada na secção anterior conclui-se que, para um determinado comprimento de onda, cada um dos três fotodíodos verticais tem uma eficiência quântica diferente, de acordo com a profundidade das suas junções. Num processo de fabrico *standard*, tanto a profundidade da junção como as características das dopagens são fixas. Dessa mesma Figura 5.3 conclui-se ainda que o fotodíodo *n+ / p-epilayer* será o mais adequado para este trabalho, uma vez que se pretende uma maior eficiência quântica entre 500 nm a 600 nm, de acordo com o projecto dos filtros ópticos. A resposta espectral para os três tipos de fotodíodos verticais foi simulada com os parâmetros do processo de fabrico utilizado (esses parâmetros são os valores de energia e doses utilizadas nas dopagens). Para tal, utilizaram-se os programas SUPREM-IV.GS e PISCES-IIB de *Standford*. Os resultados dessa simulação encontram-se descritos em [15] e apresentam-se na Figura 5.6. Conclui-se, mais uma vez, que o fotodíodo *n+ / p-epilayer* é o mais adequado. Apesar deste fotodíodo ter uma junção superficial, ele apresenta uma melhor resposta espectral na gama de comprimentos de onda pretendida devido à concentração da dopagem entre o lado *n* e o lado *p* ser bastante diferente, o que estende a zona de depleção mais profundamente do lado *p*. A curva do fotodíodo *p+ / n-well* apresenta também uma boa resposta na gama espectral do vermelho ($\approx 600 \text{ nm}$) devido à influência da sua outra junção *n-well / p-epilayer* [15].

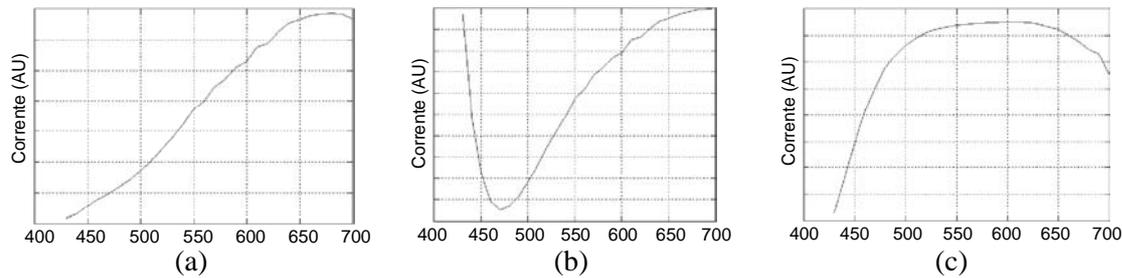


Figura 5.6: Resposta espectral dos três tipos de fotodíodos verticais de acordo com os parâmetros da tecnologia CMOS *standard* com *n-well* utilizada no fabrico. (a) *n-well / p-epilayer*; (b) *p+ / n-well*; (c) *n+ / p-epilayer* [15].

5.3.2 Estrutura do fotodíodo

A resposta espectral de um fotodíodo é ainda afectada pelas camadas dieléctricas da tecnologia CMOS, que podem estar presentes por cima da junção *pn* do fotodíodo. Elas actuam como uma estrutura multicamada de filmes finos e influenciam a transmitância óptica para cada comprimento de onda independentemente. Então, as espessuras e as propriedades ópticas dessas camadas devem ser estáveis e bem conhecidas, uma vez que a resposta espectral do fotodíodo dependerá dessas características.

Na tecnologia CMOS *standard* utilizada existem 3 camadas dieléctricas que se encontram por cima da junção *pn* do fotodíodo. A Figura 5.7 apresenta a estrutura básica do fotodíodo. A espessura da camada *n+* é de 350 nm e a profundidade da *epilayer* de 12 μm , com uma concentração de dopagem de 10^{16} átomos/ cm^3 [16]. A espessura do primeiro óxido (BPSG – *Boron Phosphor Silicate Glass*) por cima do díodo é de 700 nm e a do segundo óxido (SiO_2) é de 800 nm. A camada de passivação de nitrato de silício (Si_3N_4), usada para protecção, é de 800 nm. Estes são os valores nominais definidos pela fundição, os quais têm uma tolerância de $\pm 10\%$. Uma vez que têm que ser cumpridas as regras da tecnologia do processo CMOS *standard*, a estrutura do caminho óptico é restrita a combinações dessas 3 camadas dieléctricas. É necessário, portanto, verificar o efeito dessas camadas.

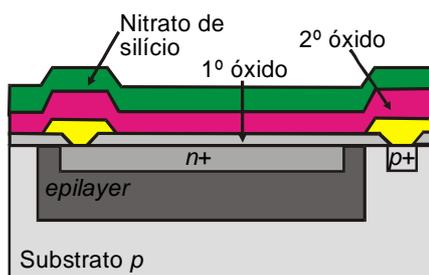


Figura 5.7: Estrutura básica do fotodiodo quando fabricado em tecnologia CMOS *standard* com *n-well* e duplo metal.

5.3.3 Simulação da resposta espectral do fotodiodo com as camadas dieléctricas da tecnologia CMOS *standard*

A simulação da transmissão óptica para as combinações das 3 camadas dieléctricas que se encontram por cima da junção *pn* do fotodiodo ilustra-se na Figura 5.8. A simulação indica que quando não existe nenhuma camada, a interface ar-silício apresenta uma elevada perda em transmissão. Com uma camada de óxido de espessura de 700 nm (1º óxido) a transmissão aumenta de 50% para 60% a 550 nm, mas, por outro lado, introduz-se uma dependência do comprimento de onda. Com uma combinação de camadas anti-reflectoras poder-se-ia otimizar a transmitância. Contudo, esta solução obrigaria a um pós-processamento adicional ao processo CMOS *standard*, o que prejudicaria economicamente o microssistema. Em conclusão, a melhor opção neste processo de fabrico sem passos adicionais, seria retirar todas as camadas dieléctricas que se encontram por cima do fotodiodo. Ao nível do projecto, este procedimento é realizado no desenho das máscaras que definem os contactos para os dois metais, não sendo portanto necessários, nem máscaras, nem passos adicionais ao processo de fabrico *standard*.

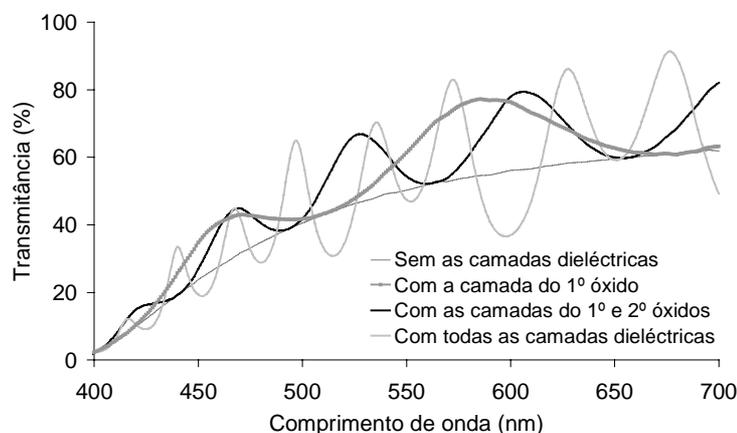


Figura 5.8: Simulação da resposta espectral das combinações típicas das camadas dieléctricas que se encontram por cima do fotodiodo.

5.4 Electrónica de leitura e de conversão

Os fotodetectores produzem uma corrente eléctrica proporcional à intensidade da luz por eles absorvida. É desejável integrar com os fotodetectores a electrónica de leitura e de conversão dessa corrente num sinal digital para posterior aquisição e tratamento de dados. Um conversor luz – frequência produz a partir da corrente dos fotodetectores um trem de impulsos com uma frequência proporcional a essa fotocorrente. A Figura 5.9 ilustra o princípio de funcionamento do conversor, para um canal óptico (um fotodíodo).

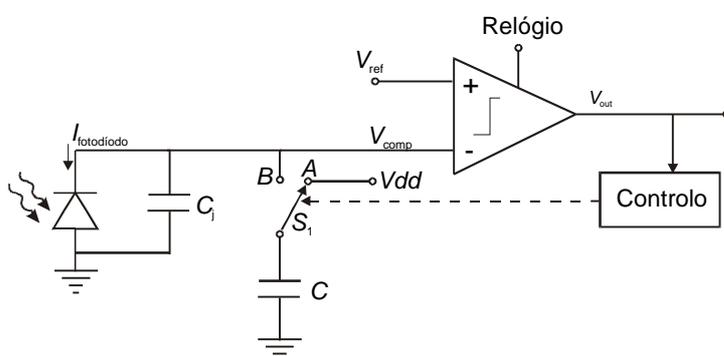


Figura 5.9: Diagrama de blocos do conversor luz – frequência para um canal óptico.

Com a tensão V_{comp} menor que a tensão V_{ref} a tensão de saída do comparador V_{out} , encontra-se num nível lógico alto. Após a sincronização com um impulso de relógio a chave S_1 é comutada para a posição A o que força o condensador C a ser carregado com a tensão V_{dd} durante um período de relógio. Passado este tempo, liga-se a chave S_1 na posição B, pelo que a tensão de saída do comparador comuta para o nível lógico baixo ($V_{dd} > V_{ref}$). A fotocorrente descarrega então o condensador C até que o comparador detecte que a tensão V_{comp} é menor que a tensão V_{ref} , altura em que V_{out} regressa ao nível lógico alto (ver Figura 5.10). O processo repete-se e a frequência do trem de impulsos gerado é função da variação da carga do condensador ΔQ , que por sua vez depende da corrente do fotodíodo $I_{fotodíodo}$, sendo definida por,

$$f_{\text{trem de impulsos}} = \frac{I_{\text{fotodíodo}}}{\Delta Q} \quad (5.8)$$

Na Figura 5.11 apresenta-se o diagrama de blocos do conversor luz – frequência para os quatro canais ópticos. O fotodíodo 1 mede a intensidade de luz que passa através do reagente (sem biomoléculas). O fotodíodo 2 mede a intensidade da luz que passa através do fluido em análise. O fotodíodo 3 fornece o valor da corrente de fuga. Para tal,

é colocada uma camada de metal por cima da sua área activa. O valor da corrente de fuga pode ser subtraído ao valor das correntes dos fotodíodos de forma a desprezar esta fonte de ruído. O fotodíodo 4 mede a intensidade de luz que passa através de um calibrador de concentração conhecida.

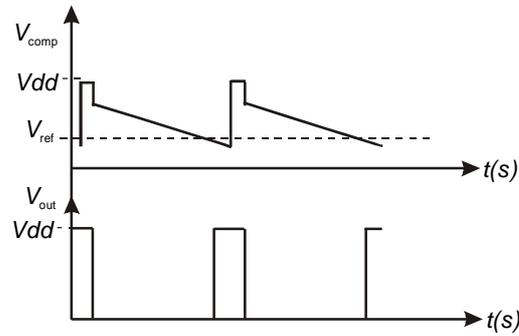


Figura 5.10: Formas de onda da tensão na entrada e na saída do comparador.

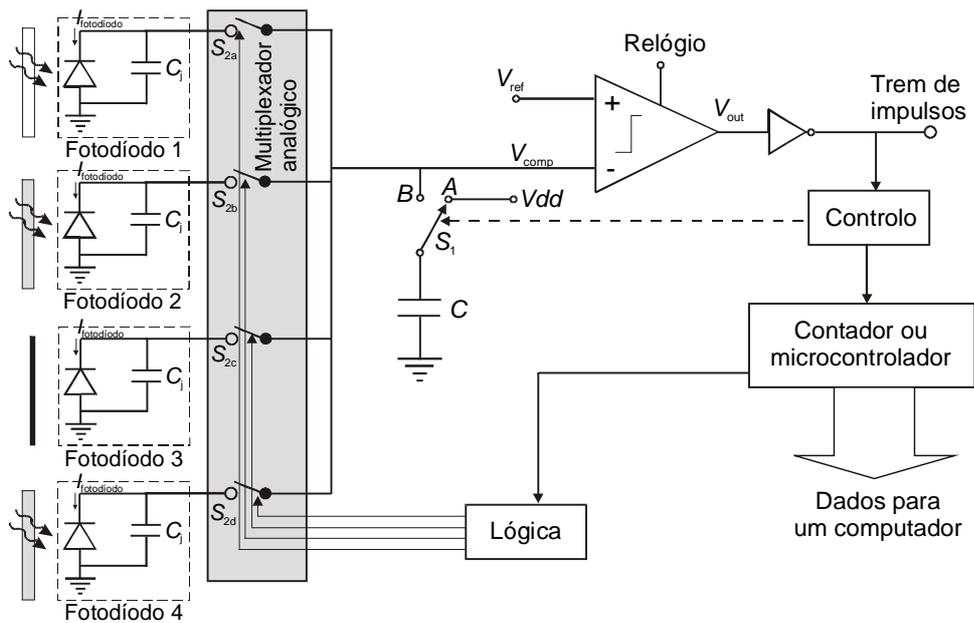


Figura 5.11: Esquema do conversor luz - frequência para os quatro canais ópticos.

O multiplexador analógico selecciona qual o fotodíodo a medir, através das chaves S_{2a} - S_{2d} . Para o comparador, a melhor opção foi um comparador com relógio de duas fases de elevada velocidade, com baixo *offset* e com um estágio de entrada *rail-to-rail*. O relógio de duas fases sem sobreposição é comum ao comparador e à chave analógica S_1 . É possível utilizar um contador digital que conta os impulsos de saída do comparador durante um período de tempo fixo, produzindo assim os valores digitais correspondentes às intensidades das fotocorrentes. Em alternativa, pode ser

utilizado um microcontrolador que para além de substituir o contador permitiria gerar toda a lógica de controlo e executar cálculos adicionais. Os esquemas detalhados do conversor luz – frequência encontram-se no Anexo IV.

5.5 Conclusão

Neste capítulo descreveu-se o funcionamento e implementação do fotodetector e da electrónica de leitura e conversão necessária para a converter o sinal analógico num sinal digital para aquisição e processamento de dados. A tecnologia CMOS *standard* em silício foi a escolhida para o fabrico, devido à sua disponibilidade e à possibilidade de integrar num único *chip* o fotodetector e inúmeras funções electrónicas. A escolha da estrutura do fotodetector dependeu não só dos requisitos da aplicação mas também do tipo específico de tecnologia de silício escolhida para o fabricar. De entre os fotodetectores disponíveis na tecnologia CMOS *standard* com *n-well* o fotodíodo *n+ / p-epilayer* foi o escolhido pelo facto de possuir maior eficiência quântica nos comprimentos de onda pretendidos (500 nm a 600 nm) e, face ao fototransístor vertical, menor ruído por unidade de área. A electrónica de leitura e de conversão é realizada com um conversor luz - frequência. Este conversor produz a partir da corrente dos fotodetectores um trem de impulsos cuja frequência é proporcional à corrente de entrada. Esse sinal digital possibilita assim a aquisição e processamento de dados num microcontrolador ou computador.

Bibliografia

- [1] MONTEIRO, D. W. de Lima - *CMOS-based integrated wavefront sensor*. Delft University Press, Delft, The Netherlands, 2002. Tese de Doutoramento.
- [2] FOSSUM, E. [et al.] - *A 256×256 active pixel image sensor with motion detection*. ISSCC95 Technical Digest, 1995.
- [3] DICKINSON, A. [et al.] - *CMOS digital camera with parallel analog-to-digital conversion architecture*. IEEE Workshop on Charge Coupled Devices and Advanced Image Sensors, April 1995.
- [4] MOINI, A. - *Vision Chips*. Kluwer Academic Publishers, 2000.
- [5] HENCHT, E. - *Óptica*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1991.

- [6] FERREIRA, M. - *Óptica e fotónica*. Lidel-edições técnicas, Lisboa, 2003.
- [7] FOWLER, B. - *CMOS area image sensors with pixel level A/D conversion*. Standford University, Outubro, 1995. Tese de Doutoramento.
- [8] SZE, S. M. - *Physics of semiconductors devices*. 2ª ed., John Wiley & Sons, New York (1981) p. 74-79.
- [9] PHILIP, H. R.; TAFT, E. A - *Optical constants of silicon in the region 1 to 10 eV*. Physics Review. Vol. 120 (1960), p. 37-38.
- [10] WOLFFENBUTTEL, R. F. - *Silicon photodetectors with a selective spectral response*. Sensors Update. Vol. 9. BALTES, H.; HESSE, J.; KORVINK, J. ed. lit. Wiley-VCH, (2001) p. 69-101.
- [11] FUKUDA, M. - *Optical Semiconductor Devices*. John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [12] OLSSON, A. A. - *Lightwave Systems With Optical Amplifiers*. OSA/IEEE Journal of Lightwave Technology. Vol. 7, nº 7 (1989) p. 1071-1082.
- [13] SANDAGE, R. W.; CONNELLY, J. - *Producing phototransistors in a standard digital CMOS technology*. IEDM Technical Digest (1996), p. 369-372.
- [14] MULLER, R. S.; KAMINS, T. I. - *Device electronics for integrated circuits*. John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [15] ROCHA, J. G. - *Microdetectors de silício baseados em cintiladores para radiografia digital*. Universidade do Minho, Guimarães (2003), p. 84-86. Tese de Doutoramento.
- [16] SCHOT, K.; WIND, D. - *DIMOS01*. TUDELFT, DIMES, 1995.

6

Fabrico do Microlab

Neste capítulo descreve-se o fabrico dos três módulos que constituem o Microlab: o sistema de microfluidos, o sistema de filtragem óptica e o sistema de detecção e leitura. O fabrico implica uma série de tarefas e desafios e a necessidade de fazer escolhas sensatas, baseadas na avaliação das vantagens e desvantagens das diferentes tecnologias. Incluem-se ainda os esquemas e as fotografias de cada módulo e uma fotografia do Microlab.

6.1 Sistema de microfluidos

O sistema de microfluidos é composto por duas lamelas de vidro *Corning 7059*, cada uma com 500 μm de espessura. A primeira lamela tem os orifícios para a injeção e a remoção dos fluidos dos canais e a segunda inclui os canais (Figura 6.1). O Microlab contém basicamente três canais. Um deles permite obter a linha de referência. Outro destina-se ao fluido a analisar e possui duas entradas e uma saída para permitir a mistura do fluido com o reagente de forma automática. Por fim, o terceiro canal é necessário para calibrar a concentração da biomolécula a medir (com um padrão de concentração conhecida) e para calibrar a fonte de luz. Foi escolhido o vidro devido à sua transparência óptica na zona visível do espectro electromagnético e por ser um material isolador. Esta última característica permite usar o princípio da electroforese/electroosmose para mover os fluidos, evitando assim a construção de bombas ou válvulas. Relembre-se que, no presente trabalho, a mistura é realizada por difusão, pelo que não é necessário aplicar-se esse princípio.

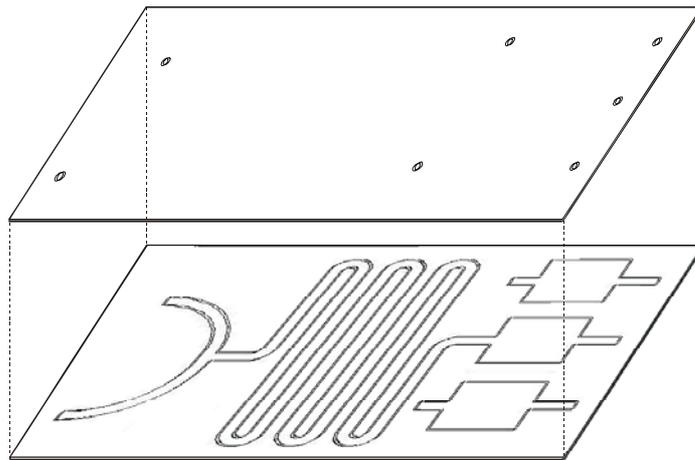


Figura 6.1: Esquema do sistema de microfluidos.

Os orifícios e os canais são micromaquinados com uma máquina CNC (Comando Numérico por Computador) no Departamento de Electrónica Industrial (DEI) da UM (Figura 6.2) [1]. Foram utilizadas técnicas de furação para construir os orifícios e técnicas de fresagem para construir os canais, com passivação SiO_2 para diminuir a rugosidade. Seguidamente, as duas lamelas são coladas (Figura 6.3). A utilização destas técnicas de fabrico levou a que o formato do canal misturador fosse em zig-zag e não com curvas. Além disso, o tamanho mínimo conseguido da fresa para vidro foi de 1 mm, pelo que a largura dos canais é de 1 mm. Se se utilizasse polistireno os canais apresentariam mais rugosidade o que prejudicaria a medição óptica. Analisando os prós e contras o vidro parece ser a melhor opção, tendo em conta o processo de fabrico e a aplicabilidade do Microlab.

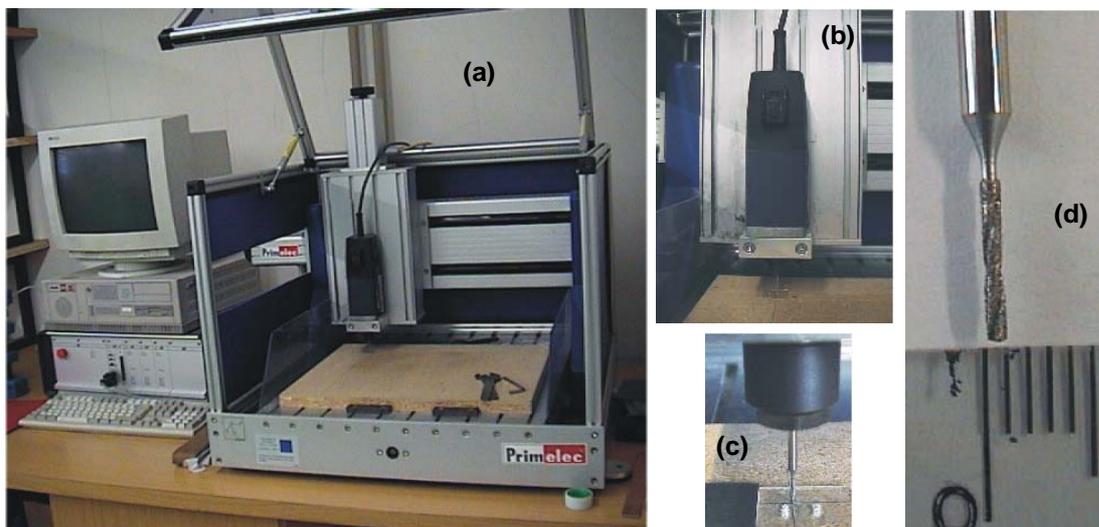


Figura 6.2: (a) Fotografia da máquina CNC; (b) berbequim; (c) ampliação da zona da fresa no berbequim; (d) fresa utilizada para vidro.

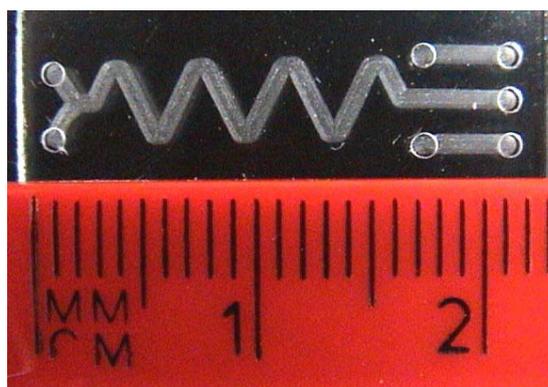


Figura 6.3: Fotografia do sistema de microfluidos.

6.2 Sistema de filtragem óptica

6.2.1 Processo de deposição

Os filtros ópticos baseados em filmes finos podem ser depositados por técnicas denominadas de “PVD” (*Physical Vapor Deposition*), tais como o sistema de pulverização catódica reactiva em magnetrão (*reactive magnetron sputtering*) ou o sistema de deposição por feixe de iões (IBD – *Ion Beam Deposition*). O processo de deposição deve ser monitorizado e controlado com bastante cuidado para se obterem camadas com boa uniformidade e com uma espessura o mais aproximada possível à pretendida.

Neste trabalho foi utilizado o sistema de deposição por feixe de iões do INESC-MN, Lisboa, Portugal. O sistema compreende uma fonte de iões integrada com um sistema de *sputtering* para pré-limpeza, a limpeza *in-situ*, o *etching* e a deposição assistida. Esta última possibilita o fabrico de filmes finos de elevada qualidade. Esta técnica apresenta vantagens, nomeadamente: bom controlo das condições de deposição e das taxas de deposição, o que possibilita uma boa uniformidade dos filmes e uma espessura precisa; elevada adesão, baixa porosidade e baixos níveis de contaminação; reduzidas tensões nos filmes (por ser uma técnica fria). As deposições são realizadas a partir de alvos de Ti e SiO₂ de elevada pureza (99.90% e 99.99%, respectivamente). A uniformidade relativa da deposição é de 2% numa área de 10 cm² [2]. O equipamento encontra-se numa sala limpa, juntamente com outros que permitem a caracterização dos filmes e que são imprescindíveis para a determinação das constantes ópticas a introduzir no *software* de simulação dos filmes finos.

6.2.2 Configuração das máscaras

Na secção 4.8.3 foram descritas as espessuras das camadas para a construção da matriz de 16 filtros ópticos passa-banda com a estrutura de multicamadas de filmes finos (tabela 4.5, secção 4.8.3). Concluiu-se então que bastava variar a espessura da camada 6 para se obterem os 16 filtros ópticos. A Tabela 6.1 apresenta os valores das diferentes espessuras, assim como o número do filtro óptico para posterior localização na matriz e o comprimento de onda para o qual cada filtro óptico apresenta o valor máximo de transmitância (que corresponde ao máximo de absorvência da biomolécula em análise).

Tabela 6.1: Espessura da camada 6 de SiO₂ com o respectivo número do filtro óptico para posterior localização na matriz e o comprimento de onda do seu máximo de transmitância.

Número do filtro óptico	Espessura da camada 6 de SiO ₂ (nm)	Comprimento de onda do máximo de transmitância do filtro óptico (nm)
1	140	480
2	146	488
3	152	495
4	158	503
5	164	512
6	170	520
7	176	528
8	182	536
9	188	544
10	194	552
11	200	560
12	206	568
13	212	575
14	218	583
15	224	591
16	230	600

Na Figura 6.4 apresenta-se a localização de cada filtro óptico na matriz. Os filtros são fabricados com apenas 4 máscaras. A área de cada filtro óptico depende da área dos fotodetectores (neste caso é de 500 µm × 500 µm). As espessuras das camadas e a disposição de cada filtro óptico na matriz foram optimizadas para minimizar o número de máscaras. A Figura 6.5 ilustra o esquema e a configuração das 4 máscaras utilizadas na deposição da camada 6, assim como o tempo de deposição e a espessura depositada. Note-se ainda que, se os filtros ópticos forem depositados directamente sobre o sistema de microfluidos, deve existir uma máscara adicional com a configuração

do esquema da Figura 6.4 na deposição de todas as camadas, à excepção da camada 6, uma vez que esta possui máscaras específicas. As máscaras podem ser fabricadas por litografia ou podem ser de alumínio. Na deposição por IBD a utilização de máscaras de alumínio permite que os 16 filtros ópticos sejam fabricados sem a abertura da câmara de deposição. O sistema possui uma espécie de gancho, de posição controlável, pelo que todas as máscaras podem ser realizadas num mesmo substrato de alumínio.



Figura 6.4: Posição de cada filtro óptico na matriz.

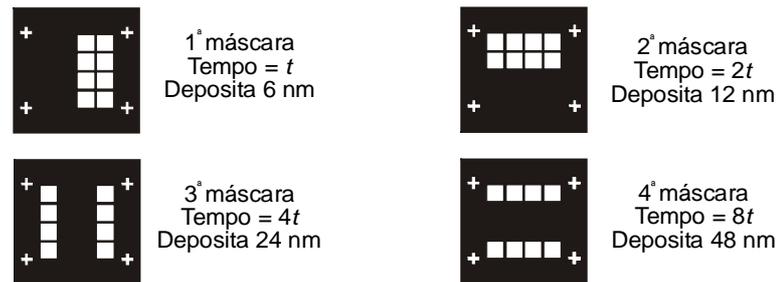


Figura 6.5: As 4 máscaras utilizadas no processo de deposição da camada 6 de SiO_2 para os 16 filtros ópticos construídos com multicamadas de filmes finos. Cada máscara é utilizada com tempos de deposição diferentes, de forma a depositar uma espessura diferente de SiO_2 . As cruces são marcas para o alinhamento das máscaras.

6.2.3 Sequência de fabrico

O fabrico dos filtros ópticos começa com a deposição de 45 nm de TiO_2 em toda a matriz (camada 1). A Tabela 6.2 é uma versão simplificada da Tabela 4.5 e especifica as espessuras e os materiais de cada camada. Seguidamente depositam-se as camadas 2 a 5, novamente em toda a matriz. Posteriormente é depositada uma camada com a espessura de 140 nm de SiO_2 que corresponde à espessura mínima da camada 6 (filtro número 1). A Figura 6.6(a) ilustra o processo até esta fase. Em subsequentes passos de deposição, para cada um dos quais é utilizada uma máscara e tempos de deposição diferentes (ver Figura 6.5), a espessura total da camada 6 de SiO_2 aumenta de 140 nm

para 230 nm em passos de 6 nm. Formam-se assim os 16 filtros ópticos, cada um com uma espessura diferente na camada 6.

Tabela 6.2: Materiais, espessura e sequência de deposição de cada camada da matriz de 16 filtros ópticos.

Número do Filtro	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Camada	Material																
	Espessura das Camadas (nm)																
1	TiO ₂																
2	SiO ₂																
3	TiO ₂																
4	SiO ₂																
5	TiO ₂																
6	SiO ₂	140	146	152	158	164	170	176	182	188	194	200	206	212	218	224	230
7	TiO ₂																
8	SiO ₂																
9	TiO ₂																
10	SiO ₂																
11	TiO ₂																

A Figura 6.6 ilustra o processo completo, o qual merece uma explicação detalhada. Uma vez construída a estrutura da Figura 6.6(a), a máscara número 1 é utilizada durante um intervalo de tempo de deposição t , para se depositar 6 nm e formar a estrutura da Figura 6.6(b), na qual se observa 2 zonas de espessuras diferentes. Seguidamente a máscara número 2 é utilizada durante um intervalo de tempo de deposição $2t$, depositando-se 12 nm e formando a estrutura da Figura 6.6(c), na qual se observa 4 zonas de espessuras diferentes. Ao aplicar-se a 3ª máscara durante um intervalo de tempo de deposição $4t$, deposita-se 24 nm e forma-se a estrutura da Figura 6.6(d), na qual se observa 8 zonas de espessuras diferentes. Por fim, utiliza-se a máscara número 4 durante um intervalo de tempo de deposição $8t$, depositando-se 48 nm, o que resulta na estrutura final da camada 6 dos 16 filtros ópticos (Figura 6.6(e)). Em conclusão, com este processo formam-se 2^N canais em que N é o número de máscaras que é necessário utilizar. Após a total deposição da camada 6, são depositadas as camadas 7 a 11 com os materiais e espessuras referidas na Tabela 6.2 (Figura 6.6(f)).

O fabrico dos 16 filtros ópticos requer apenas 4 máscaras e 15 deposições (11 camadas mais 4 passos com 4 máscaras). Os filtros ópticos podem ser afinados para diferentes bandas espectrais apenas pelo ajuste da camada 6 (neste caso de SiO₂), sem se alterar a estrutura do Microlab. Se se pretendesse fabricar a estrutura multicamada descrita na Tabela 4.6 e Figura 4.19, o processo seria bastante similar, necessitando de igual modo de 4 máscaras e 15 deposições. No Anexo V descreve-se este processo.

Da matriz de 16 filtros ópticos apenas o número 3 (Tabela 6.2) foi fabricado. Utilizou-se o método IBD numa lamela separada de vidro *Corning 7059*.

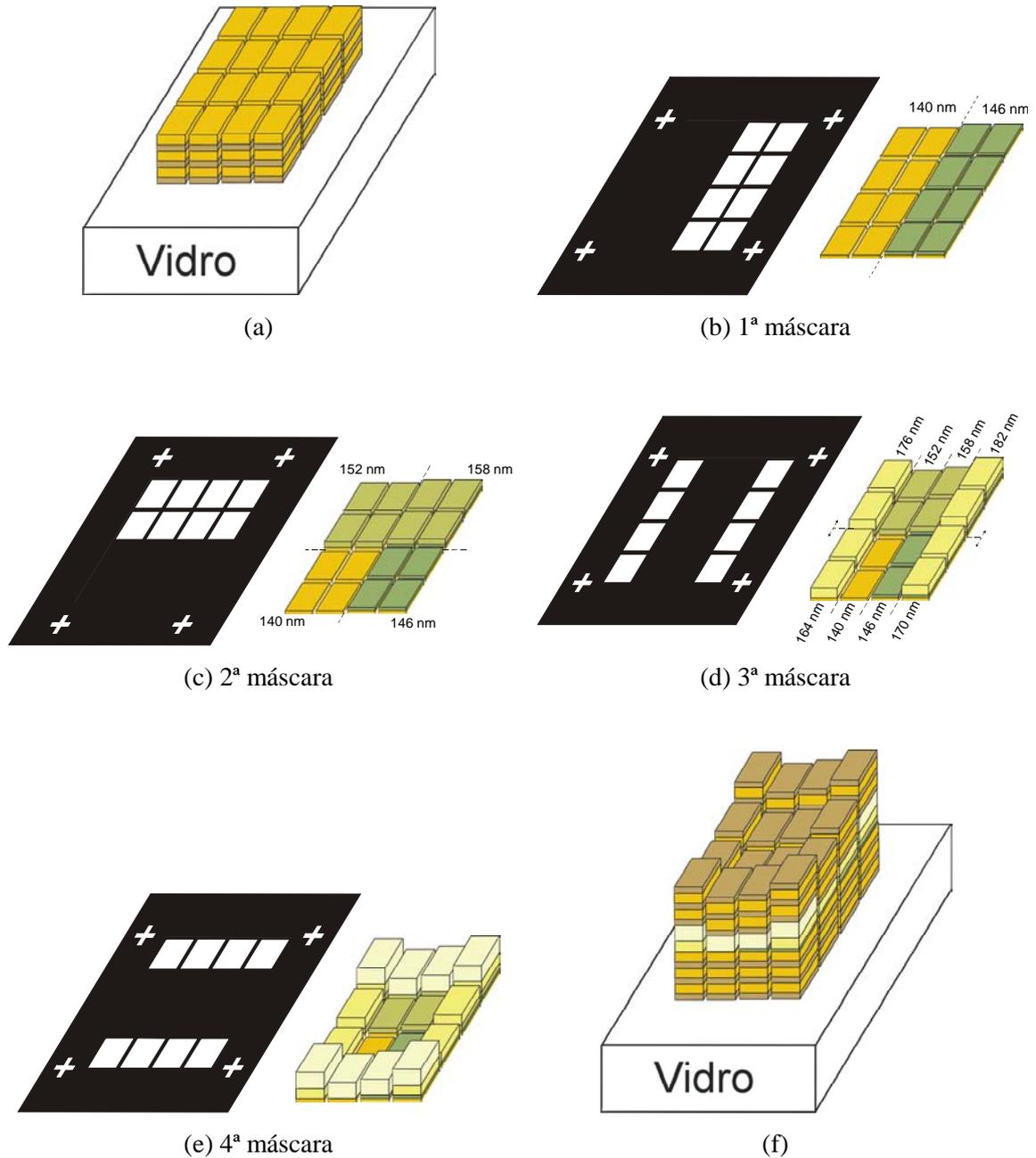


Figura 6.6: Sequência de fabricação da matriz de 16 filtros ópticos construídos com multicamadas de filmes finos; (a) estrutura com as 5 primeiras camadas e a 6ª camada com a espessura mínima; (b) aplicando a 1ª máscara, duas espessuras diferentes da camada 6 são obtidas; (c) aplicando a 2ª máscara, quatro espessuras diferentes da camada 6 são obtidas; (d) aplicando a 3ª máscara, oito espessuras diferentes da camada 6 são obtidas; (e) aplicando a 4ª máscara, as dezesseis espessuras diferentes da camada 6 são obtidas; (f) estrutura global da matriz de 16 filtros ópticos. Por simplicidade, nas figuras b, c, d, e, ilustrou-se apenas a camada 6.

Na construção de uma estrutura multicamada de filmes finos, o apuramento das taxas de deposição de cada material é um processo demorado e iterativo. Um dos problemas que surgiu merece especial destaque. Através da deposição de uma monocamada de TiO_2 e outra de SiO_2 e após a medição das espessuras e respectivos índices de refração, procedeu-se à realização de duas multicamadas (filtros números 3 e 8). Contudo, constatou-se através de medições no profilómetro e medições ópticas, que a espessura total tinha apenas 56% do valor pretendido. Verificou-se que o problema residia na deposição do TiO_2 que fazia a corrosão das camadas já depositadas. Foi por isso necessário alterar os parâmetros de controlo da deposição e medir a espessura e as características ópticas da estrutura no final de cada deposição (11 vezes, neste caso), para se apurarem as novas taxas de deposição. O processo de caracterização de um material é pois demorado e dispendioso.

6.3 Sistema de detecção e leitura

Os fotodetectores em CMOS e a electrónica de leitura foram fabricados na fundição do DIMES (*Delft Institute for MicroElectronics and Sub-micron Technology*), Delft, Holanda, segundo a tecnologia CMOS *standard* com *n-well*, de duplo metal, de uma camada de polisilício e de 1.6 μm de largura de canal [3]. Cada fotodetector (fotodíodo) tem uma área activa de 500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$. Neste processo de fabrico existem 3 camadas dieléctricas que se encontram por cima da junção *pn* do fotodíodo (Figura 6.7). Uma vez que têm que ser cumpridas as regras da tecnologia CMOS *standard*, a estrutura do caminho óptico é restrita a combinações dessas 3 camadas.

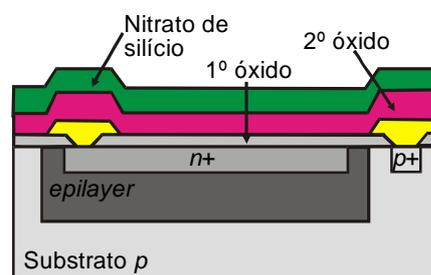


Figura 6.7: Vista em corte da estrutura básica do fotodetector da tecnologia CMOS *standard*.

Foram fabricados fotodíodos, na mesma sequência de fabrico, todos de igual dimensão e formato, mas com as diferentes combinações possíveis dessas 3 camadas dieléctricas. Verificou-se que a remoção do primeiro óxido causa bolhas na área activa do fotodíodo (Figura 6.8). Essa rugosidade aleatória na superfície interfere, também

aleatoriamente, na fotocorrente do fotodíodo. Na Figura 6.9 pode observar-se que a remoção das camadas dieléctricas que se encontram sobre o fotodíodo provoca a corrosão na camada adjacente inferior. No caso da remoção do 1º óxido, a junção *pn* pode ser afectada. Deste modo, usando a tecnologia CMOS *standard* disponível, o primeiro óxido deve ser mantido. Assim, a melhor estrutura para os fotodíodos pretendidos é a que se apresenta na Figura 6.10. Após o fabrico do fotodíodo, mediu-se no SEM uma espessura de 650 nm para o 1º óxido. Foi também fabricado mais um fotodíodo, com metal sob a área activa, para fornecer a corrente de fuga. Na Figura 6.11 apresenta-se uma fotografia ampliada desse fotodíodo e de um dos fotodíodos do canal óptico. O sistema de detecção e electrónica de leitura foi encapsulado num *chip* “Dil 40” e apresenta-se na Figura 6.12.

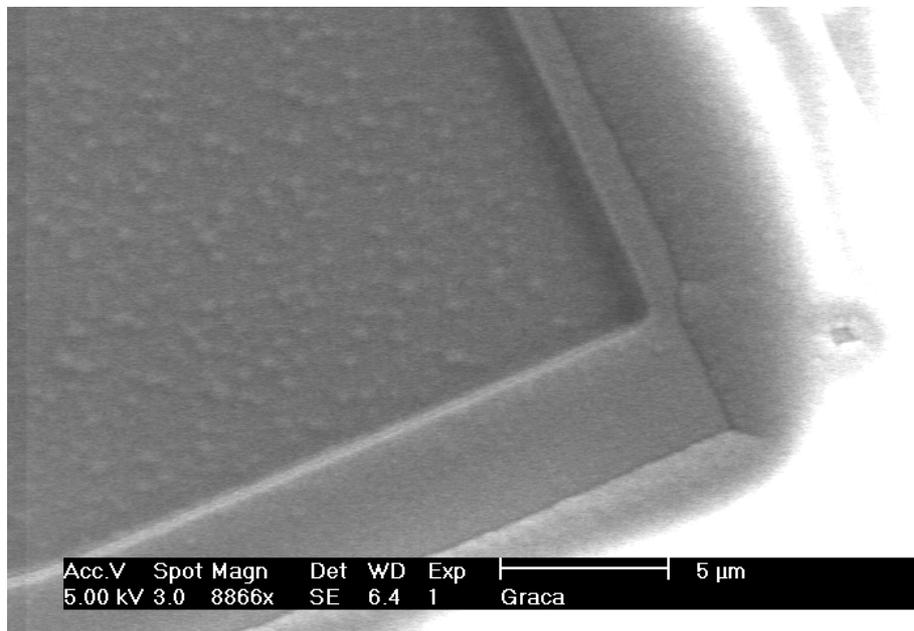


Figura 6.8: A fotografia tirada no SEM do fotodíodo CMOS sem o 1º óxido ilustra a rugosidade aleatória da superfície.

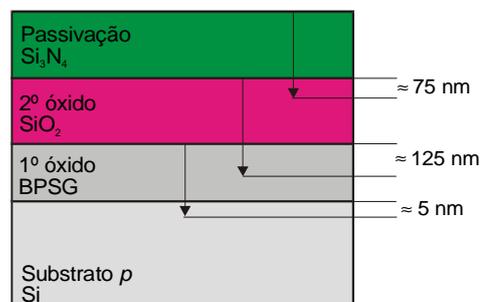


Figura 6.9: Espessura da corrosão das 3 camadas dieléctricas que se encontram por cima da junção *pn* do fotodíodo, na tecnologia CMOS *standard* disponível no DIMES.

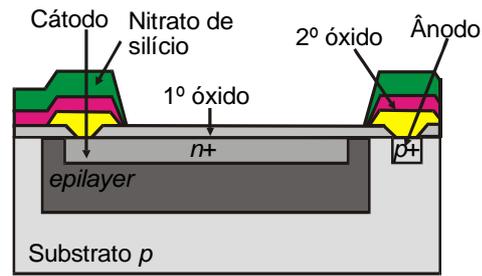


Figura 6.10: Vista em corte da estrutura do fotodetector fabricado. A espessura efectiva do 1º óxido é de 650 nm.

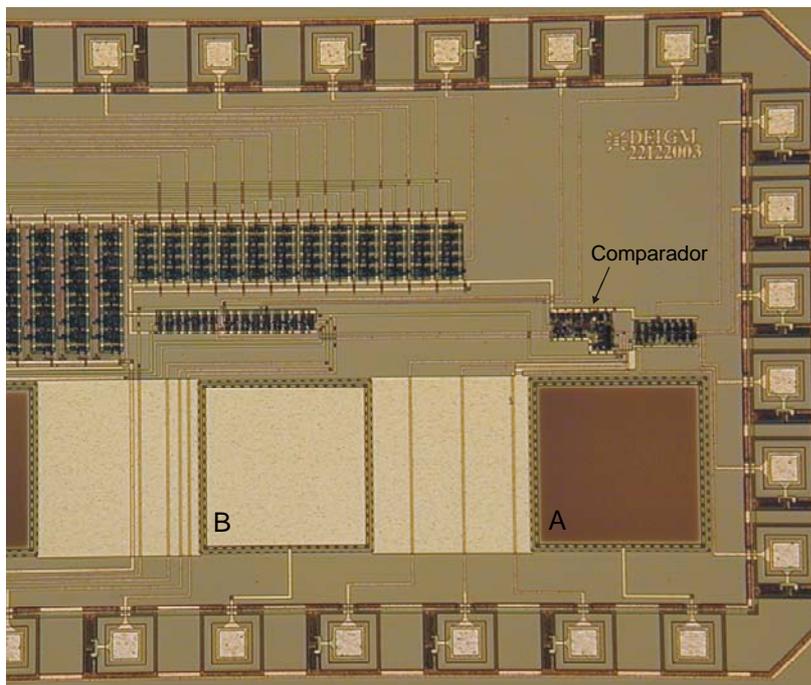


Figura 6.11: Fotografia ampliada de um fotodíodo (A) e do fotodíodo que fornece a corrente de fuga (B). Acima dos fotodíodos encontra-se alguma da electrónica de leitura.

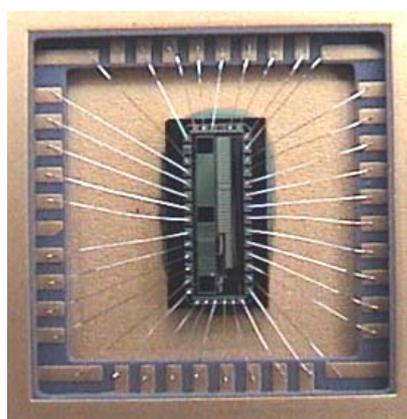


Figura 6.12: Fotografia do sistema de detecção e electrónica de leitura.

6.4 Sistema completo

O Microlab é um dispositivo modular e apresenta-se na Figura 6.13, onde se realça a zona de medição. Após o encapsulamento, num *chip*, do sistema de detecção e electrónica de leitura, o sistema de microfluidos foi colado por cima desse *chip*. Os canais foram alinhados com os fotodetectores. O filtro óptico encontra-se pousado sobre o sistema de microfluidos. A lamela na qual foi fabricado tem 2.5 cm de lado e uma ligeira coloração rosa – acastanhada (invisível na fotografia).

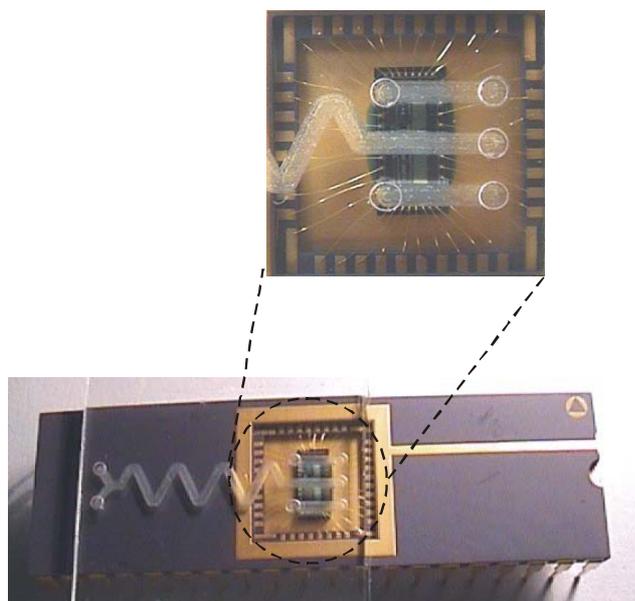


Figura 6.13: O Microlab.

6.5 Conclusão

O Microlab é um dispositivo composto por três módulos: o sistema de microfluidos, micromaquinado em vidro por técnicas de fresagem e furação; o sistema de filtragem óptica construído por um método de deposição por IBD; o sistema de detecção e electrónica de leitura, fabricado em tecnologia CMOS *standard*. Neste capítulo foi descrito o processo, tecnologia e local de fabrico de cada módulo, recorrendo a esquemas ilustrativos quando necessário, assim como as limitações e vantagens associadas a cada processo. Foram ainda apresentadas fotografias dos vários módulos e do dispositivo global.

Bibliografia

- [1] <http://www.dei.uminho.pt>.
- [2] <http://www.inesc-mn.pt/list equip.htm>.
- [3] SCHOT, K.; WIND, D. - *DIMOS01*. TUDELFT, DIMES, 1995.

Resultados experimentais

Neste capítulo as experiências e os resultados obtidos através de medições ópticas e eléctricas, quer nos vários blocos do Microlab, quer no Microlab completo, são apresentados e discutidos. É também descrita a instalação experimental utilizada nas medições.

Numa fase inicial pretende-se provar, utilizando equipamentos de medida convencionais, que a utilização de volumes de ensaio da ordem das dezenas de microlitros não influenciam a resposta do método de medida, e portanto não invalidarão a utilização do Microlab. Em seguida apresenta-se e discute-se os resultados obtidos em cada bloco do Microlab. Por fim demonstra-se a aplicação do Microlab na determinação quantitativa de ácido úrico na urina.

7.1 Detecção da concentração de biomoléculas em pequenos volumes de urina

Nesta secção pretende-se mostrar que os procedimentos utilizados para a determinação da concentração de biomoléculas na urina podem ser realizados no Microlab com o mesmo desempenho, precisão, fiabilidade e sensibilidade dos métodos existentes, actualmente, nos laboratórios de análises clínicas. Para tal, é necessário verificar se a utilização de volumes de ensaio da ordem das dezenas de microlitros não influencia a sensibilidade, a linearidade, a repetitividade e a reprodutibilidade do método de detecção colorimétrica por absorção óptica. Para além disso, as medições apresentadas são também necessárias para determinar a relação entre a concentração da

biomolécula a analisar e a intensidade da luz absorvida ou transmitida pela mistura e para determinar a curva de calibração para cada biomolécula.

7.1.1 Método utilizado e equipamentos de medida

Existem vários ensaios por detecção colorimétrica para a quantificação da proteína total e ácido úrico na urina, comercializados sob a forma de *kits*. Os *kits* de diagnóstico escolhidos (contendo padrões, reagentes e calibradores) são comercializados pela *Sigma-Aldrich Diagnostics*[®]. Nestes *kits* são utilizados reagentes para que os cromóforos de cada biomolécula absorvam o máximo da luz na gama visível (princípio da detecção colorimétrica). O volume de ensaio especificado nos seus protocolos é de 1 ml. O método utilizado baseia-se no aumento da absorvência máxima para um determinado comprimento de onda, que ocorre após a ligação do reagente às biomoléculas a analisar. Esse aumento é directamente proporcional à concentração da biomolécula, e traduz-se no aumento da intensidade da cor produzida pela mistura. A maior vantagem deste método é que os reagentes utilizados permitem que a cor obtida seja estável por um período de tempo suficiente para uma correcta leitura óptica (geralmente mais de 1 minuto). Além disso, interferências de outras biomoléculas diferentes daquelas para a qual ele foi desenvolvido são praticamente desprezáveis, uma vez que para cada biomolécula a analisar existe um reagente específico.

Toda a preparação das amostras e as medições efectuadas apresentadas nas duas próximas secções foram realizadas no laboratório do Departamento de Biologia da UM. Utilizaram-se padrões da biomolécula a analisar, volumes de solução de 15 µl a 250 µl e lamelas com poços de 1 mm de caminho óptico. Foi estudada a linearidade, a variação com a temperatura, a repetitividade e a reprodutibilidade, através de várias medições da absorvência para o comprimento de onda ao qual a biomolécula a analisar tem o seu máximo de absorvência. As medições foram efectuadas num espectrofotómetro da *Molecular Devices*[®] modelo *SPECTRAMax*[®].

Foi necessário efectuar, paralelamente, medições espectrofotométricas por absorção óptica varrendo a gama de luz visível, para determinar a relação entre a concentração da biomolécula a analisar e a intensidade da luz absorvida ou transmitida pela mistura nessa gama espectral. Tal relação permite determinar o comprimento de onda efectivo do máximo de absorvência, o que é importante para o projecto do sistema de filtragem óptica. Essas medições foram efectuadas no laboratório do Departamento de Física da UM, utilizando para tal, um espectrofotómetro da *SHIMADZU* modelo

UV-3101PC com uma cuvete de 1 mm de caminho óptico, contendo 100 µl de volume de solução e utilizando padrões da biomolécula a analisar. Para cada concentração da biomolécula em análise foram efectuadas 6 medições sucessivas num mesmo ensaio e 6 ensaios diferentes. O espectro de absorvência apresentado com os resultados nas secções 7.1.4 e 7.1.5 utiliza o valor médio dessas medições.

Os dados dos gráficos das curvas de calibração apresentados ao longo deste capítulo, foram analisados através de técnicas analíticas de regressão. A expressão da tendência desses dados (equação da curva) assim como o quadrado do coeficiente de correlação (*CR*) foram colocados nos gráficos das curvas de calibração. O *CR* reflecte a extensão de uma relação linear entre dois conjuntos de dados. É adimensional, o seu valor varia entre -1.0 e 1.0 e é dado por,

$$CR = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}} \quad (7.1)$$

onde *X* e *Y* são o conjunto de dados e *n* é o número de dados.

7.1.2 Teste da proteína total

O *kit* de diagnóstico utilizado para determinar quantitativamente a proteína total na urina é o “*Microprotein-PR, procedure n. 611*” [1]. Este procedimento é simples, não é corrosivo e é específico para determinar baixas concentrações de proteína (em particular, proteína na urina). O seu funcionamento baseia-se no aumento da absorvência a 595 nm que ocorre quando o complexo vermelho de pirogalol - molibdato é ligado aos grupos de aminoácidos básicos das moléculas de proteína. Este método não é específico de nenhuma proteína em particular. Contudo, o padrão de proteína total por ele utilizado é constituído somente por albumina. O aumento na absorvência a 595 nm é directamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. No procedimento recomendado pelo fabricante deve utilizar-se uma razão de 1 de branco/amostra/padrão para 50 de reagente, incubar a mistura durante 3 minutos e ler a absorvência a 595 nm (o valor é estável durante 15 minutos). O valor da absorvência decresce com o aumento da temperatura dentro do intervalo de 12 °C a 25 °C, mas não se altera no intervalo de 25 °C a 37 °C.

O estudo prático da linearidade, da sensibilidade, da repetitividade e da reprodutibilidade para concentrações de 1 mg/dl a 300 mg/dl (compreendendo a gama de valores normais e anormais na urina humana) com volumes de ensaio de 15 µl a

250 µl encontra-se descrito com detalhe em [2]. Do estudo resultam as seguintes conclusões:

- 1 - O método produz resultados lineares para concentrações entre 1 mg/dl e 200 mg/dl, como se pode constatar através do gráfico da curva de calibração da Figura 7.1 (no Anexo I descreve-se o procedimento para a obtenção de uma curva de calibração).
- 2 - Um incremento de 1 mg/dl na concentração de proteína corresponde a uma alteração no valor da absorvência de 0.0002.
- 3 - Os coeficientes de variação da repetitividade e reprodutibilidade para 10 medições e 10 ensaios diferentes são menores que 9.0%.
- 4 - A redução do volume de ensaio não influenciou a linearidade da resposta, a sensibilidade, ou os coeficientes de variação da repetitividade e reprodutibilidade, uma vez que todos os valores obtidos experimentalmente encontram-se dentro dos valores definidos pelo método, (tais valores podem ser consultados em [1, 3, 4]).

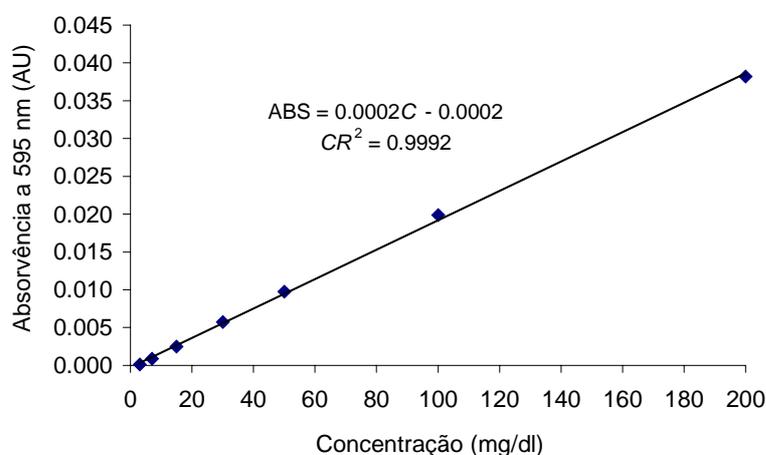
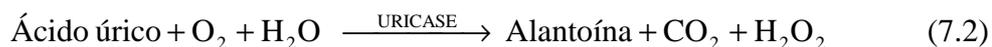


Figura 7.1: Curva de calibração para diferentes concentrações de albumina depois de reagir com o reagente “*Microprotein-PR*”. Valores obtidos com 1 mm de caminho óptico.

7.1.3 Teste do ácido úrico

O kit de diagnóstico utilizado para determinar quantitativamente o ácido úrico na urina é o “*InfinityTM uric acid reagent, procedure n. 684*”. As reacções envolvidas no ensaio são as seguintes [1]:

- (1) O ácido úrico é oxidado (formando alantoína) na presença de uricase para produzir o peróxido de hidrogénio (H₂O₂):



(2) o peróxido de hidrogénio gerado reage com a 4-aminoantipirina (4-AAP) e com o TBHB (ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxi benzóico) na presença da peroxidase para produzir a quinoneimina (composto corado):



O funcionamento deste método colorimétrico baseia-se no aumento da absorvência a 495 nm quando o reagente é misturado com as moléculas de ácido úrico. Esse aumento é directamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra. No procedimento recomendado pelo fabricante deve utilizar-se uma razão de 1 de branco/amostra/padrão para 50 de reagente, incubar a mistura durante 5 minutos a 37 °C (pode ser utilizada a temperatura ambiente mas o tempo de incubação é maior, ≈ 10 minutos) e ler a absorvência a 495 nm (este valor é estável durante 15 minutos). Estudos da influência de algumas das principais biomoléculas encontradas na urina na determinação do ácido úrico foram efectuados por Young [5], que publicou uma lista de biomoléculas que interferem com o ensaio. A bilirrubina (livre e conjugada), cisteína, glucose, hemoglobina e sódio não interferem significativamente com o procedimento analítico. Existe apenas interferência para elevadas concentrações de hemoglobina (> 200 mg/dl) e bilirrubina (> 8 mg/dl para a bilirrubina livre e > 12 mg/dl para a bilirrubina conjugada).

O estudo prático da linearidade, da sensibilidade, da repetitividade e da reprodutibilidade para concentrações desde 5 mg/dl a 120 mg/dl (compreendendo a gama de valores normais e anormais na urina humana) com volumes de ensaio desde 15 µl a 250 µl pode ser consultado em [2]. Do estudo resultam as seguintes conclusões:

- 1 - O método produz resultados lineares para concentrações de 5 mg/dl a 30 mg/dl; para concentrações superiores é necessário diluir a amostra e multiplicar o resultado da análise pelo factor de diluição, ou utilizar métodos de regressão não lineares para o cálculo do valor da concentração (Figura 7.2(a)); o gráfico da curva de calibração da Figura 7.2(b) ilustra a característica linear.
- 2 - Um incremento de 1 mg/dl na concentração de proteína corresponde a uma variação no valor da absorvência de 0.0037 (zona linear).
- 3 - Os coeficientes de variação da repetitividade e reprodutibilidade para 10 medições e 10 ensaios diferentes são menores que 6.0%.

- 4 - A redução do volume de ensaio não influenciou a linearidade da resposta, a sensibilidade, ou os coeficientes de variação da repetitividade e reprodutibilidade, uma vez que todos os valores obtidos experimentalmente encontram-se dentro dos valores definidos pelo método (tais valores podem ser consultados em [1, 6]).

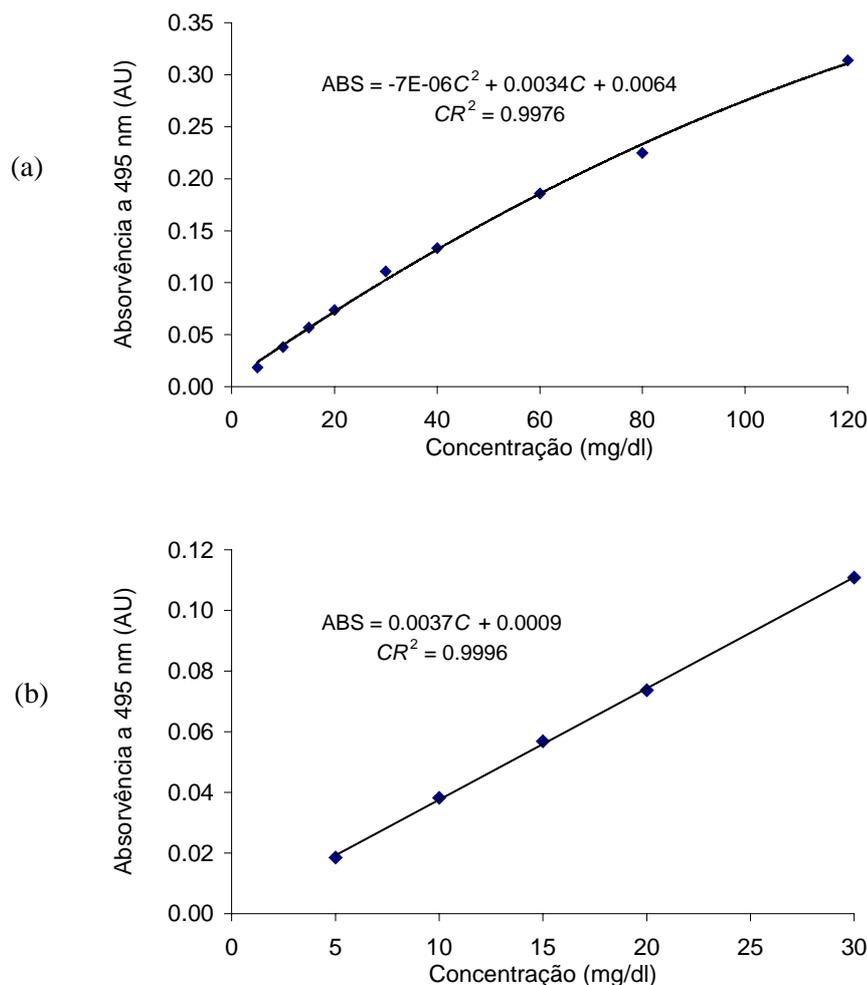


Figura 7.2: Curva de calibração para diferentes concentrações de ácido úrico depois de reagir com o reagente de “Infinity™ uric acid reagent”. Valores obtidos com 1 mm de caminho óptico. (a) concentrações de 5 mg/dl a 120 mg/dl; (b) ampliação da zona linear, concentrações de 5 mg/dl a 30 mg/dl.

7.1.4 Espectro de absorvência da proteína total

A Figura 7.3 apresenta o espectro de absorvência para diferentes concentrações de albumina. Os resultados foram obtidos à temperatura de ≈ 25 °C, com padrões de

albumina com concentrações de 3 mg/dl a 100 mg/dl, compreendendo os valores normais e anormais na urina (valor normal ≤ 15 mg/dl). Da Figura 7.3 conclui-se que:

- 1 - À medida que a concentração de albumina decresce o valor da absorvência também decresce.
- 2 - O maior desvio na absorvência entre concentrações consecutivas observa-se a 595 nm.
- 3 - O espectro de absorvência tem uma FWHM aproximadamente de 90 nm (FWHM foi definido em 4.7.1).

A 460 nm o espectro de absorvência mostra também diferentes valores de absorvência para as diferentes concentrações de albumina. Contudo, a diferença de valores da absorvência entre concentrações sucessivas é menor. Mais concretamente, a sensibilidade é metade da obtida a 595 nm.

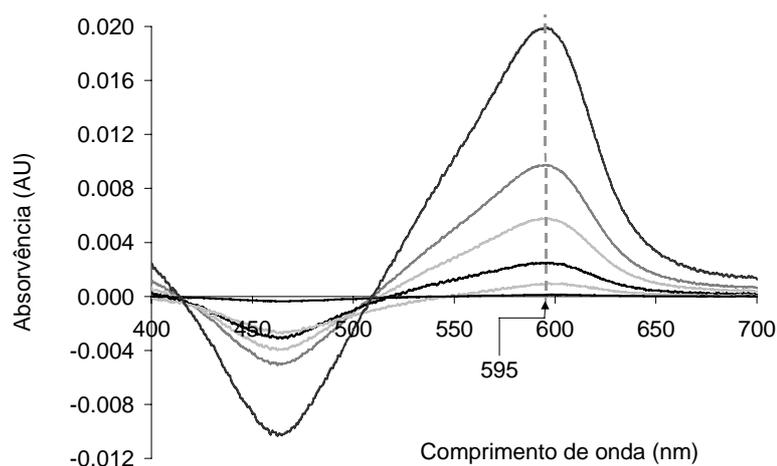


Figura 7.3: Espectro de absorção para diferentes concentrações de albumina depois de reagir com o reagente “*Microprotein-PR*”. Da curva superior para a curva inferior: 100 mg/dl, 50 mg/dl, 30 mg/dl, 15 mg/dl, 7.5 mg/dl, 3 mg/dl.

7.1.5 Espectro de absorvência do ácido úrico

A Figura 7.4 apresenta o espectro de absorvência para diferentes concentrações de ácido úrico. Os valores obtidos foram medidos à temperatura de ≈ 25 °C, com padrões de ácido úrico com concentrações de 5 mg/dl a 120 mg/dl, compreendendo a gama de valores normais e anormais na urina (8 mg/dl a 67 mg/dl). Do espectro de absorvência conclui-se que:

- 1 - À medida que a concentração de ácido úrico decresce o valor da absorvência também decresce.

- 2 - O maior desvio na absorvência entre concentrações consecutivas observa-se a 495 nm.
- 3 - O espectro de absorvência tem uma FWHM aproximadamente de 90 nm.

O espectro de absorvência do ácido úrico apresenta a 360 nm uma zona na qual se verifica um desvio do valor de absorvência para diferentes concentrações [7]. Contudo, para esse comprimento de onda, a diferença no valor de absorvência entre concentrações sucessivas é três vezes menor, quando comparado com o obtido a 495 nm.

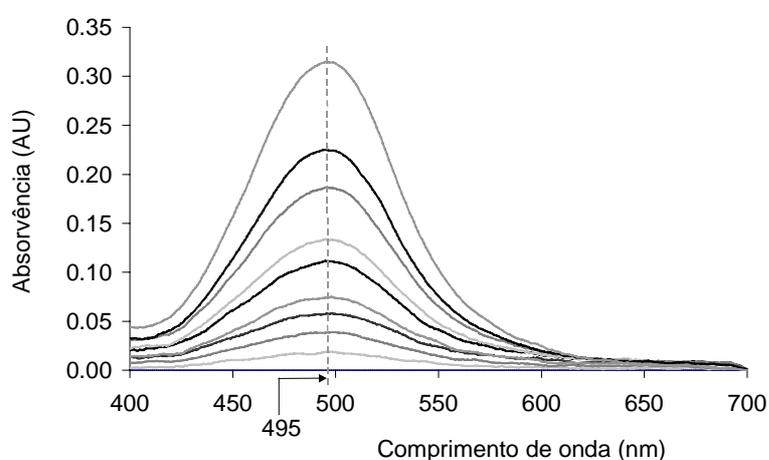


Figura 7.4: Espectro de absorção para diferentes concentrações de ácido úrico depois de reagir com o reagente “*InfinityTM uric acid reagent*”. Da curva superior para a curva inferior: 120 mg/dl, 80 mg/dl, 60 mg/dl, 40 mg/dl, 30 mg/dl, 20 mg/dl, 15 mg/dl, 10 mg/dl, 5 mg/dl.

7.2 Instalação experimental

As fotografias das Figura 7.5 a 7.7 documentam o arranjo experimental utilizado. Como fonte de luz utilizou-se uma lâmpada de 250 W de quartzo/tungstênio/halogéneo (cuja irradiância espectral é indicada na Figura 7.8(a)), com um monocromador da *ORIEL* modelo *Cornerstone 130TM* (com uma grelha de 1200 l/mm, uma resolução espectral de 0.5 nm e uma dispersão espectral de 6.6 nm/m a 350 nm). Ao monocromador foi conectada uma fibra óptica para direccionar a sua luz para o interior das caixas de medição. A resposta espectral da fibra óptica encontra-se na Figura 7.8(b) [8]. Dois picoamperímetros da *KEITHLEY* modelo 487 e 6487 (com uma gama de fim de escala de 10 fA a 2 mA e uma resolução de 5 dígitos e meio) foram utilizados na medição das características espectrais do filtro óptico e das características

eléctricas e responsividade espectral dos fotodíodos fabricados. Os fotodíodos foram calibrados utilizando como referência um fotodíodo comercial da *Hamamatsu*, modelo S1336-5BQ (ver Figura 7.7).

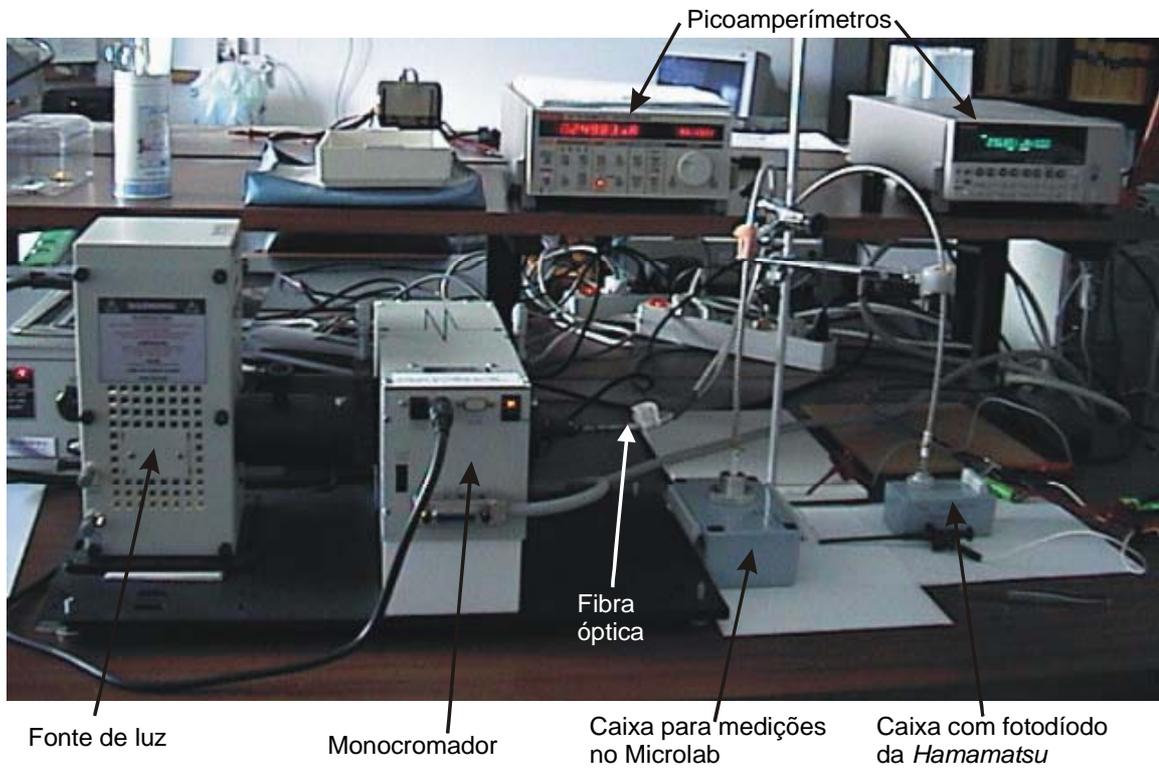


Figura 7.5: Fotografia da instalação para as medições experimentais.

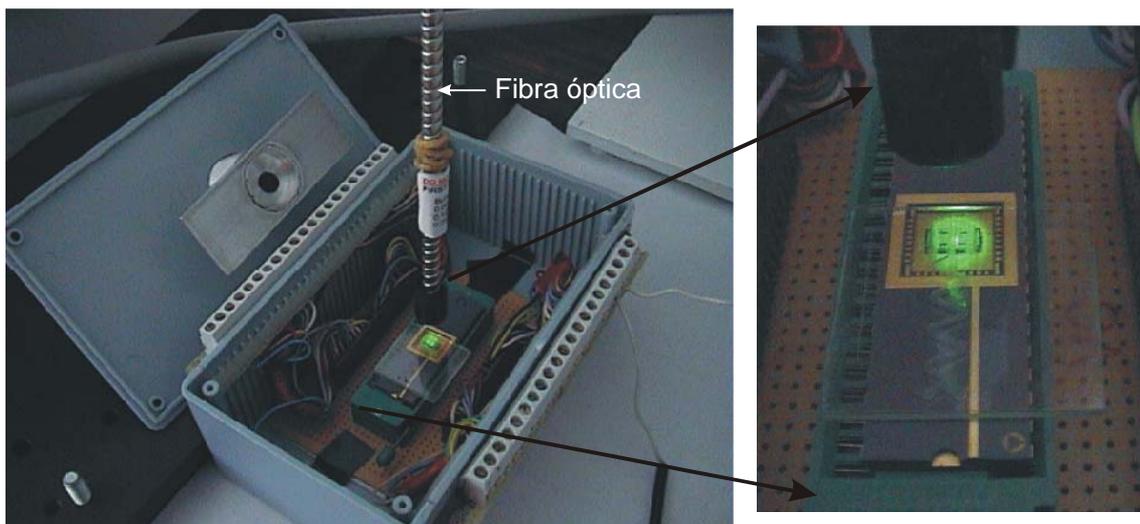


Figura 7.6: Fotografia do interior da caixa para as medições no Microlab e ampliação da zona de medição do Microlab.

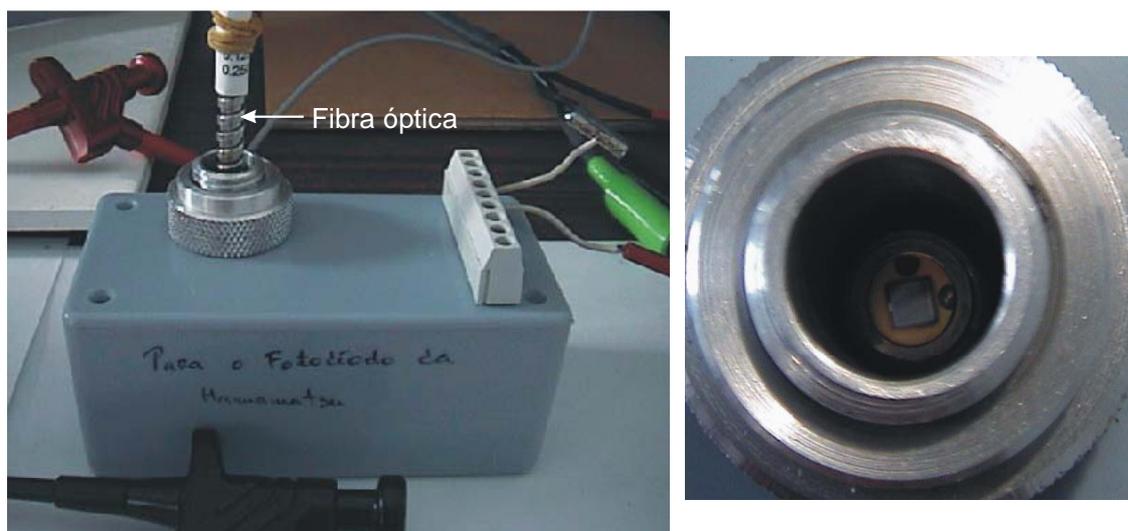


Figura 7.7: Fotografia da caixa com o fotodíodo da *Hamamatsu* e ampliação deste.

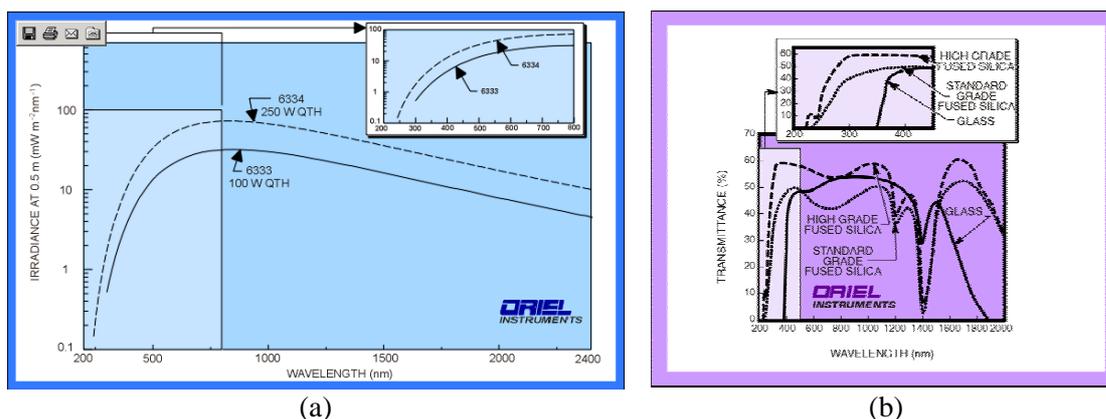


Figura 7.8: (a) Irradiância espectral em função do comprimento de onda para a lâmpada utilizada nas medições (curva com a referência 6334); (b) Transmitância em função do comprimento de onda para a fibra óptica utilizada nas medições (curva com a referência *standard grade fused sílica*). Estes gráficos foram retirados do manual do fabricante - *ORIEL* [8].

Tanto o monocromador como os picoamperímetros foram ligados a um computador para controlo e recolha dos dados. A ligação é efectuada através de uma interface GPIB. A interface gráfica com o utilizador foi desenvolvida num *software* denominado de “*testpoint*” e é relativamente fácil de usar. Na Figura 7.9 apresenta-se o seu aspecto. Os picos que aparecem no gráfico (corrente medida nos díodos) devem-se ao espectro do conjunto lâmpada e fibra óptica (ver Figura 7.8), concluindo-se assim, que a intensidade da luz do conjunto não é igual para todos os comprimentos de onda.

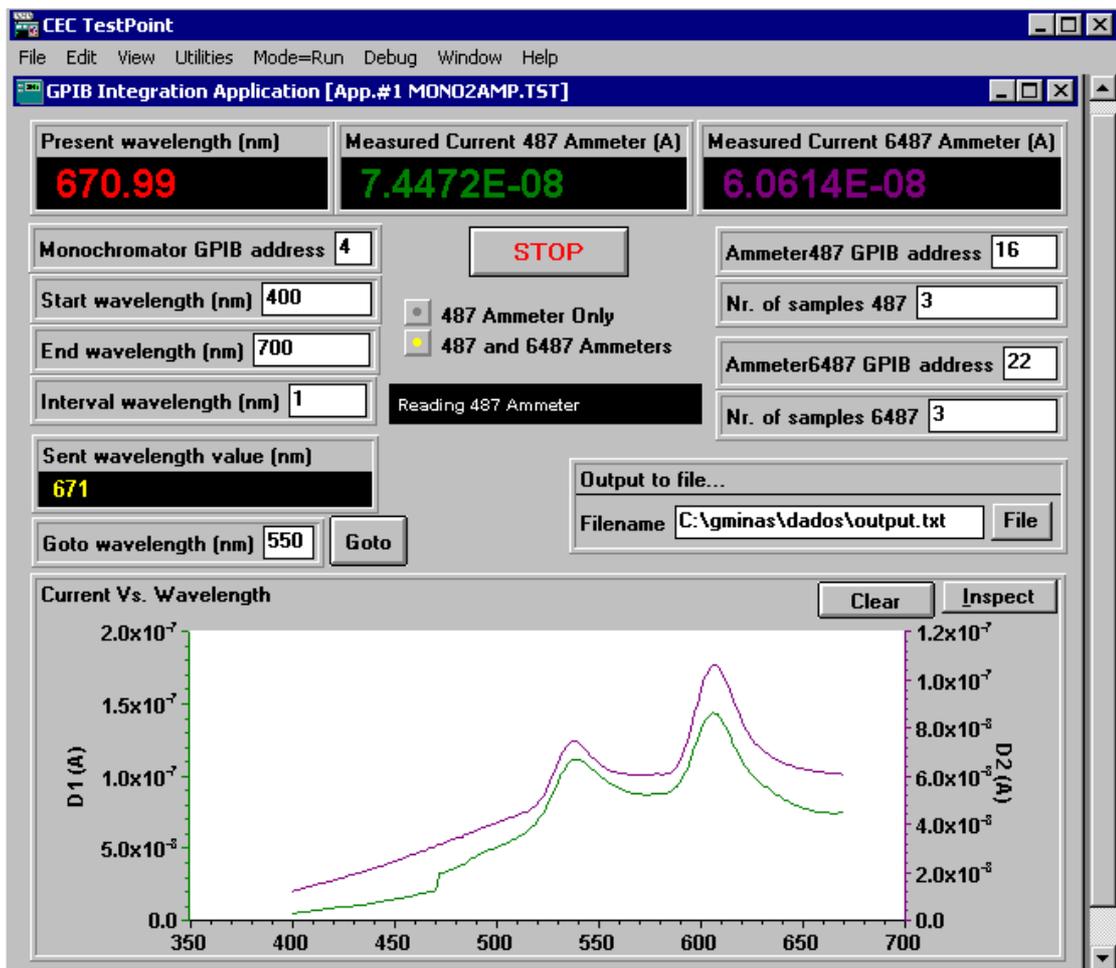


Figura 7.9: Interface gráfica na medição simultânea de dois fotodíodos.

7.3 Sistema de filtragem óptica

Na Figura 7.10 apresenta-se o espectro de transmissão do filtro óptico fabricado. Como se pode observar o seu desempenho está aquém do simulado. O centro do pico encontra-se em 480 nm (o pretendido era 495 nm) e a FWHM é de 18 nm (o pretendido era de 6 nm). Estes desvios devem-se, em primeiro lugar, ao facto de o índice de refração efectivo do TiO₂ ser ligeiramente diferente do utilizado nas simulações, uma vez que foram alterados os parâmetros de controlo para se obterem taxas de deposição mais elevadas. Em segundo lugar, a espessura total das 11 camadas deste filtro é de 92% da pretendida. Contudo, ao se introduzir o decréscimo da espessura total da estrutura multicamada e o índice de refração real (medido no elipsómetro), obtém-se uma resposta espectral similar à medida. Daqui se conclui que, efectivamente, são necessárias várias iterações para o apuramento preciso das taxas de deposição e respectivos índices de refração. Conclui-se ainda que basta um pequeno desvio, quer na

espessura das camadas, quer no valor do índice de refração, para a resposta espectral ficar alterada. Numa fase inicial foram fabricados dois filtros multicamadas (filtros números 3 e 8, ver Tabela 6.2). Os seus espectros apresentam-se, apenas por curiosidade, na Figura 7.11. Este exemplo ilustra o problema que surgiu, inicialmente, na deposição do TiO_2 (a corrosão das camadas já depositadas, ver secção 6.2.3). Este problema originou que a espessura total da estrutura multicamada fosse 56% do valor pretendido (daí os 60% a 70% de transmitância fora da banda passante). Contudo, a Figura 7.11 permite concluir que variando a espessura da camada 6 desvia-se a banda espectral de transmissão para outros comprimentos de onda.

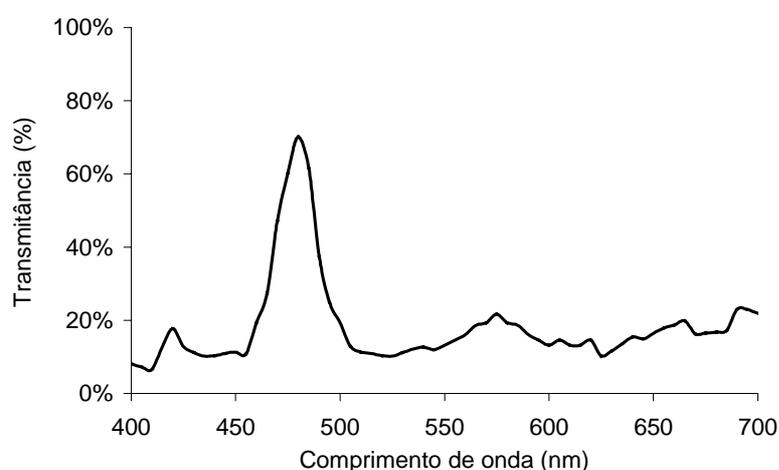


Figura 7.10: Espectro de transmissão do filtro óptico fabricado. O gráfico mostra os valores medidos em relação a uma lamela de vidro sem filtro. Ambos foram medidos com o fotodíodo comercial.

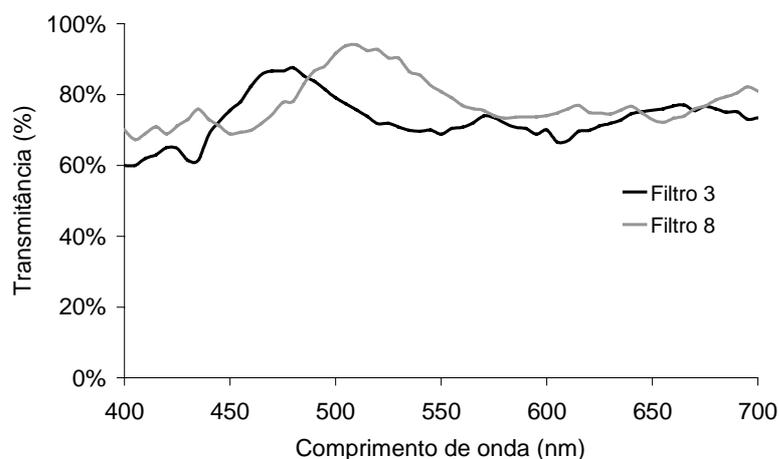


Figura 7.11: Espectro de transmissão dos dois filtros, números 3 e 8, fabricados inicialmente. A espessura total é de 56% da pretendida. O gráfico mostra os valores medidos em relação a uma lamela de vidro sem filtro. Ambos foram medidos com o fotodíodo comercial.

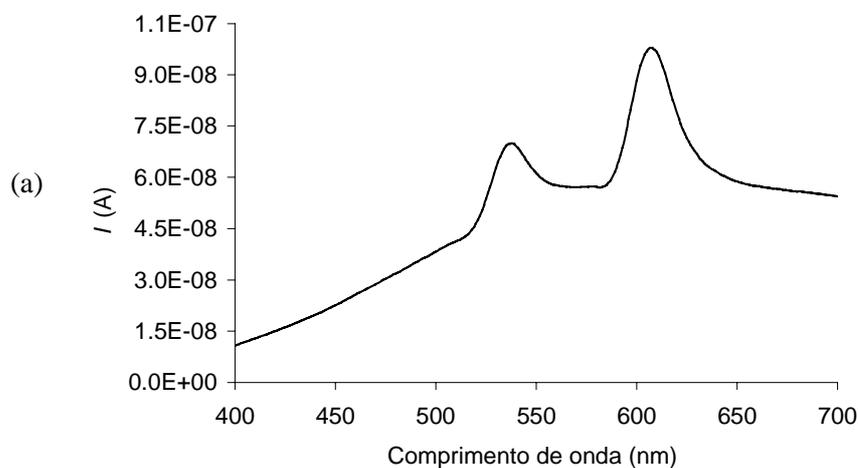
7.4 Sistema de detecção e leitura

O sistema de detecção e leitura inclui um detector óptico e a electrónica de leitura dos resultados. Esta realiza a conversão do sinal analógico do fotodetector num sinal digital, para posterior aquisição e tratamento dos dados. Ambos foram fabricados no mesmo processo CMOS *standard*. Seguidamente apresentam-se os resultados obtidos para o desempenho dos vários fotodetectores fabricados, assim como da electrónica de leitura.

7.4.1 Fotodetectores

A Figura 7.12 apresenta as características espectrais do fotodíodo comercial calibrado da *Hamamatsu* S1336-5BQ (utilizando a instalação experimental descrita na Figura 7.7). A característica da corrente do fotodíodo em função do comprimento de onda foi obtida sem polarizar o dispositivo e colocando sobre a sua área activa uma chapa com um furo de 500 μm de diâmetro, normalmente denominada de “*pinhole*”. Este procedimento é necessário para posterior comparação e calibração dos fotodíodos fabricados (relembre-se que estes têm uma área activa de 500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$). A curva da responsividade, fornecida pelo fabricante (Figura 7.12(b)) permite obter, através de $\mathfrak{R} = I/P_{\text{incidente}}$, o espectro da luz incidente nos fotodíodos (Figura 7.12(c)), permitindo assim calibrar os fotodíodos fabricados. As especificações técnicas deste fotodíodo encontram-se no Anexo VI.

As medições para obter o desempenho dos fotodíodos fabricados foram efectuadas com um *pinhole* de 500 μm de diâmetro sobre os dispositivos e utilizando o fotodíodo comercial da *Hamamatsu* como referência.



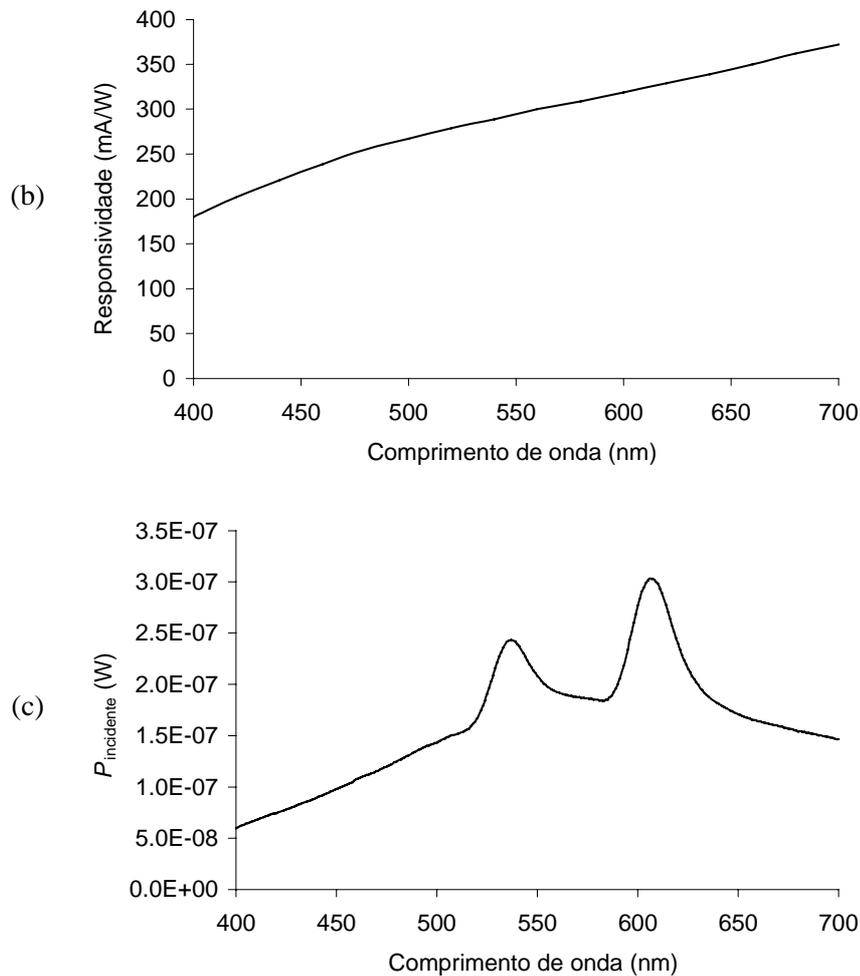


Figura 7.12: Características espectrais do fotodíodo comercial calibrado da *Hamamatsu*; (a) corrente em função do comprimento de onda, medida sem polarizar o fotodíodo e com um *pinhole* de 500 μm ; (b) curva da responsividade fornecida pelo fabricante [9]; (c) potência incidente no fotodíodo em função do comprimento de onda.

A Figura 7.13 ilustra a corrente medida, sem polarização, nos três tipos de fotodíodos verticais permitidos no processo CMOS *standard* com *n-well*: *n-well / p-epilayer*, *p+ / n-well* e *n+ / p-epilayer*. Estes fotodíodos têm apenas o 1º óxido sobre a junção *pn* (ver secção 6.3). A responsividade e eficiência quântica de cada fotodíodo encontram-se na Figura 7.14 e Figura 7.15, respectivamente. A eficiência quântica foi calculada a partir da responsividade e utilizando a expressão (5.4). Dos gráficos obtidos conclui-se que para a gama espectral pretendida para este trabalho (500 nm a 600 nm), o fotodíodo que melhor se adapta é o *n+ / p-epilayer*, confirmando-se assim as simulações obtidas.

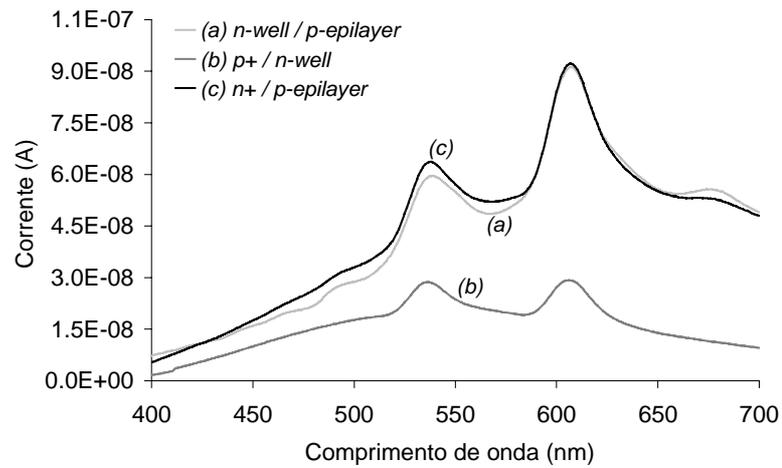


Figura 7.13: Corrente de cada fotodíodo em função do comprimento de onda. Os valores foram obtidos sem polarizar o fotodíodo e com um *pinhole* de 500 μm .

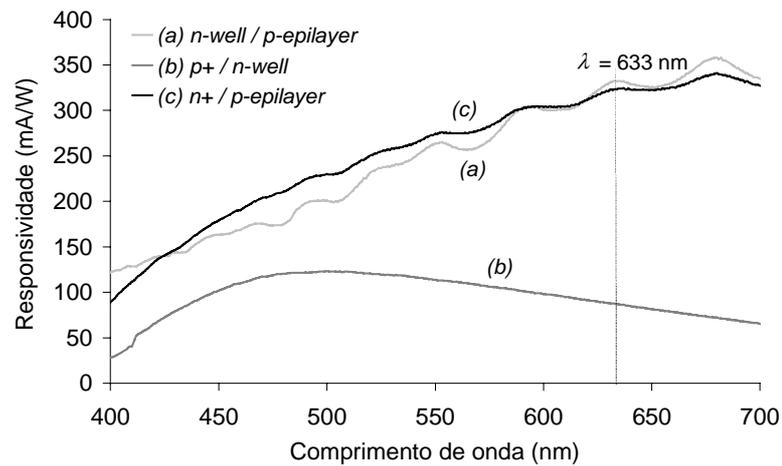


Figura 7.14: Responsividade de cada fotodíodo, calculada a partir da corrente medida e tendo como referência o fotodíodo comercial calibrado da *Hamamatsu*.

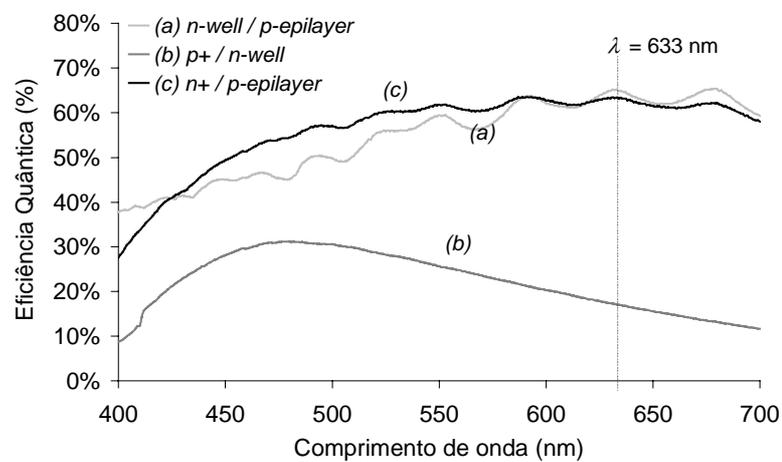


Figura 7.15: Eficiência quântica de cada fotodíodo, calculada a partir da expressão (5.4).

Uma vez que estava disponível um LASER com $\lambda = 633 \text{ nm}$ e com uma potência incidente de $5 \mu\text{W}$ constante e precisa, foram efectuadas as mesmas medições anteriores nos mesmos fotodíodos e em mais três fotodíodos do mesmo tipo mas com as três camadas dieléctricas sobre a junção pn (utilizando um *pinhole* igual em todos os fotodíodos). A Tabela 7.1 apresenta os valores obtidos. Dela se conclui que, para $\lambda = 633 \text{ nm}$, o fotodíodo $n\text{-well} / p\text{-epilayer}$ é o que apresenta melhor desempenho (devido à sua junção ser mais profunda), seguido do fotodíodo $n+ / p\text{-epilayer}$ e por fim o fotodíodo $p+ / n\text{-well}$, tal como esperado. Conclui-se ainda que as três camadas dieléctricas sobre a junção pn permitem uma maior eficiência quântica para esse comprimento de onda, tal como previsto pela simulação da Figura 5.8, secção 5.3.3. Contudo, essas camadas introduzem uma dependência do comprimento de onda, conforme se verifica pela Figura 7.16.

Tabela 7.1: Valores medidos da corrente e cálculo da responsividade e eficiência quântica dos 3 tipos de fotodíodos verticais da Figura 5.1 para $\lambda = 633 \text{ nm}$ e $P_{\text{incidente}} = 5 \mu\text{W}$ e constante: (a) fotodíodo $n\text{-well} / p\text{-epilayer}$; (b) fotodíodo $p+ / n\text{-well}$ e (c) fotodíodo $n+ / p\text{-epilayer}$.

Tipo de fotodíodo	Com 1º óxido			Com as 3 camadas dieléctricas		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
$I (\mu\text{A})$	1.70	0.49	1.62	1.87	0.62	1.73
$\mathfrak{R} (\text{mA/W})$	341	97	324	374	123	345
$\eta (\%)$	67	19	63	73	24	68

Na Figura 7.16 está representada a corrente em função do comprimento de onda dos fotodíodos $n+ / p\text{-epilayer}$ (fotodíodo do protótipo), um deles contendo apenas o 1º óxido e o outro as três camadas dieléctricas por cima da junção pn . Na Figura 7.17 e Figura 7.18 representam-se a responsividade e a eficiência quântica dos fotodíodos. As camadas de óxido influenciam a resposta espectral dos fotodíodos influenciando assim a quantidade de luz que chega à superfície do silício e, conseqüentemente, a sua eficiência quântica. Conforme se verifica pelos gráficos apresentados, o fotodíodo com as três camadas dieléctricas possui picos adicionais causados por essas camadas (tal como previsto pela simulação da Figura 5.8). Devido à tolerância da espessura das três camadas de óxido, os picos desviam-se um pouco do simulado.

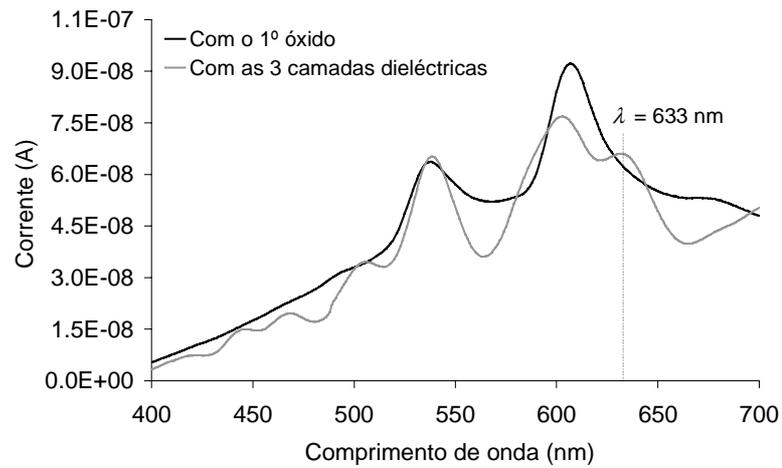


Figura 7.16 Corrente, em função do comprimento de onda, dos fotodíodos n^+ / p -epilayer com o 1º óxido e com as três camadas dielétricas por cima da junção pn . Valores medidos sem polarizar os fotodíodos.

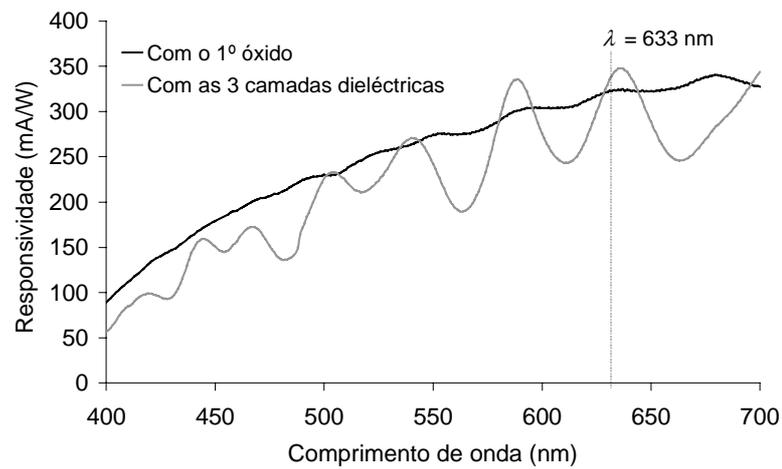


Figura 7.17: Responsividade dos fotodíodos medidos na Figura 7.16.

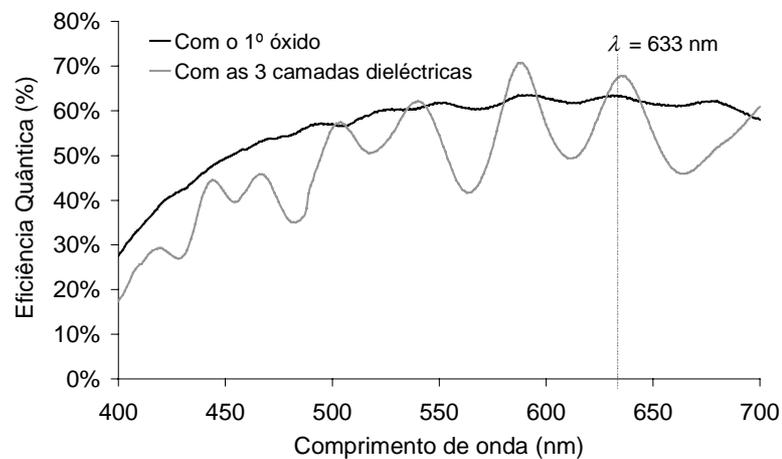


Figura 7.18: Eficiência quântica dos fotodíodos medidos na Figura 7.16.

A corrente de fuga para várias tensões inversas dos fotodíodos $n+/p\text{-epilayer}$ com o 1º óxido e com as 3 camadas dieléctricas apresenta-se na Figura 7.19. Sem polarização, o fotodíodo com o 1º óxido possui uma corrente de fuga de 0.27 pA enquanto que, para o outro, essa corrente é de 0.63 pA.

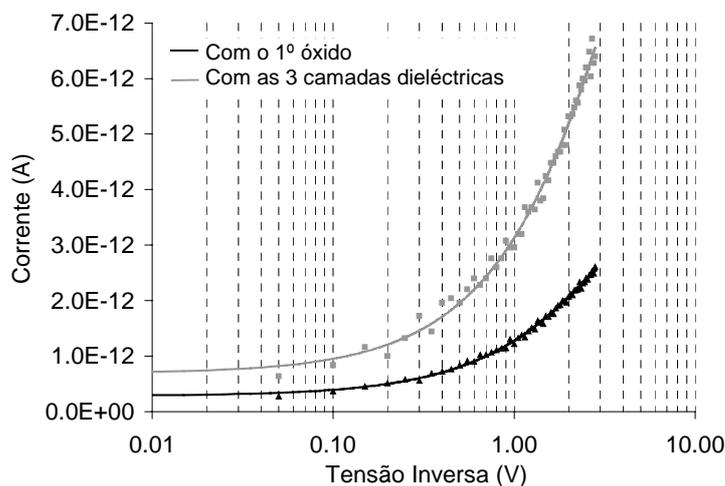


Figura 7.19: Corrente em função da tensão inversa dos fotodíodos $n+/p\text{-epilayer}$, medida quando não estão expostos à luz.

7.4.2 Electrónica de leitura

O circuito de leitura dos sinais analógicos vindos dos fotodetectores foi alimentado com uma tensão de 5 V. A tensão de referência de entrada do comparador é de 2 V e a frequência do relógio é de 1 MHz. Uma lâmpada convencional de filamento incandescente foi utilizada para iluminar os fotodíodos. As Figura 7.20 e Figura 7.21 apresentam o traçado do ecrã de um osciloscópio digital *LeCroy9310* com as formas de onda da tensão no condensador (onda superior), e da tensão negada de saída do comparador (onda inferior), quando a lâmpada está mais próxima e mais afastada do fotodetector, respectivamente. A Tabela 7.2 mostra as características em corrente contínua do comparador.

Como se pode constatar, a frequência da saída do comparador é directamente proporcional à intensidade da luz. Posteriormente, a saída do comparador é utilizada como sinal de relógio para um contador que conta impulsos durante um período de tempo fixo, produzindo assim a leitura digital correspondente à intensidade da luz.

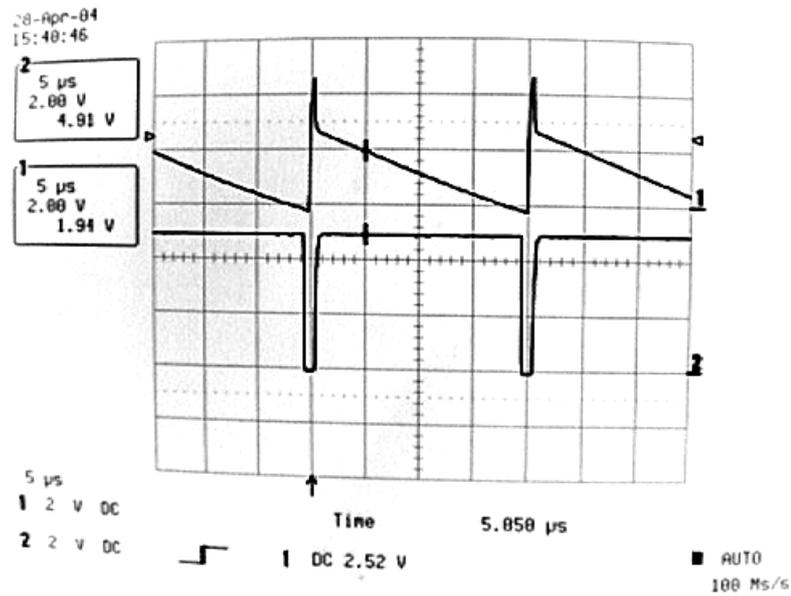


Figura 7.20: Tensão no condensador (1) e tensão na saída do comparador (2) do conversor luz - frequência, quando é iluminado por uma lâmpada de filamento incandescente a cerca de 5 cm do fotodíodo.

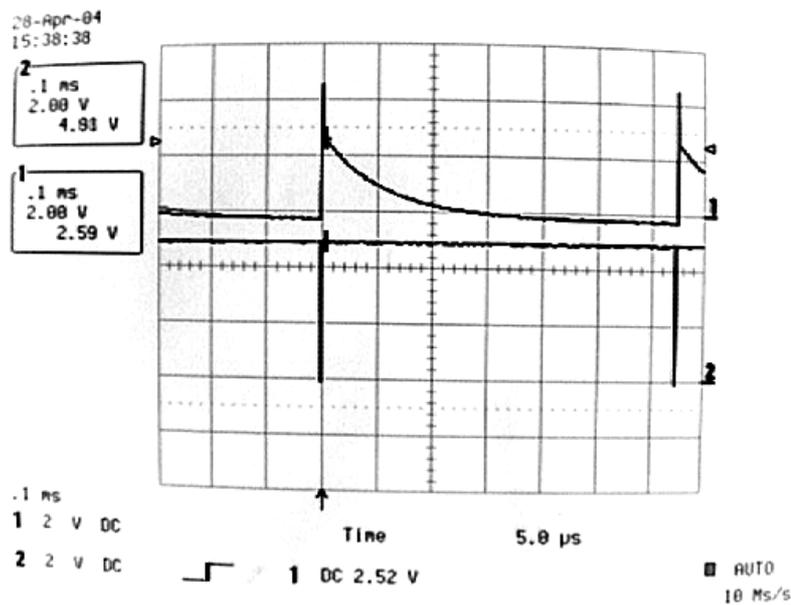


Figura 7.21: Tensão no condensador (1) e tensão na saída do comparador (2) do conversor luz - frequência, quando é iluminado por uma lâmpada de filamento incandescente a cerca de 50 cm do fotodíodo.

Tabela 7.2: Características em corrente contínua do comparador com relógio.

Características em corrente contínua	Mínimo	Típico	Máximo
<i>Offset</i> (mV) @ 2.5V		6	
Tensão de alimentação (V) Vdd-Vss	4	5	7
Corrente de polarização (μA)		10	
Gama de tensão de entrada (V)	0		5
Tempo de subida (ns) @ carga 12 pF		200	
Tempo de descida (ns) @ carga 12 pF		300	
Atraso de propagação mínimo (ns)		100	
Máxima frequência de relógio (MHz)		4.5	

7.5 O Microlab na determinação da concentração de proteína total e ácido úrico na urina

Os procedimentos para quantificar a concentração, quer da proteína total, quer do ácido úrico na urina quando é utilizado o Microlab como aparelho de medida, são os mesmos descritos na secção 7.1. Nessa secção, utilizou-se o espectrofotómetro como aparelho de medida e cuvetes ou placas com poços para deposição do líquido. No Microlab a diferença reside no facto dos líquidos se moverem e misturarem nos canais e o aparelho de medida ser o sistema de detecção e leitura fabricado num *chip* (Figura 7.22). O volume total de solução que circula no canal principal (canal de mistura) é de 14.28 μl. Para as duas biomoléculas a analisar (proteína total e ácido úrico) a razão amostra/reagente é de 1:50, pelo que, a quantidade de reagente utilizada é de 14 μl para 0.28 μl de amostra. Os outros dois canais, acima e abaixo do principal, um deles contendo o reagente e o outro um calibrador de concentração conhecida, permitem um volume de líquido de 1.5 μl.

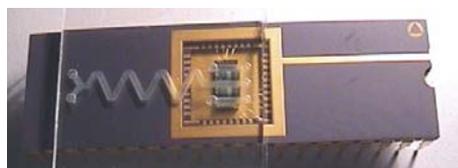


Figura 7.22: O Microlab (os canais têm 500 μm de profundidade e 1 mm de largura).

7.5.1 Medição da proteína total na urina

A Figura 7.23 apresenta o espectro de transmissão medido para diferentes concentrações de albumina após a sua reacção com o reagente específico para detecção de proteína total na urina. Este espectro foi obtido utilizando o conjunto lâmpada e monocromador como fonte de luz. Os resultados foram obtidos à temperatura de $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com padrões de albumina com concentrações de 3 mg/dl a 100 mg/dl, compreendendo a gama de valores normais e anormais na urina humana. Diferenças menores que 5 mg/dl não foram consideradas, uma vez que representam uma variação de menos de 10% nos valores típicos encontrados no ser humano. Foram realizadas 6 medições diferentes e 6 ensaios diferentes para cada concentração. Os valores apresentados representam uma média dos valores obtidos em cada experiência. No gráfico da Figura 7.23, a recta para $T = 100\%$ corresponde ao valor obtido quando foi medido apenas o reagente (sem proteína total, mais precisamente sem albumina).

Na Figura 7.24 encontra-se a curva de calibração deste ensaio. Os resultados estão de acordo com as medições efectuadas nos aparelhos convencionais e consequentemente as mesmas conclusões podem ser obtidas (ver secções 7.1.2 e 7.1.4). Salienta-se que um incremento de 1 mg/dl no valor da concentração de proteína corresponde a uma alteração do valor de transmitância de 0.025%, conforme a equação da recta de tendência do gráfico de calibração.

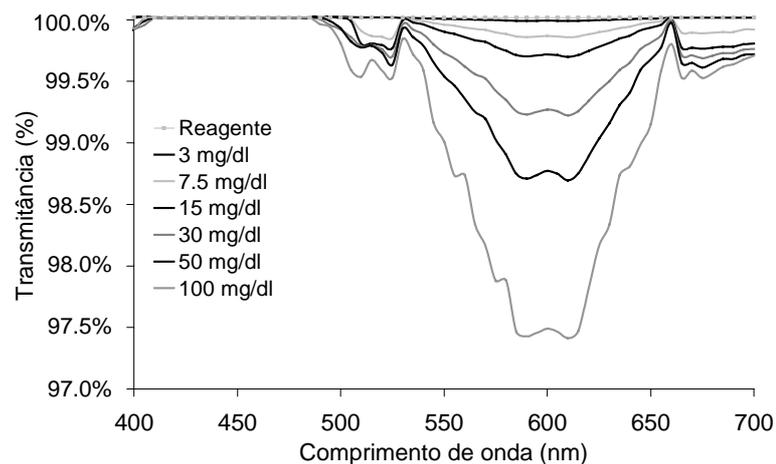


Figura 7.23: Espectro de transmissão para diferentes concentrações de albumina depois de reagir com o reagente específico para proteína total (“*Microprotein-PR*”). Da curva superior para a inferior: reagente, 3 mg/dl, 7.5 mg/dl, 15 mg/dl, 30 mg/dl, 50 mg/dl e 100 mg/dl.

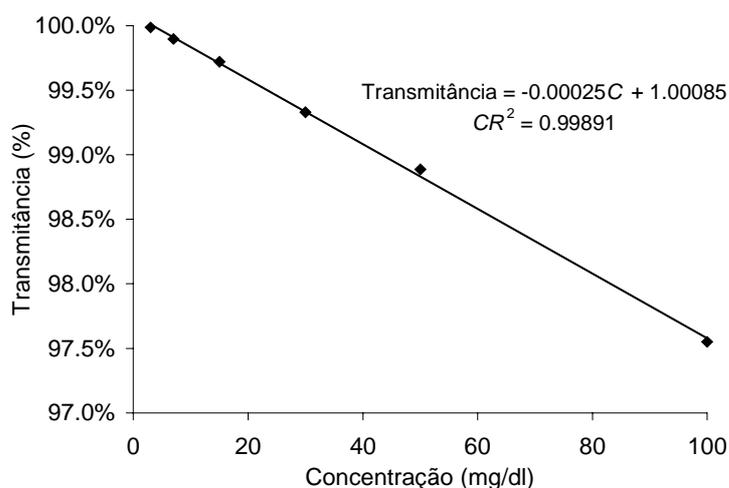


Figura 7.24: Curva calibração para diferentes concentrações de albumina depois da sua reacção com o reagente “*Microprotein-PR*”.

A Tabela 7.3 fornece alguns resultados úteis de cálculos baseados nos valores medidos. O coeficiente de absorção (α) para cada concentração foi calculado pela lei de *Lamber-Beer*:

$$I_{\lambda}(LP) = I_{\lambda}(LP = 0)e^{-\alpha_{\lambda}LP} \quad (7.4)$$

onde I representa a intensidade de luz que atinge o fotodetector e LP o caminho óptico percorrido por essa luz na amostra a analisar (no presente caso é de 500 μm).

Tabela 7.3: Coeficiente de absorção para cada concentração medida para $\lambda = 595 \text{ nm}$ e com $LP = 500 \mu\text{m}$.

Soluções	T (%)	α (m^{-1})	T_{dif} (%)
Reagente	100.00		
3 mg/dl	99.98	0.27	0.02
7.5 mg/dl	99.89	2.05	0.09
15 mg/dl	99.72	5.66	0.17
30 mg/dl	99.33	13.19	0.39
50 mg/dl	98.88	22.40	0.45
100 mg/dl	97.55	45.82	1.33

Pela Tabela 7.3 pode concluir-se que a diferença no valor da transmitância para diferentes concentrações T_{dif} , é muito pequena. As transmitâncias obtidas encontram-se bastante perto de 100% (transmitância para reagente sem proteína). Isto deve-se a dois factores. Em primeiro lugar o caminho óptico é pequeno (500 μm) quando comparado com os espectrofotómetros convencionais (normalmente é de 1 cm). Em segundo lugar,

a albumina é a biomolécula que aparece em menor quantidade na urina humana (ver Capítulo 2).

Uma vez que os ensaios para analisar proteína total na urina foram realizados com padrões de albumina, importava verificar o que aconteceria se além de albumina estivessem presentes outras proteínas na amostra. A albumina representa um terço da proteína total na urina. Se estiverem presentes mais proteínas, o valor da concentração em análise aumenta. Experiências com pequenos volumes de solução com amostras que continham albumina e imunoglobulina G foram realizadas no Departamento de Biologia da UM. Dessas experiências conclui-se que a aplicação conjunta dos métodos de determinação de albumina e de proteína total é eficaz [2].

As medições efectuadas não incluem nenhum filtro óptico no topo do Microlab, uma vez que para o comprimento de onda ao qual este procedimento tem um máximo de absorvência ($\lambda = 595$ nm), não foi fabricado, ainda, um filtro óptico. A seguir apresentam-se os ensaios relativos à determinação da concentração de ácido úrico na urina com o Microlab completo.

7.5.2 Medição do ácido úrico na urina

A Figura 7.25 apresenta o espectro de transmissão medido para diferentes concentrações de ácido úrico após a sua reacção com o reagente específico para detecção de ácido úrico na urina. Este espectro foi obtido utilizando o conjunto lâmpada e monocromador como fonte de luz. Os resultados foram obtidos à temperatura de ≈ 25 °C com padrões de ácido úrico com concentrações de 5 mg/dl a 120 mg/dl, compreendendo a gama de valores normais e anormais na urina humana. Diferenças menores que 5 mg/dl não foram consideradas, uma vez que representam uma variação de menos de 10% nos valores típicos encontrados no ser humano. Foram realizadas 6 medições diferentes e 6 ensaios diferentes para cada concentração. Os valores apresentados representam uma média dos valores obtidos em cada experiência. No gráfico da Figura 7.25, a recta para $T = 100\%$ corresponde ao valor obtido quando foi medido apenas o reagente (sem ácido úrico).

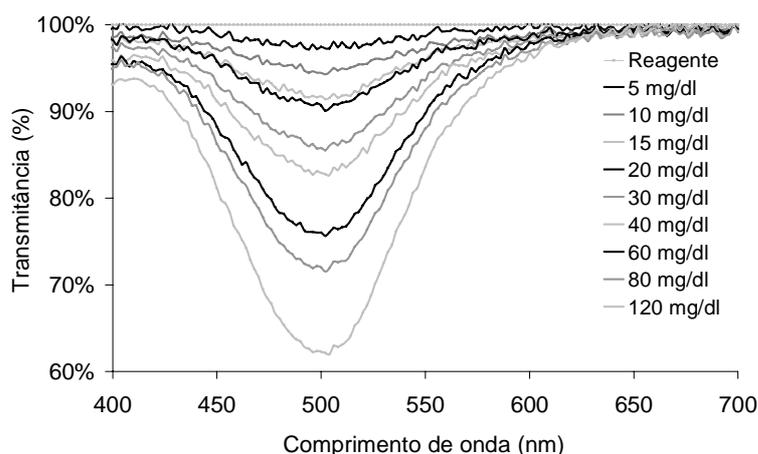


Figura 7.25: Espectro de transmissão para diferentes concentrações de ácido úrico depois de reagir com o reagente específico para a sua quantificação (“*Infinity™ uric acid reagent*”). Da curva superior para a inferior: reagente, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl, 20 mg/dl, 30 mg/dl, 40 mg/dl, 60 mg/dl, 80 mg/dl e 120 mg/dl.

Na Figura 7.26 encontra-se a curva de calibração deste ensaio. Os resultados estão de acordo com as medições efectuadas nos aparelhos convencionais e, conseqüentemente, as mesmas conclusões podem ser obtidas (ver secções 7.1.3 e 7.1.5). Salienta-se que um incremento de 1 mg/dl no valor da concentração de proteína corresponde a uma alteração do valor de transmitância de 0.46%, conforme a equação da recta de tendência do gráfico de calibração. Para a obtenção da recta de tendência considerou-se apenas a zona linear do gráfico (concentrações até 30 mg/dl). Para concentrações superiores a melhor opção, segundo o protocolo do método, é diluir as amostras e multiplicar o valor obtido pelo factor de diluição.

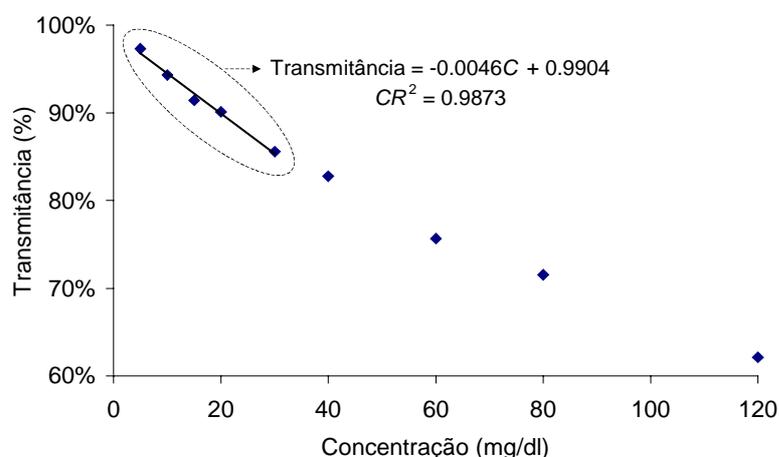


Figura 7.26: Curva de calibração para diferentes concentrações de ácido úrico depois da sua reacção com o reagente “*Infinity™ uric acid reagent*”. A recta de tendência foi calculada apenas na zona linear.

A Tabela 7.4 obteve-se de modo idêntico à Tabela 7.3 e fornece alguns resultados úteis de cálculos baseados nos valores medidos.

Tabela 7.4: Coeficiente de absorção para cada concentração medida para $\lambda = 495$ nm e com $LP = 500$ μm .

Soluções	T (%)	α (m^{-1})	T_{dif} (%)
Reagente	100.00		
5 mg/dl	97.29	54.97	2.71
10 mg/dl	94.29	117.68	3.00
15 mg/dl	91.42	179.42	2.87
20 mg/dl	90.09	208.64	1.33
30 mg/dl	85.56	311.95	4.54
40 mg/dl	82.76	378.49	2.80
60 mg/dl	75.66	557.75	7.10
80 mg/dl	71.52	670.15	4.13
120 mg/dl	62.14	951.65	9.39

Uma vez que o ácido úrico encontra-se em maior abundância na urina do que a albumina é visível uma maior diferença de valores de transmitância (T_{dif}) entre concentrações consecutivas. Ensaios prévios com um sistema de microfluidos com $LP = 1$ mm podem ser consultados em [7].

Medição do ácido úrico na urina utilizando o Microlab com filtro óptico

Ao colocar-se o filtro óptico sobre o Microlab e realizando exactamente os mesmos ensaios acabados de descrever, obteve-se o gráfico da Figura 7.27. Neste gráfico, foi considerado o valor $T = 100\%$ quando não estavam presentes nem o filtro óptico nem solução nos canais. Deste modo, observa-se melhor o efeito do filtro óptico comparando este gráfico com o obtido na Figura 7.25. Conforme se pode observar, devido ao efeito do filtro óptico o valor máximo da transmitância desviou-se de 495 nm para 480 nm. Este desvio não é crítico (quando se analisa apenas o ácido úrico) uma vez que o espectro de transmissão do ácido úrico tem uma FWHM ≈ 90 nm (ver Figura 7.25), pelo que para 480 nm existem ainda diferenças de transmitância para as várias concentrações. A FWHM obtida pelo efeito do filtro óptico é de 18 nm.

A curva de calibração obtida com o filtro óptico sobre o Microlab encontra-se na Figura 7.28. Pela equação da recta de tendência conclui-se que esta curva é ligeiramente diferente da obtida sem o filtro óptico (ver Figura 7.26). Esta conclusão é esperada, uma vez que os valores de transmitância apresentados no gráfico dizem respeito a um

comprimento de onda de 480 nm. Como se pode observar na Figura 7.25, a sensibilidade do método para 480 nm é ligeiramente inferior do que para 495 nm. Mais precisamente, um incremento de 1 mg/dl representa um aumento no valor da transmitância de 0.28% para 480 nm e de 0.46% para 495 nm. Note-se que este filtro óptico não poderia ser utilizado para obter a curva de calibração para $\lambda = 495$ nm, uma vez que para este comprimento de onda quase não há diferença no valor da transmitância para as várias concentrações.

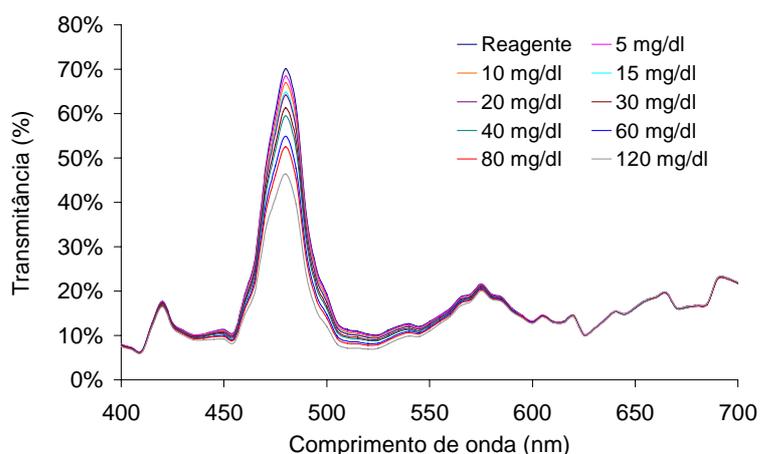


Figura 7.27: Espectro de transmissão, obtido com o filtro óptico sobre o Microlab, para diferentes concentrações de ácido úrico após a reacção com o reagente específico para a sua determinação. Da curva superior para a inferior: reagente, 5 mg/dl, 10 mg/dl, 15 mg/dl, 20 mg/dl, 30 mg/dl, 40 mg/dl, 60 mg/dl, 80 mg/dl e 120 mg/dl.

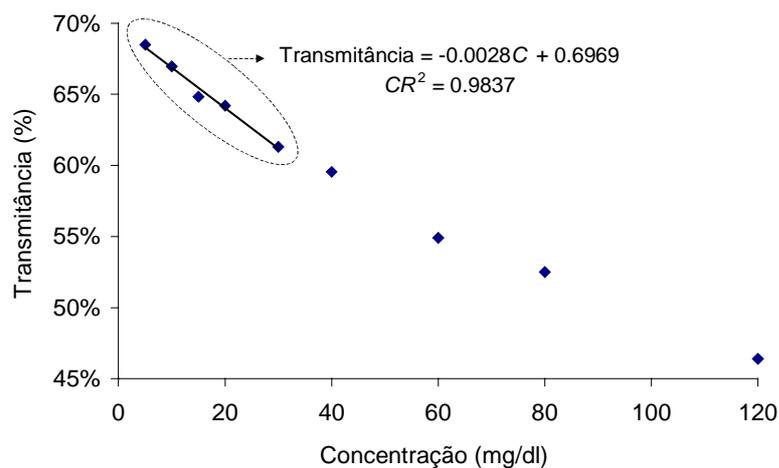


Figura 7.28: Curva de calibração do ensaio demonstrado na Figura 7.27, para $\lambda = 480$ nm.

Medição do ácido úrico na urina utilizando uma fonte de luz branca

A Figura 7.29 apresenta a curva de calibração quando os ensaios são realizados com uma luz branca convencional direccionada para os microcanais. Neste ensaio os valores da corrente dos fotodíodos foram transferidos para um computador para posteriormente ser elaborada a curva de calibração. Os procedimentos do ensaio foram os mesmos do que os realizados nos ensaios anteriores. No traçado do gráfico foi considerada $T = 100\%$ como sendo o valor medido para o reagente.

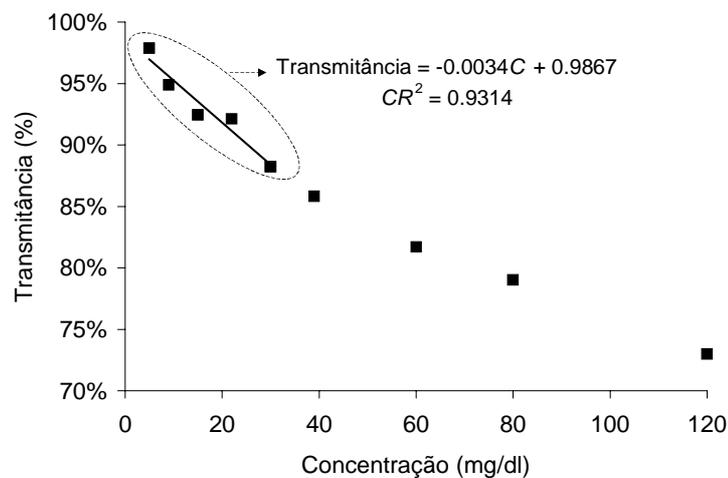


Figura 7.29: Curva de calibração para diferentes concentrações de ácido úrico após completa a reacção com o reagente específico para a sua determinação. Valores obtidos quando o Microlab é iluminado com uma fonte de luz branca convencional.

Pela curva de calibração, um incremento de 1 mg/dl na concentração de ácido úrico corresponde a uma variação no valor da transmitância de 0.34%. Contudo, o limite mínimo de detecção obtido é de aproximadamente 0.5 mg/dl e representa 0.8% da concentração de ácido úrico que pode existir na urina humana. Os coeficientes de variação da repetitividade e reprodutibilidade para 6 medições e 6 ensaios diferentes aumentaram 4% em relação aos obtidos na secção 7.1, isto é, os seus valores neste ensaio são aproximadamente de 10%. Uma vez que a fonte de luz é uma luz branca convencional, a medida de uma concentração conhecida (denominado de “calibrador”) para cada medição é imprescindível. Conforme foi referido no Capítulo 4, o espectro de uma fonte de luz branca convencional não é constante (daí a necessidade do terceiro canal para o calibrador). Caso a urina apresente um aspecto turvo deve fazer-se uma centrifugação antes das medições para eliminar os sedimentos que poderiam influenciar os valores medidos. Este procedimento é também efectuado nos laboratórios de análises clínicas.

7.6 Conclusão

Neste capítulo ficou provado que a redução de volumes de ensaio para a ordem das dezenas de microlitros não influencia a validade do método de medição das biomoléculas. Obtém-se o mesmo desempenho, precisão, fiabilidade e sensibilidade das análises realizadas actualmente nos laboratórios de análises clínicas, os quais utilizam um volume de solução de 1 ml. O Microlab pode, por isso, ser utilizado para a determinação da concentração de biomoléculas na urina.

O Microlab foi testado, com sucesso, na determinação da concentração de ácido úrico na urina, para concentrações que compreendem a gama de valores normais e anormais no ser humano. A Tabela 7.5 apresenta um resumo dos principais resultados obtidos.

Tabela 7.5: Resumo dos parâmetros obtidos do Microlab.

Características	Condição	Resultado
Tecnologia	-----	CMOS analógica 1.6 μm
Área de cada canal óptico	-----	500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$
Espessura do caminho óptico	-----	500 μm
Método de leitura da concentração da biomolécula	-----	Absorção óptica
Camadas do filtro óptico	Dielétricas	11
FWHM do filtro óptico	$\lambda = 480 \text{ nm}$	18 nm
Transmitância	$\lambda = 480 \text{ nm}$	70%
Corrente de fuga do fotodetector	@ 0 V	0.27 pA
Sensibilidade do fotodetector	$\lambda = 480 \text{ nm}, 0 \text{ V}$	211 mA/W
Eficiência quântica do fotodetector	$\lambda = 480 \text{ nm}, 0 \text{ V}$	54.4%
Tensão de operação do sistema de detecção e leitura	-----	5 V
Varição de 1 mg/dl na concentração de ácido úrico	Sem filtro óptico, $\lambda = 495 \text{ nm}, LP = 500 \mu\text{m}$	$\Delta T = 0.46\%$
Varição de 1 mg/dl na concentração de ácido úrico	Com filtro óptico, $\lambda = 480 \text{ nm}, LP = 500 \mu\text{m}$	$\Delta T = 0.28\%$
Varição de 1 mg/dl na concentração de ácido úrico	Com filtro óptico, fonte de luz branca, $LP = 500 \mu\text{m}$	$\Delta T = 0.34\%$
Repetitividade	6 medições	$\leq 10\%$
Reprodutibilidade	6 medições	$\leq 10\%$
Limite mínimo de detecção de ácido úrico	Fonte de luz branca	0.5 mg/dl

O limite mínimo de detecção é de aproximadamente 0.5 mg/dl, com um caminho óptico de 500 µm. Este limite mínimo é função não só do caminho óptico mas também da sensibilidade do fotodetector, do sistema de leitura, do método colorimétrico e dos reagentes.

Bibliografia

- [1] Biochemistry and Organic Reagents: for bioscience investigation. Sigma, 2002.
- [2] LIMA, C. - *Normalização de procedimentos para determinações bioquímicas em fluidos biológicos com a utilização de pequenos volumes*. Relatório da bolsa de iniciação à investigação científica no âmbito do projecto de investigação: Laboratorial microsystem in silicon for biological fluid analysis: a lab-on-a-chip in CMOS technology, 2001.
- [3] McELDERRY, L. A.; TARBIT, I. F.; CASSELLS-SMITH, A. J. - *Six methods for urinary protein compared*. Clinical Chemistry. Vol. 28, nº 2 (1982), p. 356-360.
- [4] WATANABE, N. [et al.] - *Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer*. Clinical Chemistry. Vol. 32, nº 8 (1998), p. 1551-1554.
- [5] YOUNG, D. S. - *Effects of drugs on clinical laboratory tests*. 3ª ed. American Society Publisher, Vol. 3 (1990), p. 360-370.
- [6] TRIVEDI, R. C.; BERTA, E. J.; REBAR, L. - *Enzymatic uric acid determination at 500 nm by trinder method*. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J. 07728.
- [7] MINAS, G. [et al.] - *Biological microsystem for measuring uric acid in biological fluids*. Sensors and Actuators A, Vol. 110 (2004), p. 33-38.
- [8] <http://www.oriel.com/netcat/catindex.htm>.
- [9] http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/parts_S/S1336-5BQ.pdf.

Conclusões e trabalho futuro

8.1 Conclusões

Esta tese apresenta um microssistema laboratorial (Microlab) para análise de fluidos biológicos por absorção óptica na gama visível do espectro electromagnético. O seu objectivo é permitir a determinação, em tempo real, sem requisitos especiais e a baixo custo, do valor da concentração de biomoléculas em fluidos humanos. Utilizando como fonte emissora uma fonte convencional de luz branca (como uma lâmpada comercial de filamento incandescente, por exemplo), permite que as análises sejam efectuadas sem recorrer a sistemas complexos e economicamente dispendiosos como sistemas que incluam um espectrofotómetro, por exemplo. O Microlab é um microssistema portátil para diagnósticos clínicos. Permite realizar análises em consultórios médicos no decorrer da consulta, na casa dos pacientes e nos próprios laboratórios de análises, permitindo assim a determinação exacta da concentração de biomoléculas em fluidos biológicos. Sendo de pequenas dimensões, baixo consumo, portátil e utilizando quantidades reduzidas de reagentes e de amostras apresenta, apesar de tudo, resultados com a mesma fiabilidade e precisão dos sistemas de análises de fluidos biológicos existentes, actualmente, nos laboratórios de análises clínicas.

O Microlab possui uma estrutura modular (*Multi-Chip-Module*) composta por três unidades: o sistema de microfluidos, o sistema de filtragem óptica e o sistema de detecção e leitura.

O sistema de microfluidos foi micromaquinado em vidro e contém os microcanais nos quais circulam os fluidos. Os microcanais são três, cada um com 1 mm de largura e 500 μm de profundidade. Um dos microcanais permite obter a linha de referência. O segundo microcanal permite a medição no fluido a analisar. Tem duas entradas e uma saída para possibilitar a mistura do fluido com o reagente de forma automática. O terceiro microcanal é necessário para calibrar a fonte de luz e calibrar a concentração da biomolécula a medir (com um padrão de concentração conhecida). O formato dos microcanais é rectangular devido à reflexão da luz, uma vez que o processo de medição é por absorção óptica.

O recurso a filtros ópticos faz com que seja possível realizar medições no Microlab usando uma fonte de luz branca convencional (que contém todos os comprimentos de onda), o que representa uma importante vantagem porque evita o recurso a uma fonte de luz monocromática específica, vinda de um LASER, por exemplo. O sistema de filtragem óptica encontra-se sob o sistema anterior. Os filtros ópticos têm como função seleccionar, dentro do espectro electromagnético de luz visível, o comprimento de onda adequado à biomolécula que se pretende analisar. São constituídos por 11 camadas de filmes finos dieléctricos de SiO_2 e TiO_2 . Estes filmes têm como vantagem uma elevada reflexão e uma baixa taxa de absorção. Foram depositados, numa lamela de vidro de 500 μm de espessura, por técnicas de PVD. Neste trabalho foram projectados 16 filtros ópticos, para analisar 16 biomoléculas diferentes que varrem comprimentos de onda desde 480 nm a 600 nm em intervalos de 8 nm. Cada filtro tem uma área activa de 500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ e é sensível a uma banda muito estreita de comprimentos de onda com uma $\text{FWHM} \leq 6 \text{ nm}$. O fabrico desta matriz de filtros ópticos requer apenas 4 máscaras e 15 deposições. O funcionamento do sistema de filtragem óptica foi demonstrado na análise de ácido úrico na urina. O filtro óptico fabricado para essa análise tem uma transmitância de 70% e uma $\text{FWHM} = 18 \text{ nm}$, para $\lambda = 480 \text{ nm}$.

O sistema de detecção e leitura foi fabricado segundo um processo de microelectrónica *standard* CMOS de 1.6 μm , com *n-well*, de uma camada de polisilício e duplo metal. Contém os fotodetectores para medir a intensidade do feixe de luz transmitido através da mistura. Este feixe, com várias componentes espectrais, é filtrado pelos filtros ópticos, obtendo-se assim um intervalo estreito de comprimentos de onda. O número de fotodetectores depende do número de filtros ópticos. Os fotodetectores fabricados, fotodíodos de junção, têm uma área activa de 500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$, uma sensibilidade de 211 mA/W para $\lambda = 480 \text{ nm}$ e uma corrente de fuga de 0.27 pA. Os

fotodetectores são posicionados exactamente debaixo dos filtros ópticos. Para converter o sinal analógico dos fotodetectores num sinal digital, foi integrado no mesmo processo de fabrico um conversor luz – frequência. Este necessita externamente de apenas uma tensão de alimentação contínua de 5 V.

O Microlab foi testado na determinação quantitativa de ácido úrico na urina. Nos testes foi utilizada uma lâmpada convencional de filamento incandescente. A escolha da urina deveu-se ao facto deste fluido não necessitar de uma preparação prévia para a realização da análise e por ser o fluido biológico menos viscoso, fluindo mais facilmente nos microcanais. Contudo, outros fluidos biológicos podem ser utilizados, tais como o sangue, a saliva, o fluido cerebrospinal, etc. O ácido úrico foi escolhido como a primeira biomolécula candidata ao funcionamento global do Microlab, por ser uma biomolécula frequentemente analisada na urina. A mistura completa e homogénea nos microcanais da urina com o reagente específico para a determinação quantitativa do ácido úrico é obtida em cerca de 40 s. A determinação quantitativa do ácido úrico na urina foi testada eficazmente para concentrações desde 5 mg/dl a 120 mg/dl, concentrações essas que compreendem a gama de valores normais e anormais na urina humana (8 mg/dl a 67 mg/dl). O limite mínimo de detecção obtido é aproximadamente de 0.5 mg/dl, o que significa que a resolução do Microlab é suficiente, tendo em conta os valores observados no ser humano.

8.2 Trabalho futuro

Como trabalho futuro destaca-se o fabrico da matriz de 16 filtros ópticos, utilizando o sistema de deposição, a configuração das máscaras e a sequência de fabrico indicados no capítulo 6.2. O Microlab ficará assim habilitado a determinar quantitativamente a concentração de 16 biomoléculas diferentes em fluidos biológicos.

Para o Microlab se tornar num equipamento totalmente autónomo seria interessante a construção de um leitor associado ao Microlab, o que permitiria a visualização do resultado quantitativo num mostrador. A Figura 8.1 apresenta o desenho artístico de um possível leitor. O sistema de microfluidos seria descartável, evitando assim os custos associados à lavagem dos reagentes e amostras. Os restantes sistemas (filtragem óptica e detecção e leitura) poderiam ser utilizados em várias análises.



Figura 8.1: Desenho artístico de um possível leitor para o Microlab.

Quanto ao sistema de microfluidos existe ainda bastante trabalho que pode ser desenvolvido. Como se viu, é interessante que este seja descartável. A utilização de polímeros para o seu fabrico apresenta vantagens, principalmente económicas, face ao fabrico em vidro. Em geral, os sistemas de microfluidos em vidro são fabricados através de técnicas de corrosão química utilizando ácido fluorídrico (técnicas complexas, dispendiosas, tóxicas e perigosas) ou através de técnicas de microfresagem e microperfuração (que não são boas para produção em massa e apresentam uma superfície rugosa). Uma solução promissora pode ser alcançada utilizando o *photoresist* SU-8 [1-3] no fabrico de sistemas de microfluidos. O *photoresist* SU-8 é um material fotossensível com boas propriedades mecânicas, boa resistência química e muito boa biocompatibilidade. O fabrico de microcanais em SU-8 é compatível com a fotolitografia ultravioleta dos semicondutores, com a vantagem de que não necessita de máscaras dispendiosas, uma vez que as máscaras podem ser fabricadas numa transparência como as usadas no fabrico de circuitos impressos. Permite ainda a construção de microcanais com profundidades até 1 mm e com uma rugosidade muito baixa, o que é extremamente vantajoso para medições por absorção óptica. A Figura 8.2 apresenta um esquema de como seria o Microlab com o sistema de microfluidos fabricado por técnicas de SU-8.

No sistema de microfluidos a mistura da amostra do fluido biológico com o reagente é feita por difusão. Contudo, apenas os fluidos cujas moléculas envolvidas na reacção tenham elevado coeficiente de difusão e baixo peso molecular podem ser misturados eficazmente e homoganeamente. Um sistema de microfluidos mais abrangente necessitaria de eléctrodos para mover e misturar os fluidos ao longo dos microcanais (princípio da electroforese e electrosmose). O desenvolvimento e fabrico de microbombas e microválvulas é um tópico de elevado interesse para uma nova geração do Microlab.

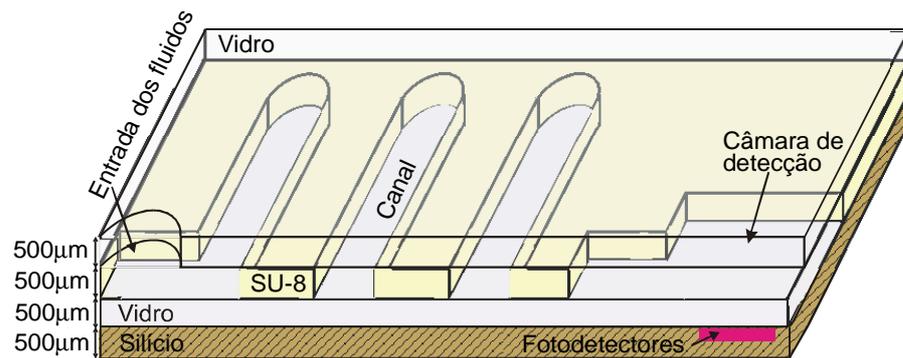


Figura 8.2: Desenho artístico, em corte e em perspectiva, do Microlab com o sistema de microfluidos fabricado através de técnicas de SU-8.

Bibliografia

- [1] IBM - *Photoresist composition and printed circuit boards and packages made therewith*. GELORME, J. D.; COX, R. J.; GUTIERREZ, S. A. R.; US Patent 4882245, 1989.
- [2] SHAW, J. M. [et al.] - *Negative photoresists for optical lithography*. IBM Journal of Research and Development. Vol. 41, nº 1-2 (1997), p. 81-91.
- [3] http://www.microchem.com/products/su_eight.htm.

ANEXOS

ANEXO I

Informações essenciais e requisitos das análises por detecção colorimétrica

I.1 Curva de calibração

A determinação da concentração (desconhecida) da biomolécula que se pretende analisar é obtida através de uma curva de calibração. Esta é preparada utilizando uma referência que não contenha a biomolécula que se pretende analisar (geralmente utiliza-se o reagente) e uma série de amostras com concentrações conhecidas da biomolécula que se pretende analisar (denominados “padrões” da biomolécula). A Tabela I.1 apresenta um exemplo de uma curva de calibração. Nela, encontram-se um conjunto de amostras de concentração conhecida utilizadas para descrever a curva de calibração (Figura I.1) e a amostra desconhecida a analisar. Após a reacção entre essas amostras e o reagente, as absorvências das misturas são lidas. Com estes valores é traçado um gráfico, Absorvência = f (Concentração). Esse gráfico denomina-se de “curva de calibração”. Normalmente o gráfico da curva de calibração apresenta a equação da curva, denominada de “recta de tendência”, calculada através de técnicas de regressão. Um outro parâmetro estatístico que é calculado juntamente com a curva de calibração é o coeficiente de correlação (CR). Este reflecte a extensão de uma relação linear entre dois conjuntos de dados. É um parâmetro adimensional, o seu valor varia entre -1.0 e 1.0 e é dado pela expressão de *Pearson*,

$$CR = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[n\sum X^2 - (\sum X)^2][n\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}} \quad (I.1)$$

onde X e Y são o conjunto de dados e n é o número de dados. Normalmente o que se representa no gráfico da curva de calibração é o quadrado desse coeficiente. Este quadrado é interpretado como a proporção da variância em Y que pode ser atribuída à variância em X .

A medida de concentrações desconhecidas dessa mesma biomolécula é realizada, normalmente, ao mesmo tempo que a curva de calibração. Os valores das absorvências medidas para as concentrações desconhecidas são interceptados com a curva de calibração e assim obtidos os valores das concentrações. Algumas análises colorimétricas resultam numa curva de calibração não linear. Nestes casos, selecciona-se uma pequena zona da curva onde a resposta é linear, ou esteja muito perto da linearidade, e dilui-se as amostras de forma aos seus valores de absorvência se encontrarem dentro dessa zona. Caso a curva não tenha nenhuma zona linear, ter-se-á

que utilizar técnicas analíticas de regressão não linear. A utilização destas técnicas pode consultar-se em [1].

Tabela I.1: Determinação de uma curva de calibração.

Amostra n°	Concentração da biomolécula (mg/dl)	Vol. amostra (ml)	Vol. reagente (ml)	ABS	Referência com amostra n°
1	0	1	4	0.000	1
2	2	1	4	0.143	1
3	4	1	4	0.261	1
4	6	1	4	0.379	1
5	Desconhecida	1	4	0.168	1

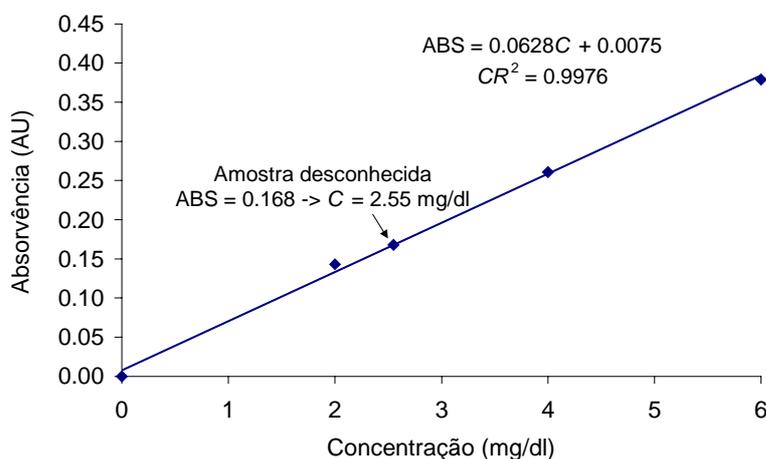


Figura I.1: Curva de calibração.

I.2 Requisitos da análise

Neste tipo de análises existe uma série de requisitos que têm que ser cumpridos. O seu incumprimento resulta em curvas de calibração incorrectas e consequentemente em valores de concentração incorrectos da biomolécula analisada.

É fundamental que a concentração da biomolécula na mistura seja directamente proporcional à concentração da biomolécula na amostra. Este requisito implica que nenhuma biomolécula da amostra, diferente da que se pretende analisar, tenha uma reacção com o reagente, dentro da gama de comprimentos de onda para a qual essa biomolécula tem um máximo de absorvência. Isto quer dizer que a reacção tem que ser selectiva, caso contrário, o valor medido da absorvência é referente não só à

biomolécula que se pretende analisar mas também a mais outras biomoléculas, pelo que não é possível discriminar a concentração nem da biomolécula pretendida nem das outras. Em algumas reacções apenas se consegue a selectividade quando o comprimento de onda, para o qual a absorvência da biomolécula é máxima, é desviado para outro valor. Esse desvio deve-se à composição química do reagente, que desvia apenas a biomolécula a analisar.

É fundamental que a leitura da absorvência seja feita só após a reacção estar completa. Reacções incompletas podem ser causadas pela selecção inadequada do tempo, temperatura ou razão entre amostra e reagente.

O conhecimento da estabilidade da mistura é a chave para a selecção do tempo necessário para a medição. A temperatura da reacção afecta o tempo necessário para se completar a reacção. Quando se pretende acelerar a reacção pode, em alguns casos, aumentar-se a temperatura à qual é realizada a análise.

Uma causa comum da análise por detecção colorimétrica ser não linear é a inadequada razão entre a concentração do reagente e a concentração da amostra. Essa inadequada razão pode resultar numa reacção incompleta, mesmo aumentando o tempo de reacção, ou seja, nem todos os compostos químicos da biomolécula conseguiram reagir com o reagente. Normalmente, uma razão entre a concentração do reagente e a concentração da amostra maior que 50 elimina esse problema.

I.3 Selecção do comprimento de onda para a leitura das absorvências das misturas

O comprimento de onda para a leitura das absorvências de uma determinada biomolécula deve ser escolhido através do máximo valor do espectro da absorvência da mistura. Contudo, existem, por vezes, sobreposições entre os espectros das absorvências da mistura, do reagente e da amostra. Esta, geralmente, além da biomolécula a analisar contém outros compostos que podem absorver em comprimentos de onda dentro do espectro de absorvência da mistura.

O melhor cenário para a detecção colorimétrica é aquele em que não existe sobreposição do espectro da mistura com os outros espectros (reagentes e compostos da amostra). Deste modo, nas medições não há interferência quer do reagente quer dos compostos da amostra (Figura I.2). O reagente conseguiu desviar o comprimento de

onda, onde a mistura tem um máximo de absorvência, para fora do seu comprimento de onda e do dos outros compostos da amostra. O comprimento de onda utilizado para medir a concentração da biomolécula pretendida é, então, dado pelo máximo da absorvência da mistura ($\lambda \approx 520$ nm).

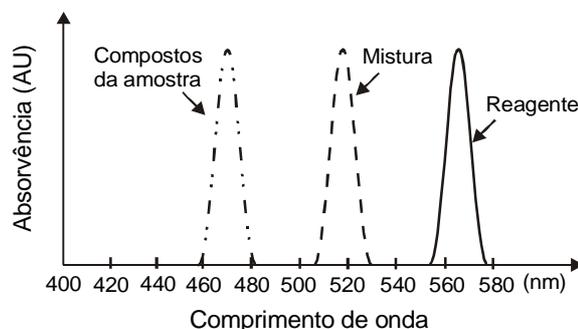


Figura I.2: Espectros sem sobreposição [2].

Uma ocorrência mais comum nas detecções colorimétricas é quando o espectro da mistura tem sobreposição com o espectro do reagente (Figura I.3). É de igual modo utilizado o comprimento de onda onde a mistura tem um máximo de absorvência para analisar a concentração da biomolécula pretendida ($\lambda \approx 530$ nm). Contudo, quando o espectro da mistura e do reagente estão em sobreposição, a absorvência do reagente tem que ser subtraída à da mistura de forma a obter-se apenas a absorvência da biomolécula a analisar.

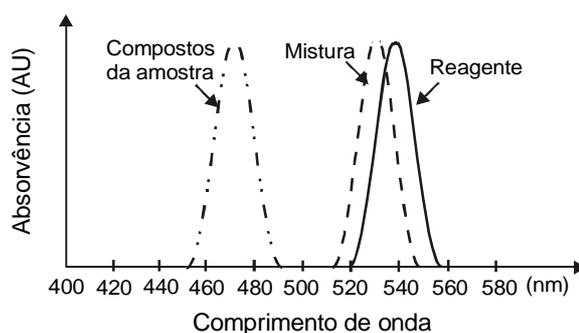


Figura I.3: Espectros do reagente e mistura sobrepostos [2].

Um caso mais difícil é o que se apresenta na Figura I.4 onde quer os compostos da amostra, quer o reagente e quer a mistura têm absorvências no comprimento de onda no qual a mistura tem uma absorvência máxima ($\lambda \approx 480$ nm). Neste caso, o analista tem que medir primeiro a absorvência apenas do reagente e a absorvência apenas dos compostos da amostra para cada comprimento de onda a medir e subtrair estes dois

parâmetros ao valor obtido na mistura. É de igual modo utilizado nas medições o comprimento de onda no qual a mistura tem um máximo de absorvência.

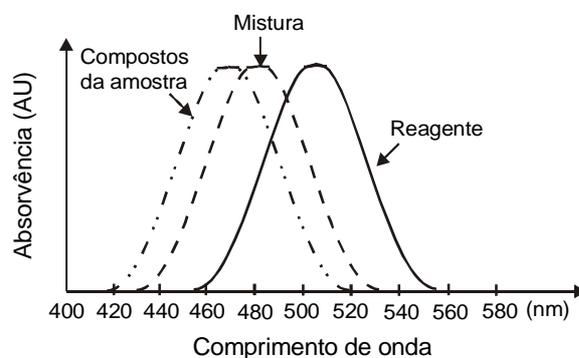


Figura I.4: Espectros da amostra, do reagente, e da mistura sobrepostos [2].

Bibliografia

- [1] SKOOG, A.; EST, D. M. - *Fundamentals of analytical chemistry*. 5ª ed. Saunders College Publishing, Philadelphia, 1987.
- [2] STEWART, K. K.; EBEL, R. E. - *Chemical measurement in biological systems*. John Wiley & Sons, USA, 2000.

ANEXO II

Índices de refração do SiO₂ e do TiO₂

SiO₂(Base de dados da *Sopra Company*, <http://www.sopra-sa.com/indices.htm>)

λ (nm)	n	k	λ (nm)	n	k
163	1.653	0.000	310	1.485	0.000
165	1.643	0.000	318	1.483	0.000
168	1.633	0.000	326	1.481	0.000
170	1.624	0.000	335	1.480	0.000
172	1.616	0.000	344	1.478	0.000
175	1.608	0.000	354	1.476	0.000
177	1.600	0.000	365	1.475	0.000
180	1.592	0.000	376	1.473	0.000
182	1.585	0.000	387	1.472	0.000
185	1.579	0.000	400	1.470	0.000
188	1.573	0.000	413	1.469	0.000
191	1.567	0.000	428	1.467	0.000
194	1.562	0.000	443	1.466	0.000
197	1.556	0.000	459	1.465	0.000
200	1.552	0.000	477	1.464	0.000
203	1.547	0.000	496	1.463	0.000
207	1.543	0.000	517	1.461	0.000
210	1.538	0.000	539	1.460	0.000
214	1.534	0.000	564	1.459	0.000
218	1.531	0.000	590	1.458	0.000
221	1.527	0.000	620	1.457	0.000
225	1.524	0.000	653	1.457	0.000
230	1.521	0.000	689	1.456	0.000
234	1.517	0.000	729	1.455	0.000
238	1.514	0.000	775	1.454	0.000
243	1.511	0.000	827	1.453	0.000
248	1.509	0.000	886	1.452	0.000
253	1.506	0.000	954	1.451	0.000
258	1.503	0.000	1033	1.450	0.000
264	1.501	0.000	1127	1.449	0.000
270	1.498	0.000	1240	1.448	0.000
276	1.496	0.000	1378	1.446	0.000
282	1.494	0.000	1550	1.444	0.000
288	1.491	0.000	1771	1.441	0.000
295	1.489	0.000	2066	1.437	0.000
302	1.487	0.000			

TiO₂

(Base de dados da *Sopra Company*, <http://www.sopra-sa.com/indices.htm>)

λ (nm)	n	k	λ (nm)	n	k	λ (nm)	n	k
180	1.370	1.998	620	2.880	0.000	1060	2.747	0.000
190	1.535	1.831	630	2.875	0.000	1070	2.746	0.000
200	1.536	1.696	640	2.870	0.000	1080	2.745	0.000
210	1.460	1.650	650	2.860	0.000	1090	2.743	0.000
220	1.433	1.806	660	2.850	0.000	1100	2.742	0.000
230	1.443	2.084	670	2.844	0.000	1110	2.741	0.000
240	1.363	2.453	680	2.840	0.000	1120	2.740	0.000
250	1.365	2.847	690	2.835	0.000	1130	2.739	0.000
260	1.627	3.197	700	2.830	0.000	1140	2.738	0.000
270	1.952	3.432	710	2.825	0.000	1150	2.737	0.000
280	3.355	3.561	720	2.820	0.000	1160	2.736	0.000
290	3.835	3.535	730	2.814	0.000	1170	2.735	0.000
300	4.732	3.280	740	2.810	0.000	1180	2.734	0.000
310	5.235	2.734	750	2.810	0.000	1190	2.733	0.000
320	5.391	2.076	760	2.810	0.000	1200	2.732	0.000
330	5.291	1.570	770	2.806	0.000	1210	2.731	0.000
340	4.969	1.093	780	2.800	0.000	1220	2.730	0.000
350	4.477	0.651	790	2.794	0.000	1230	2.729	0.000
360	3.870	0.251	800	2.790	0.000	1240	2.729	0.000
370	3.661	0.033	810	2.790	0.000	1250	2.728	0.000
380	3.498	0.000	820	2.790	0.000	1260	2.728	0.000
390	3.375	0.000	830	2.785	0.000	1270	2.727	0.000
400	3.286	0.000	840	2.780	0.000	1280	2.726	0.000
410	3.225	0.000	850	2.780	0.000	1290	2.726	0.000
420	3.186	0.000	860	2.780	0.000	1300	2.725	0.000
430	3.162	0.000	870	2.775	0.000	1310	2.725	0.000
440	3.149	0.000	880	2.770	0.000	1320	2.725	0.000
450	3.141	0.000	890	2.770	0.000	1330	2.724	0.000
460	3.130	0.000	900	2.770	0.000	1340	2.724	0.000
470	3.104	0.000	910	2.765	0.000	1350	2.723	0.000
480	3.080	0.000	920	2.760	0.000	1360	2.722	0.000
490	3.054	0.000	930	2.759	0.000	1370	2.722	0.000
500	3.030	0.000	940	2.760	0.000	1380	2.721	0.000
510	3.014	0.000	950	2.761	0.000	1390	2.721	0.000
520	3.000	0.000	960	2.760	0.000	1400	2.720	0.000
530	2.985	0.000	970	2.755	0.000	1410	2.719	0.000
540	2.970	0.000	980	2.750	0.000	1420	2.719	0.000
550	2.954	0.000	990	2.749	0.000	1430	2.718	0.000
560	2.940	0.000	1000	2.750	0.000	1440	2.717	0.000
570	2.929	0.000	1010	2.750	0.000	1450	2.716	0.000
580	2.920	0.000	1020	2.749	0.000	1460	2.715	0.000
590	2.910	0.000	1030	2.749	0.000	1470	2.714	0.000
600	2.900	0.000	1040	2.748	0.000	1480	2.713	0.000
610	2.889	0.000	1050	2.747	0.000	1490	2.711	0.000

ANEXO III

Especificações técnicas de filtros ópticos passa-banda da *Schott*

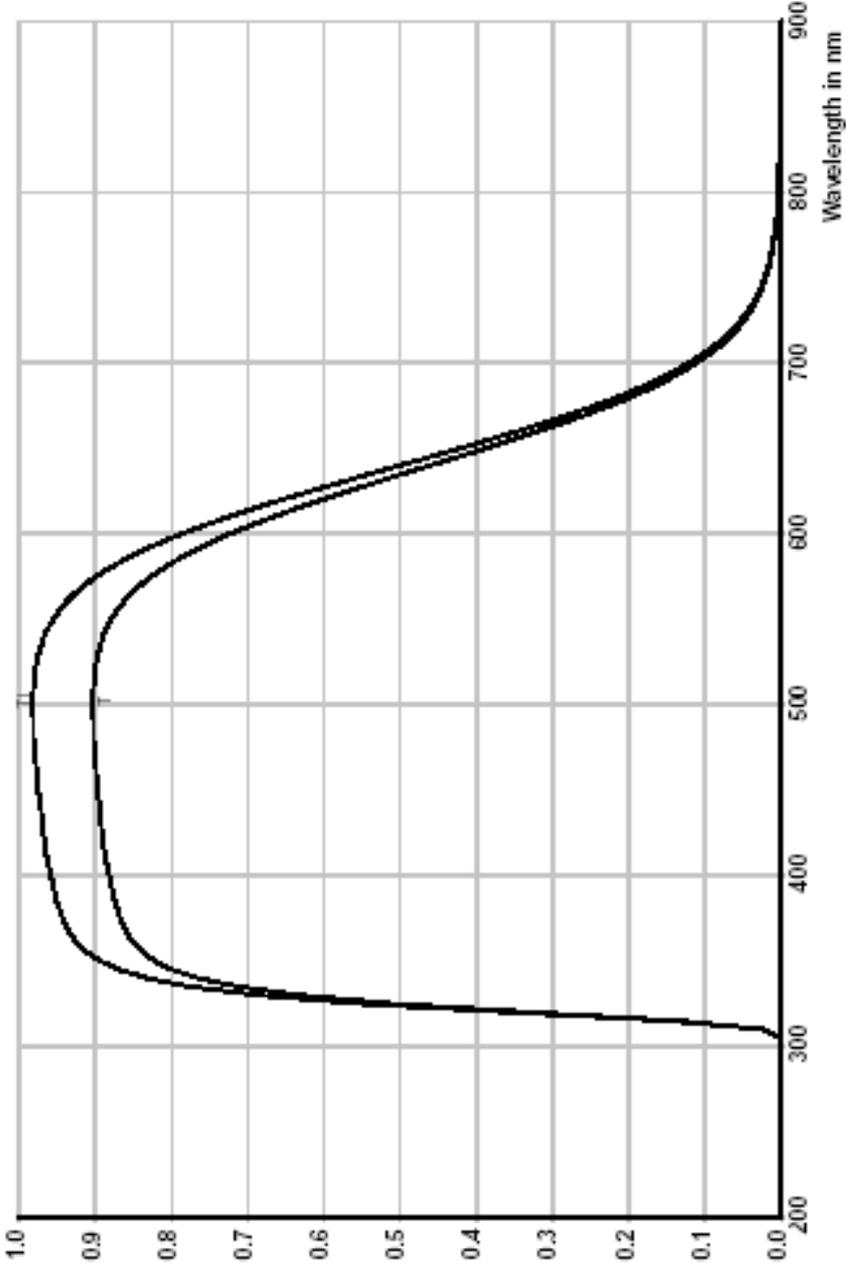
				BG 40																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
Reflection factor P_d 0.92 Bubble content Bubble class 2 Chemical resistance FR class 0 SR class 5.1 AR class 3.0				Density ρ [g/cm ³] 2.67 Transformation temperature T_g [°C] 305 Thermal expansion $\alpha_{30/+70^\circ\text{C}}$ [10 ⁻⁶ /K] 11.9 $\alpha_{20/200^\circ\text{C}}$ [10 ⁻⁶ /K] 13.7 Temperature coefficient T_k [nm/°C]			Per DIN 58191 BP 482/318 Per DIN 58191 KP 641 Ionically colored glass																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
Limit values of τ_i for thickness $d = 1$ mm <table border="1"> <thead> <tr> <th>Wave-length [nm]</th> <th>Limits</th> <th>Value from catalog curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>350</td><td>≥ 0.80</td><td>0.89</td></tr> <tr><td>405</td><td>≥ 0.93</td><td>0.96</td></tr> <tr><td>514</td><td>≥ 0.97</td><td>0.98</td></tr> <tr><td>633</td><td>≤ 0.57</td><td>0.56</td></tr> <tr><td>694</td><td>≤ 0.16</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>1060</td><td>≤ 0.02</td><td>0.01</td></tr> </tbody> </table>				Wave-length [nm]	Limits	Value from catalog curve	350	≥ 0.80	0.89	405	≥ 0.93	0.96	514	≥ 0.97	0.98	633	≤ 0.57	0.56	694	≤ 0.16	0.15	1060	≤ 0.02	0.01	Transmittance τ and internal transmittance τ_i = 1 mm λ [nm] τ τ_i λ [nm] τ τ_i																																																																																																																																																																																																																																																																																												
Wave-length [nm]	Limits	Value from catalog curve																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
350	≥ 0.80	0.89																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
405	≥ 0.93	0.96																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
514	≥ 0.97	0.98																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
633	≤ 0.57	0.56																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
694	≤ 0.16	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1060	≤ 0.02	0.01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Refractive index n λ [nm] Element n 404.7 Hg 1.54 587.6 He 1.53				<table border="1"> <tbody> <tr><td>200</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>700</td><td>0.11</td><td>0.12</td></tr> <tr><td>210</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>710</td><td>0.08</td><td>0.09</td></tr> <tr><td>220</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>720</td><td>0.06</td><td>0.06</td></tr> <tr><td>230</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>730</td><td>0.04</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>240</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>740</td><td>0.03</td><td>0.03</td></tr> <tr><td>250</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>750</td><td>0.02</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>260</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>760</td><td>0.01</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>270</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>770</td><td>0.01</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>280</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>780</td><td>0.008</td><td>0.009</td></tr> <tr><td>290</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>790</td><td>0.006</td><td>0.006</td></tr> <tr><td>300</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>800</td><td>0.005</td><td>0.005</td></tr> <tr><td>310</td><td>0.02</td><td>0.03</td><td>850</td><td>0.002</td><td>0.002</td></tr> <tr><td>320</td><td>0.33</td><td>0.36</td><td>900</td><td>0.003</td><td>0.003</td></tr> <tr><td>330</td><td>0.63</td><td>0.69</td><td>950</td><td>0.004</td><td>0.004</td></tr> <tr><td>340</td><td>0.77</td><td>0.83</td><td>1000</td><td>0.006</td><td>0.006</td></tr> <tr><td>350</td><td>0.82</td><td>0.89</td><td>1060</td><td>0.01</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>360</td><td>0.85</td><td>0.92</td><td>1100</td><td>0.02</td><td>0.02</td></tr> <tr><td>370</td><td>0.86</td><td>0.94</td><td>1200</td><td>0.05</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>380</td><td>0.87</td><td>0.95</td><td>1300</td><td>0.11</td><td>0.12</td></tr> <tr><td>390</td><td>0.88</td><td>0.95</td><td>1400</td><td>0.22</td><td>0.24</td></tr> <tr><td>400</td><td>0.88</td><td>0.96</td><td>1500</td><td>0.37</td><td>0.40</td></tr> <tr><td>410</td><td>0.89</td><td>0.96</td><td>1600</td><td>0.52</td><td>0.56</td></tr> <tr><td>420</td><td>0.89</td><td>0.97</td><td>1700</td><td>0.63</td><td>0.68</td></tr> <tr><td>430</td><td>0.89</td><td>0.97</td><td>1800</td><td>0.69</td><td>0.75</td></tr> <tr><td>440</td><td>0.89</td><td>0.97</td><td>1900</td><td>0.74</td><td>0.80</td></tr> <tr><td>450</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2000</td><td>0.74</td><td>0.80</td></tr> <tr><td>460</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2100</td><td>0.75</td><td>0.81</td></tr> <tr><td>470</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2200</td><td>0.74</td><td>0.80</td></tr> <tr><td>480</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2300</td><td>0.70</td><td>0.76</td></tr> <tr><td>490</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2400</td><td>0.68</td><td>0.74</td></tr> <tr><td>500</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2500</td><td>0.65</td><td>0.71</td></tr> <tr><td>510</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2600</td><td>0.55</td><td>0.60</td></tr> <tr><td>520</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2700</td><td>0.50</td><td>0.54</td></tr> <tr><td>530</td><td>0.90</td><td>0.98</td><td>2800</td><td>0.16</td><td>0.17</td></tr> <tr><td>540</td><td>0.89</td><td>0.97</td><td>2900</td><td>0.14</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>550</td><td>0.88</td><td>0.96</td><td>3000</td><td>0.002</td><td>0.002</td></tr> <tr><td>560</td><td>0.86</td><td>0.94</td><td>3200</td><td>3·10⁻⁵</td><td>3·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>570</td><td>0.84</td><td>0.92</td><td>3400</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>580</td><td>0.81</td><td>0.88</td><td>3600</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>590</td><td>0.77</td><td>0.84</td><td>3800</td><td>5·10⁻⁵</td><td>5·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>600</td><td>0.72</td><td>0.79</td><td>4000</td><td>2·10⁻⁵</td><td>2·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>610</td><td>0.67</td><td>0.73</td><td>4200</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>620</td><td>0.60</td><td>0.66</td><td>4400</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>630</td><td>0.53</td><td>0.58</td><td>4600</td><td>3·10⁻⁵</td><td>3·10⁻⁵</td></tr> <tr><td>640</td><td>0.46</td><td>0.50</td><td>4800</td><td>2·10⁻⁴</td><td>2·10⁻⁴</td></tr> <tr><td>650</td><td>0.39</td><td>0.42</td><td>5000</td><td>3·10⁻⁴</td><td>3·10⁻⁴</td></tr> <tr><td>660</td><td>0.32</td><td>0.35</td><td>5200</td><td>3·10⁻⁴</td><td>3·10⁻⁴</td></tr> <tr><td>670</td><td>0.26</td><td>0.28</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>680</td><td>0.20</td><td>0.22</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>690</td><td>0.15</td><td>0.17</td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>						200	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	700	0.11	0.12	210	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	710	0.08	0.09	220	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	720	0.06	0.06	230	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	730	0.04	0.05	240	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	740	0.03	0.03	250	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	750	0.02	0.02	260	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	760	0.01	0.02	270	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	770	0.01	0.01	280	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	780	0.008	0.009	290	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	790	0.006	0.006	300	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	800	0.005	0.005	310	0.02	0.03	850	0.002	0.002	320	0.33	0.36	900	0.003	0.003	330	0.63	0.69	950	0.004	0.004	340	0.77	0.83	1000	0.006	0.006	350	0.82	0.89	1060	0.01	0.01	360	0.85	0.92	1100	0.02	0.02	370	0.86	0.94	1200	0.05	0.05	380	0.87	0.95	1300	0.11	0.12	390	0.88	0.95	1400	0.22	0.24	400	0.88	0.96	1500	0.37	0.40	410	0.89	0.96	1600	0.52	0.56	420	0.89	0.97	1700	0.63	0.68	430	0.89	0.97	1800	0.69	0.75	440	0.89	0.97	1900	0.74	0.80	450	0.90	0.98	2000	0.74	0.80	460	0.90	0.98	2100	0.75	0.81	470	0.90	0.98	2200	0.74	0.80	480	0.90	0.98	2300	0.70	0.76	490	0.90	0.98	2400	0.68	0.74	500	0.90	0.98	2500	0.65	0.71	510	0.90	0.98	2600	0.55	0.60	520	0.90	0.98	2700	0.50	0.54	530	0.90	0.98	2800	0.16	0.17	540	0.89	0.97	2900	0.14	0.15	550	0.88	0.96	3000	0.002	0.002	560	0.86	0.94	3200	3·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁵	570	0.84	0.92	3400	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	580	0.81	0.88	3600	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	590	0.77	0.84	3800	5·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵	600	0.72	0.79	4000	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	610	0.67	0.73	4200	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	620	0.60	0.66	4400	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	630	0.53	0.58	4600	3·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁵	640	0.46	0.50	4800	2·10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁴	650	0.39	0.42	5000	3·10 ⁻⁴	3·10 ⁻⁴	660	0.32	0.35	5200	3·10 ⁻⁴	3·10 ⁻⁴	670	0.26	0.28				680	0.20	0.22				690	0.15	0.17			
200	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	700	0.11	0.12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
210	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	710	0.08	0.09																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
220	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	720	0.06	0.06																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
230	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	730	0.04	0.05																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
240	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	740	0.03	0.03																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
250	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	750	0.02	0.02																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
260	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	760	0.01	0.02																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
270	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	770	0.01	0.01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
280	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	780	0.008	0.009																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
290	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	790	0.006	0.006																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
300	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	800	0.005	0.005																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
310	0.02	0.03	850	0.002	0.002																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
320	0.33	0.36	900	0.003	0.003																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
330	0.63	0.69	950	0.004	0.004																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
340	0.77	0.83	1000	0.006	0.006																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
350	0.82	0.89	1060	0.01	0.01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
360	0.85	0.92	1100	0.02	0.02																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
370	0.86	0.94	1200	0.05	0.05																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
380	0.87	0.95	1300	0.11	0.12																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
390	0.88	0.95	1400	0.22	0.24																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
400	0.88	0.96	1500	0.37	0.40																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
410	0.89	0.96	1600	0.52	0.56																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
420	0.89	0.97	1700	0.63	0.68																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
430	0.89	0.97	1800	0.69	0.75																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
440	0.89	0.97	1900	0.74	0.80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
450	0.90	0.98	2000	0.74	0.80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
460	0.90	0.98	2100	0.75	0.81																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
470	0.90	0.98	2200	0.74	0.80																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
480	0.90	0.98	2300	0.70	0.76																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
490	0.90	0.98	2400	0.68	0.74																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
500	0.90	0.98	2500	0.65	0.71																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
510	0.90	0.98	2600	0.55	0.60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
520	0.90	0.98	2700	0.50	0.54																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
530	0.90	0.98	2800	0.16	0.17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
540	0.89	0.97	2900	0.14	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
550	0.88	0.96	3000	0.002	0.002																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
560	0.86	0.94	3200	3·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
570	0.84	0.92	3400	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
580	0.81	0.88	3600	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
590	0.77	0.84	3800	5·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
600	0.72	0.79	4000	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
610	0.67	0.73	4200	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
620	0.60	0.66	4400	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
630	0.53	0.58	4600	3·10 ⁻⁵	3·10 ⁻⁵																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
640	0.46	0.50	4800	2·10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁴																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
650	0.39	0.42	5000	3·10 ⁻⁴	3·10 ⁻⁴																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
660	0.32	0.35	5200	3·10 ⁻⁴	3·10 ⁻⁴																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
670	0.26	0.28																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
680	0.20	0.22																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
690	0.15	0.17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Tristimulus values <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>d</th> <th>x</th> <th>y</th> <th>Y</th> <th>λ_d [nm]</th> <th>P_0</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td>1</td><td>0.406</td><td>0.422</td><td>78</td><td>501</td><td>0.09</td></tr> <tr><td>2856</td><td>2</td><td>0.374</td><td>0.431</td><td>69</td><td>500</td><td>0.17</td></tr> <tr><td>K</td><td>3</td><td>0.348</td><td>0.436</td><td>62</td><td>500</td><td>0.23</td></tr> <tr><td></td><td>5</td><td>0.308</td><td>0.443</td><td>52</td><td>499</td><td>0.32</td></tr> <tr><td></td><td>1</td><td>0.383</td><td>0.410</td><td>79</td><td>499</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>3200</td><td>2</td><td>0.352</td><td>0.416</td><td>70</td><td>498</td><td>0.17</td></tr> <tr><td>K</td><td>3</td><td>0.328</td><td>0.419</td><td>63</td><td>498</td><td>0.23</td></tr> <tr><td></td><td>5</td><td>0.291</td><td>0.422</td><td>53</td><td>497</td><td>0.33</td></tr> <tr><td></td><td>1</td><td>0.283</td><td>0.327</td><td>82</td><td>490</td><td>0.11</td></tr> <tr><td>D₆₅</td><td>2</td><td>0.262</td><td>0.325</td><td>75</td><td>491</td><td>0.19</td></tr> <tr><td></td><td>3</td><td>0.246</td><td>0.322</td><td>69</td><td>490</td><td>0.25</td></tr> <tr><td></td><td>5</td><td>0.223</td><td>0.316</td><td>61</td><td>490</td><td>0.34</td></tr> </tbody> </table>					d	x	y	Y	λ_d [nm]	P_0	A	1	0.406	0.422	78	501	0.09	2856	2	0.374	0.431	69	500	0.17	K	3	0.348	0.436	62	500	0.23		5	0.308	0.443	52	499	0.32		1	0.383	0.410	79	499	0.10	3200	2	0.352	0.416	70	498	0.17	K	3	0.328	0.419	63	498	0.23		5	0.291	0.422	53	497	0.33		1	0.283	0.327	82	490	0.11	D ₆₅	2	0.262	0.325	75	491	0.19		3	0.246	0.322	69	490	0.25		5	0.223	0.316	61	490	0.34																																																																																																																																																																																																																							
	d	x	y	Y	λ_d [nm]	P_0																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
A	1	0.406	0.422	78	501	0.09																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
2856	2	0.374	0.431	69	500	0.17																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
K	3	0.348	0.436	62	500	0.23																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	5	0.308	0.443	52	499	0.32																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	1	0.383	0.410	79	499	0.10																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
3200	2	0.352	0.416	70	498	0.17																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
K	3	0.328	0.419	63	498	0.23																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	5	0.291	0.422	53	497	0.33																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	1	0.283	0.327	82	490	0.11																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
D ₆₅	2	0.262	0.325	75	491	0.19																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	3	0.246	0.322	69	490	0.25																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
	5	0.223	0.316	61	490	0.34																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
Application notes Band pass filter - see section 6.7.3 Short pass filter - see section 6.7.2 [!] Long-term changes in the polished surface are possible under some circumstances - see section 5.5 Status June 1997																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
FILTER99 for WINDOWS 95/98 and WINDOWS NT				Catalog Optical Glass Filter, (1999) SCHOTT Glas Mainz																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	

FILTER'99 - CATALOG OPTICAL GLASS FILTER

Glass Filter:
BG 40

Thickness:
1.0 mm

Intern. Transmittance:
Transmittance:



F. L. Arnold, INCORPORATED and MICROVUE, INC.

Catalog Optical Glass Filter (1999) UC1077/GardStar

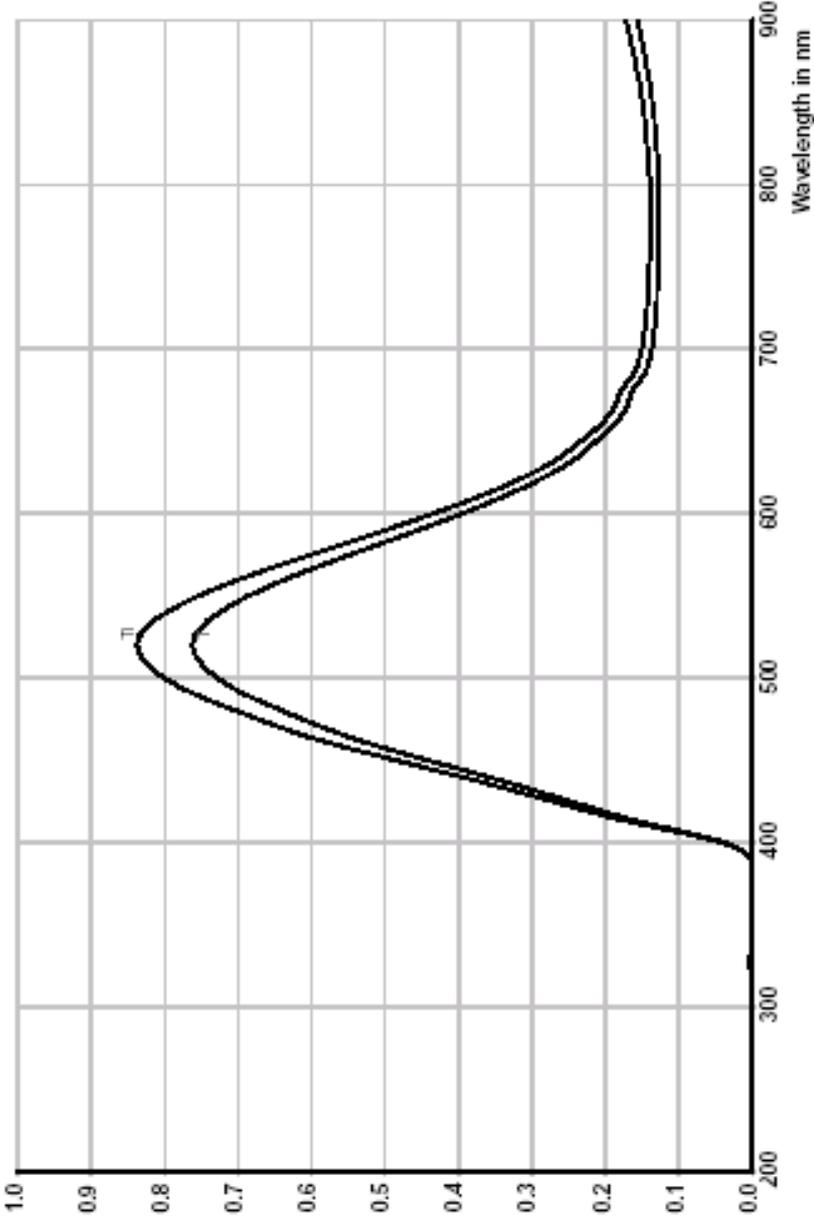
				VG 6																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Reflection factor P_d 0.91 Bubble content Bubble class 1 Chemical resistance FR class 0 SR class 1.0 AR class 1.0				Density ρ [g/cm ³] 2.90 Transformation temperature T_g [°C] 470 Thermal expansion $\alpha_{30/+70^\circ\text{C}}$ [10 ⁻⁶ /K] 9.1 $\alpha_{20/300^\circ\text{C}}$ [10 ⁻⁶ /K] 10.6 Temperature coefficient T_k [nm/°C]			Per DIN 58191 BP 523/160 Per DIN 58191 Ionically colored glass																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
Limit values of τ_i for thickness $d = 1$ mm				Transmittance τ and internal transmittance τ_i = 1 mm																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Wave-length [nm]</th> <th>Limits</th> <th>Value from catalog curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>450</td><td>≤0.62</td><td>0.49</td></tr> <tr><td>514</td><td>≥0.80</td><td>0.83</td></tr> <tr><td>633</td><td>≤0.30</td><td>0.27</td></tr> <tr><td>725</td><td>≤0.17</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>1060</td><td>≤0.34</td><td>0.31</td></tr> </tbody> </table>				Wave-length [nm]	Limits	Value from catalog curve	450	≤0.62	0.49	514	≥0.80	0.83	633	≤0.30	0.27	725	≤0.17	0.14	1060	≤0.34	0.31	<table border="1"> <thead> <tr> <th>λ [nm]</th> <th>τ</th> <th>τ_i</th> <th>λ [nm]</th> <th>τ</th> <th>τ_i</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>700</td><td>0.14</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>210</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>710</td><td>0.13</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>220</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>720</td><td>0.13</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>230</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>730</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>240</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>740</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>250</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>750</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>260</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>760</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>270</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>770</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>280</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>780</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>290</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>790</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>300</td><td><1·10⁻⁵</td><td><1·10⁻⁵</td><td>800</td><td>0.13</td><td>0.14</td></tr> <tr><td>310</td><td>6·10⁻⁵</td><td>7·10⁻⁵</td><td>850</td><td>0.14</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>320</td><td>0.002</td><td>0.002</td><td>900</td><td>0.16</td><td>0.17</td></tr> <tr><td>330</td><td>0.004</td><td>0.004</td><td>950</td><td>0.19</td><td>0.21</td></tr> <tr><td>340</td><td>0.002</td><td>0.002</td><td>1000</td><td>0.23</td><td>0.25</td></tr> <tr><td>350</td><td>2·10⁻⁴</td><td>2·10⁻⁴</td><td>1060</td><td>0.28</td><td>0.31</td></tr> <tr><td>360</td><td>2·10⁻⁵</td><td>2·10⁻⁵</td><td>1100</td><td>0.32</td><td>0.35</td></tr> <tr><td>370</td><td>2·10⁻⁵</td><td>2·10⁻⁵</td><td>1200</td><td>0.42</td><td>0.46</td></tr> <tr><td>380</td><td>9·10⁻⁵</td><td>1·10⁻⁴</td><td>1300</td><td>0.51</td><td>0.56</td></tr> <tr><td>390</td><td>0.003</td><td>0.003</td><td>1400</td><td>0.58</td><td>0.64</td></tr> <tr><td>400</td><td>0.04</td><td>0.04</td><td>1500</td><td>0.65</td><td>0.71</td></tr> <tr><td>410</td><td>0.13</td><td>0.14</td><td>1600</td><td>0.70</td><td>0.77</td></tr> <tr><td>420</td><td>0.21</td><td>0.23</td><td>1700</td><td>0.74</td><td>0.81</td></tr> <tr><td>430</td><td>0.28</td><td>0.31</td><td>1800</td><td>0.77</td><td>0.85</td></tr> <tr><td>440</td><td>0.36</td><td>0.40</td><td>1900</td><td>0.80</td><td>0.88</td></tr> <tr><td>450</td><td>0.44</td><td>0.49</td><td>2000</td><td>0.82</td><td>0.90</td></tr> <tr><td>460</td><td>0.52</td><td>0.57</td><td>2100</td><td>0.83</td><td>0.91</td></tr> <tr><td>470</td><td>0.58</td><td>0.64</td><td>2200</td><td>0.84</td><td>0.92</td></tr> <tr><td>480</td><td>0.64</td><td>0.70</td><td>2300</td><td>0.85</td><td>0.93</td></tr> <tr><td>490</td><td>0.69</td><td>0.76</td><td>2400</td><td>0.85</td><td>0.93</td></tr> <tr><td>500</td><td>0.73</td><td>0.80</td><td>2500</td><td>0.85</td><td>0.93</td></tr> <tr><td>510</td><td>0.75</td><td>0.83</td><td>2600</td><td>0.85</td><td>0.93</td></tr> <tr><td>520</td><td>0.76</td><td>0.84</td><td>2700</td><td>0.84</td><td>0.92</td></tr> <tr><td>530</td><td>0.75</td><td>0.83</td><td>2800</td><td>0.62</td><td>0.68</td></tr> <tr><td>540</td><td>0.73</td><td>0.80</td><td>2900</td><td>0.61</td><td>0.67</td></tr> <tr><td>550</td><td>0.69</td><td>0.76</td><td>3000</td><td>0.58</td><td>0.64</td></tr> <tr><td>560</td><td>0.64</td><td>0.70</td><td>3200</td><td>0.50</td><td>0.55</td></tr> <tr><td>570</td><td>0.58</td><td>0.64</td><td>3400</td><td>0.43</td><td>0.47</td></tr> <tr><td>580</td><td>0.52</td><td>0.57</td><td>3600</td><td>0.40</td><td>0.44</td></tr> <tr><td>590</td><td>0.46</td><td>0.50</td><td>3800</td><td>0.42</td><td>0.46</td></tr> <tr><td>600</td><td>0.40</td><td>0.44</td><td>4000</td><td>0.44</td><td>0.48</td></tr> <tr><td>610</td><td>0.34</td><td>0.38</td><td>4200</td><td>0.36</td><td>0.40</td></tr> <tr><td>620</td><td>0.29</td><td>0.32</td><td>4400</td><td>0.23</td><td>0.25</td></tr> <tr><td>630</td><td>0.25</td><td>0.28</td><td>4600</td><td>0.06</td><td>0.07</td></tr> <tr><td>640</td><td>0.22</td><td>0.25</td><td>4800</td><td>0.009</td><td>0.01</td></tr> <tr><td>650</td><td>0.20</td><td>0.22</td><td>5000</td><td>0.003</td><td>0.003</td></tr> <tr><td>660</td><td>0.18</td><td>0.20</td><td>5200</td><td>9·10⁻⁵</td><td>1·10⁻⁴</td></tr> <tr><td>670</td><td>0.17</td><td>0.18</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>680</td><td>0.16</td><td>0.17</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>690</td><td>0.14</td><td>0.16</td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>						λ [nm]	τ	τ_i	λ [nm]	τ	τ_i	200	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	700	0.14	0.15	210	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	710	0.13	0.15	220	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	720	0.13	0.15	230	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	730	0.13	0.14	240	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	740	0.13	0.14	250	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	750	0.13	0.14	260	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	760	0.13	0.14	270	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	770	0.13	0.14	280	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	780	0.13	0.14	290	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	790	0.13	0.14	300	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	800	0.13	0.14	310	6·10 ⁻⁵	7·10 ⁻⁵	850	0.14	0.15	320	0.002	0.002	900	0.16	0.17	330	0.004	0.004	950	0.19	0.21	340	0.002	0.002	1000	0.23	0.25	350	2·10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁴	1060	0.28	0.31	360	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	1100	0.32	0.35	370	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	1200	0.42	0.46	380	9·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁴	1300	0.51	0.56	390	0.003	0.003	1400	0.58	0.64	400	0.04	0.04	1500	0.65	0.71	410	0.13	0.14	1600	0.70	0.77	420	0.21	0.23	1700	0.74	0.81	430	0.28	0.31	1800	0.77	0.85	440	0.36	0.40	1900	0.80	0.88	450	0.44	0.49	2000	0.82	0.90	460	0.52	0.57	2100	0.83	0.91	470	0.58	0.64	2200	0.84	0.92	480	0.64	0.70	2300	0.85	0.93	490	0.69	0.76	2400	0.85	0.93	500	0.73	0.80	2500	0.85	0.93	510	0.75	0.83	2600	0.85	0.93	520	0.76	0.84	2700	0.84	0.92	530	0.75	0.83	2800	0.62	0.68	540	0.73	0.80	2900	0.61	0.67	550	0.69	0.76	3000	0.58	0.64	560	0.64	0.70	3200	0.50	0.55	570	0.58	0.64	3400	0.43	0.47	580	0.52	0.57	3600	0.40	0.44	590	0.46	0.50	3800	0.42	0.46	600	0.40	0.44	4000	0.44	0.48	610	0.34	0.38	4200	0.36	0.40	620	0.29	0.32	4400	0.23	0.25	630	0.25	0.28	4600	0.06	0.07	640	0.22	0.25	4800	0.009	0.01	650	0.20	0.22	5000	0.003	0.003	660	0.18	0.20	5200	9·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁴	670	0.17	0.18				680	0.16	0.17				690	0.14	0.16			
Wave-length [nm]	Limits	Value from catalog curve																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
450	≤0.62	0.49																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
514	≥0.80	0.83																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
633	≤0.30	0.27																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
725	≤0.17	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
1060	≤0.34	0.31																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
λ [nm]	τ	τ_i	λ [nm]	τ	τ_i																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
200	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	700	0.14	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
210	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	710	0.13	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
220	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	720	0.13	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
230	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	730	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
240	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	740	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
250	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	750	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
260	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	760	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
270	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	770	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
280	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	780	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
290	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	790	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
300	<1·10 ⁻⁵	<1·10 ⁻⁵	800	0.13	0.14																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
310	6·10 ⁻⁵	7·10 ⁻⁵	850	0.14	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
320	0.002	0.002	900	0.16	0.17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
330	0.004	0.004	950	0.19	0.21																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
340	0.002	0.002	1000	0.23	0.25																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
350	2·10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁴	1060	0.28	0.31																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
360	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	1100	0.32	0.35																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
370	2·10 ⁻⁵	2·10 ⁻⁵	1200	0.42	0.46																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
380	9·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁴	1300	0.51	0.56																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
390	0.003	0.003	1400	0.58	0.64																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
400	0.04	0.04	1500	0.65	0.71																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
410	0.13	0.14	1600	0.70	0.77																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
420	0.21	0.23	1700	0.74	0.81																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
430	0.28	0.31	1800	0.77	0.85																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
440	0.36	0.40	1900	0.80	0.88																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
450	0.44	0.49	2000	0.82	0.90																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
460	0.52	0.57	2100	0.83	0.91																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
470	0.58	0.64	2200	0.84	0.92																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
480	0.64	0.70	2300	0.85	0.93																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
490	0.69	0.76	2400	0.85	0.93																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
500	0.73	0.80	2500	0.85	0.93																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
510	0.75	0.83	2600	0.85	0.93																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
520	0.76	0.84	2700	0.84	0.92																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
530	0.75	0.83	2800	0.62	0.68																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
540	0.73	0.80	2900	0.61	0.67																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
550	0.69	0.76	3000	0.58	0.64																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
560	0.64	0.70	3200	0.50	0.55																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
570	0.58	0.64	3400	0.43	0.47																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
580	0.52	0.57	3600	0.40	0.44																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
590	0.46	0.50	3800	0.42	0.46																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
600	0.40	0.44	4000	0.44	0.48																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
610	0.34	0.38	4200	0.36	0.40																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
620	0.29	0.32	4400	0.23	0.25																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
630	0.25	0.28	4600	0.06	0.07																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
640	0.22	0.25	4800	0.009	0.01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
650	0.20	0.22	5000	0.003	0.003																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
660	0.18	0.20	5200	9·10 ⁻⁵	1·10 ⁻⁴																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
670	0.17	0.18																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
680	0.16	0.17																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
690	0.14	0.16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
Refractive index n λ [nm] Element n 480 Cd 1.56 587.6 He 1.55																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Tristimulus values <table border="1"> <thead> <tr> <th>d [mm]</th> <th>x</th> <th>y</th> <th>Y</th> <th>λ_d [nm]</th> <th>P_e</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A 1</td><td>0.383</td><td>0.463</td><td>54</td><td>512</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>2856 2</td><td>0.330</td><td>0.513</td><td>35</td><td>513</td><td>0.28</td></tr> <tr><td>K 3</td><td>0.290</td><td>0.554</td><td>25</td><td>513</td><td>0.38</td></tr> <tr><td>5</td><td>0.236</td><td>0.615</td><td>14</td><td>515</td><td>0.52</td></tr> <tr><td>1</td><td>0.363</td><td>0.455</td><td>55</td><td>511</td><td>0.15</td></tr> <tr><td>3200 2</td><td>0.314</td><td>0.505</td><td>37</td><td>512</td><td>0.27</td></tr> <tr><td>K 3</td><td>0.277</td><td>0.547</td><td>26</td><td>513</td><td>0.37</td></tr> <tr><td>5</td><td>0.227</td><td>0.609</td><td>14</td><td>515</td><td>0.51</td></tr> <tr><td>1</td><td>0.276</td><td>0.390</td><td>59</td><td>513</td><td>0.13</td></tr> <tr><td>D₆₅ 2</td><td>0.246</td><td>0.445</td><td>42</td><td>515</td><td>0.24</td></tr> <tr><td>3</td><td>0.223</td><td>0.492</td><td>30</td><td>516</td><td>0.33</td></tr> <tr><td>5</td><td>0.192</td><td>0.567</td><td>18</td><td>518</td><td>0.48</td></tr> </tbody> </table>				d [mm]	x	y	Y	λ_d [nm]	P_e	A 1	0.383	0.463	54	512	0.15	2856 2	0.330	0.513	35	513	0.28	K 3	0.290	0.554	25	513	0.38	5	0.236	0.615	14	515	0.52	1	0.363	0.455	55	511	0.15	3200 2	0.314	0.505	37	512	0.27	K 3	0.277	0.547	26	513	0.37	5	0.227	0.609	14	515	0.51	1	0.276	0.390	59	513	0.13	D ₆₅ 2	0.246	0.445	42	515	0.24	3	0.223	0.492	30	516	0.33	5	0.192	0.567	18	518	0.48																																																																																																																																																																																																																																																												
d [mm]	x	y	Y	λ_d [nm]	P_e																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
A 1	0.383	0.463	54	512	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
2856 2	0.330	0.513	35	513	0.28																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
K 3	0.290	0.554	25	513	0.38																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
5	0.236	0.615	14	515	0.52																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
1	0.363	0.455	55	511	0.15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
3200 2	0.314	0.505	37	512	0.27																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
K 3	0.277	0.547	26	513	0.37																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
5	0.227	0.609	14	515	0.51																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
1	0.276	0.390	59	513	0.13																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
D ₆₅ 2	0.246	0.445	42	515	0.24																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
3	0.223	0.492	30	516	0.33																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
5	0.192	0.567	18	518	0.48																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
Application notes Band pass filter - see section 6.7.3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
Status June 1997																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
FILTER99 for WINDOWS 95/98 and WINDOWS NT				Catalog Optical Glass Filter, (1999) SCHOTT Glas Mainz																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

FILTER'99 - CATALOG OPTICAL GLASS FILTER

Glass Filter:
VG 6

Thickness:
1.0 mm

Intern. Transmittance:
Transmittance:



F.L. FERRARIS - MICROINSTRUMENTAZIONE

Catalogo dei Filtri in Vetro (1999)

ANEXO IV

Principais esquemas da electrónica de leitura

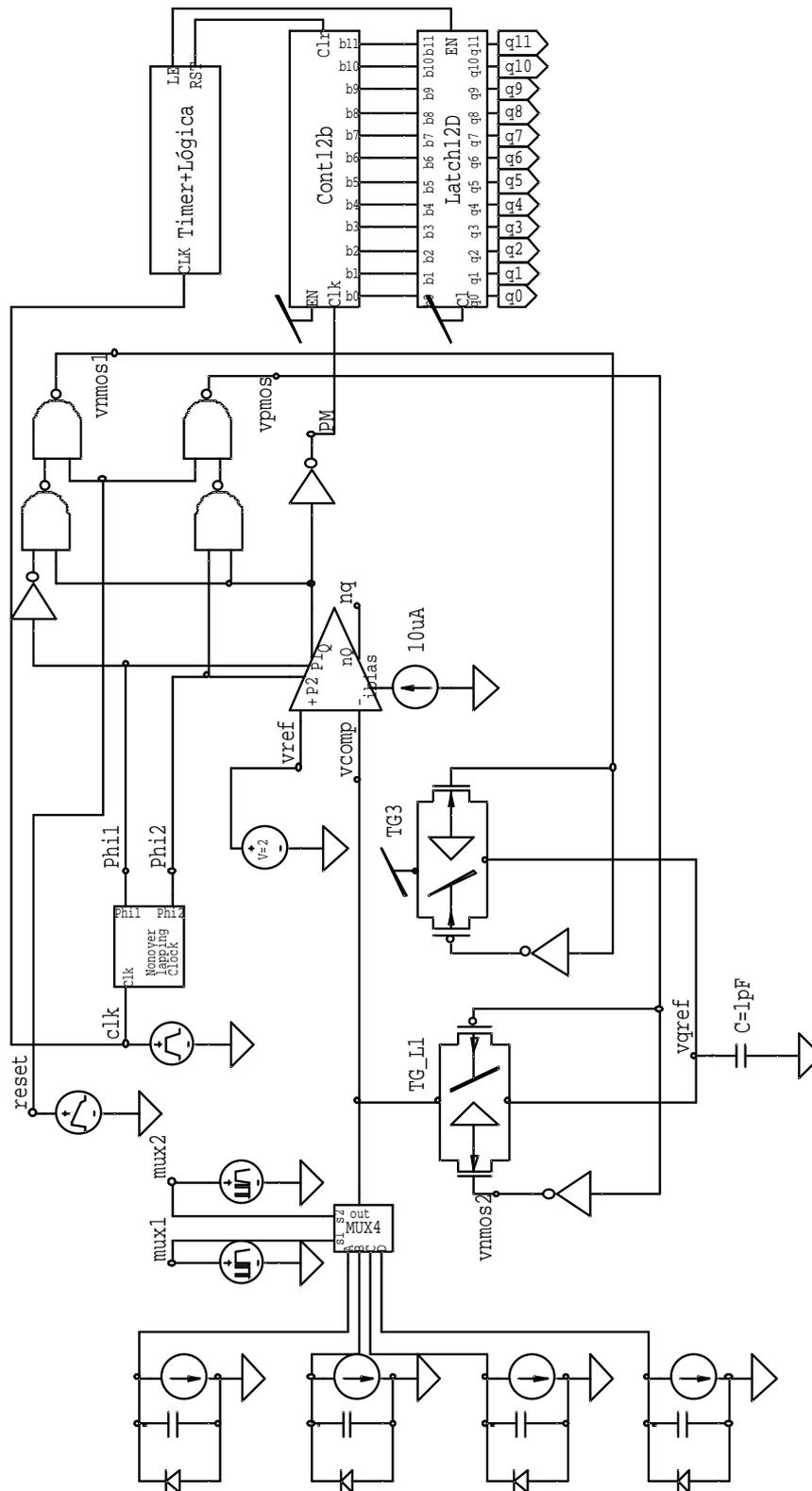


Figura IV.1: Esquema detalhado do conversor luz - frequência.

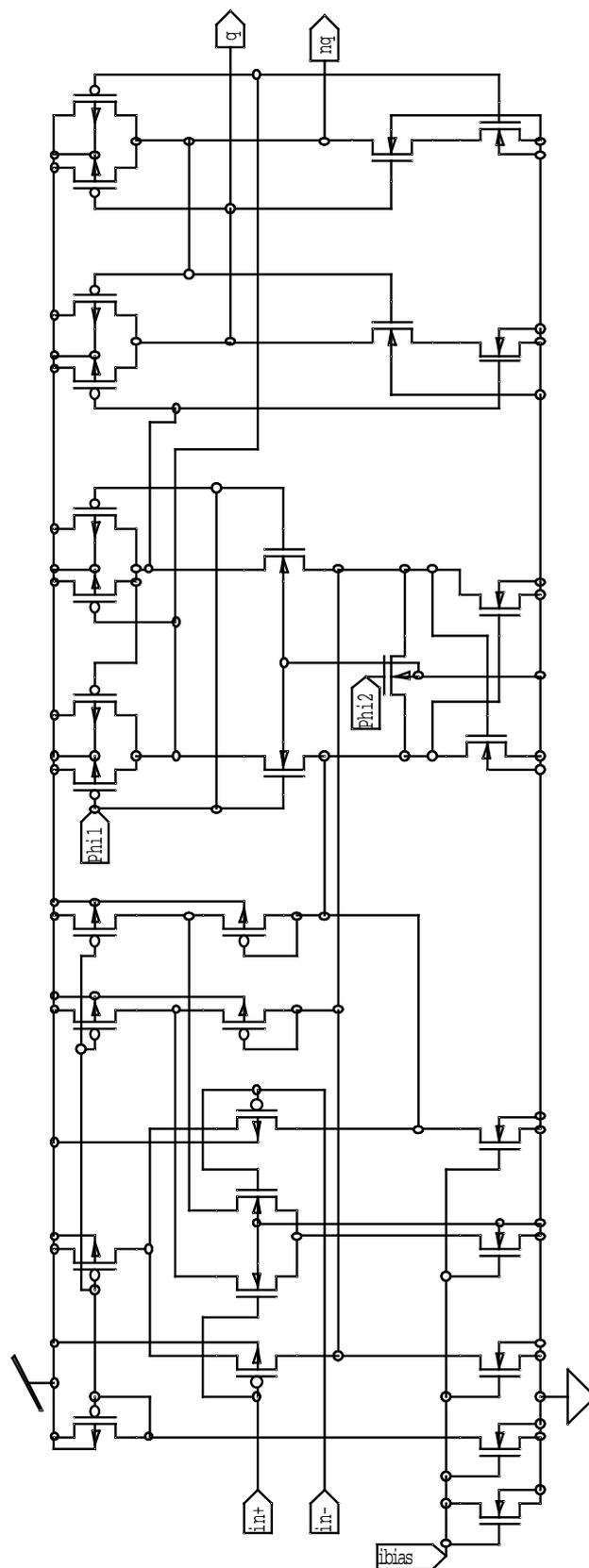


Figura IV.2: Esquema detalhado do comparador.

ANEXO V

Sequência de fabrico da estrutura multicamada da Tabela 4.6

A Figura V.1 ilustra a configuração das máscaras e respectivas espessuras necessárias para o fabrico da matriz de 16 filtros ópticos descritos na Tabela 4.6 e cujos espectros de transmissão foram apresentados na Figura 4.19.

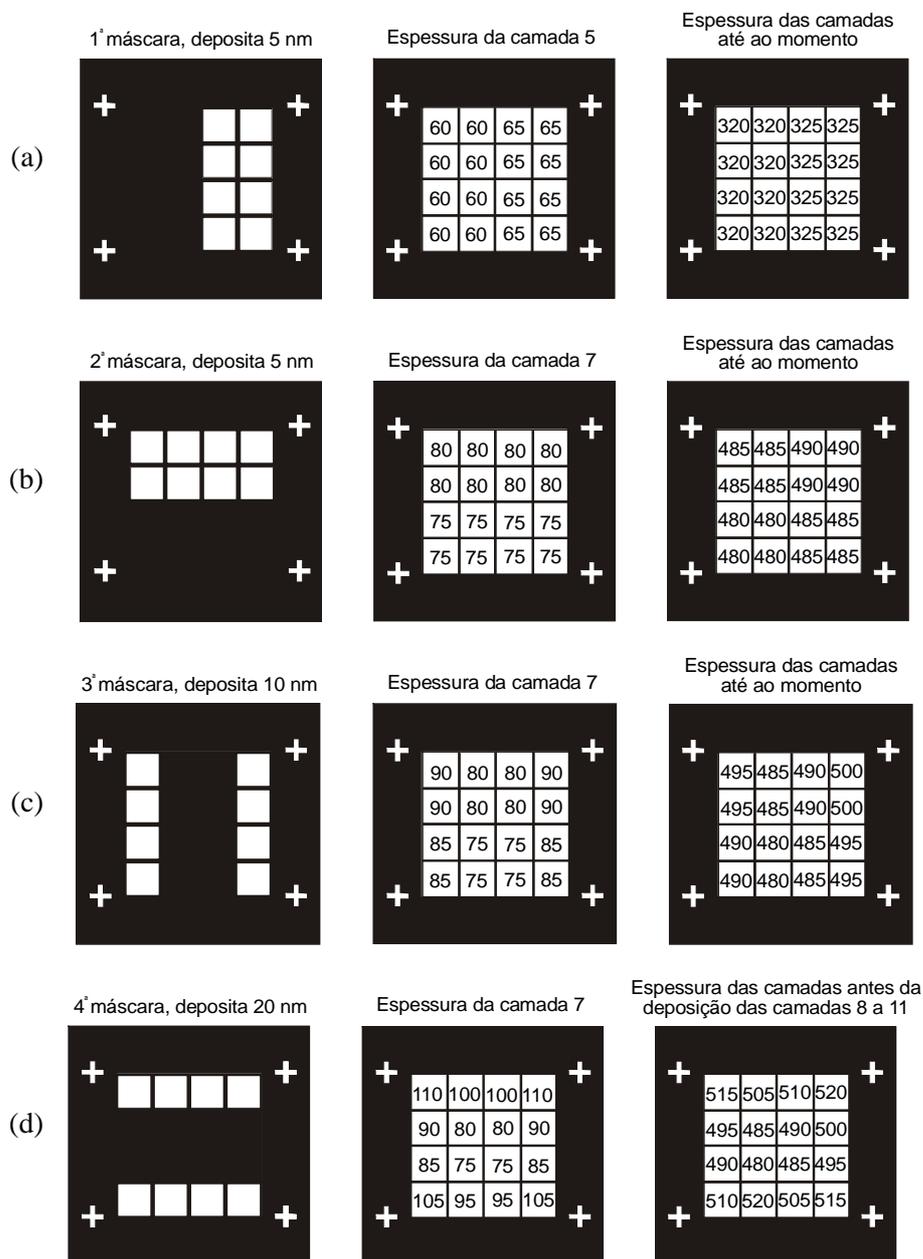


Figura V.1: Máscaras e espessuras em nanómetros da matriz de 16 filtros ópticos descrita na Tabela 4.6. As cruzeiras são marcas para o alinhamento das máscaras.

Após a deposição das 5 primeiras camadas em toda a matriz, sendo depositada apenas uma espessura de 60 nm na camada 5, é utilizada a 1ª máscara para depositar mais 5 nm de TiO₂ em apenas metade da matriz. Obtém-se assim os valores das

espessuras apresentados na Figura V.1(a). Seguidamente deposita-se, em toda a matriz, as camadas 6 e 7, esta última com 75 nm de espessura. Aplica-se a 2ª máscara para depositar mais 5 nm na camada 7, ficando esta camada com duas zonas de espessuras diferentes (Figura V.1(b)). Aplica-se a 3ª máscara e com ela deposita-se mais 10 nm na camada 7, ficando esta camada com quatro zonas de espessuras diferentes (Figura V.1(c)). Ao aplicar-se a 4ª máscara depositando-se mais 20 nm na camada 7 concluem-se as 8 espessuras diferentes para esta camada (Figura V.1(d)). Por fim, deposita-se em toda a matriz as camadas 8 a 11.

A posição dos 16 filtros ópticos na matriz encontra-se na Figura V.2.

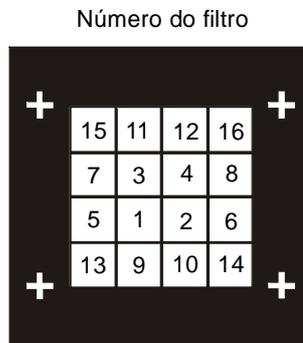
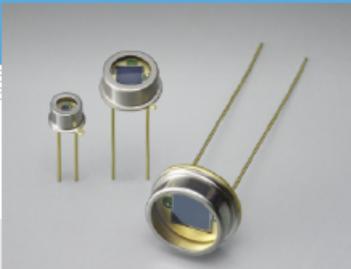


Figura V.2: Posição dos 16 filtros ópticos na matriz, utilizando as máscaras descritas na Figura V.1 e as espessuras apresentadas na Tabela 4.6.

ANEXO VI

Especificações técnicas do fotodíodo comercial S1336-5BQ da *Hamamatsu*

PHOTODIODE



Si photodiode **S1336 series**

UV to near IR for precision photometry

Features

Applications

- High sensitivity
- Low capacitance
- High reliability

- Analytical instruments
- Optical measurement equipment

■ General ratings / Absolute maximum ratings

Type No.	Dimensional outline/ Window material *	Package (mm)	Active area size (mm)	Effective active area (mm ²)	Absolute maximum rating				
					Reverse voltage V _R Max. (V)	Operating temperature T _{opr} (°C)	Storage temperature T _{stg} (°C)		
S1336-18BQ	①/Q	TO-18	1.1 × 1.1	1.2	5	-20 to +60	-55 to +80		
S1336-18BK	①/K					-40 to +100	-55 to +125		
S1336-5BQ	②/Q	TO-5	2.4 × 2.4	5.7		-20 to +60	-55 to +80		
S1336-5BK	②/K					-40 to +100	-55 to +125		
S1336-44BQ	②/Q					3.6 × 3.6	13	-20 to +60	-55 to +80
S1336-44BK	②/K							-40 to +100	-55 to +125
S1336-8BQ	③/Q	TO-8	5.8 × 5.8	33		-20 to +60	-55 to +80		
S1336-8BK	③/K					-40 to +100	-55 to +125		

■ Electrical and optical characteristics (Typ. T_a=25 °C, unless otherwise noted)

Type No.	Spectral response range λ (nm)	Peak sensitivity wavelength λ _p (nm)	Photo sensitivity S (A/W)			Short circuit current I _{sc} 100 lx		Dark current I _d V _R =10 mV Max. (pA)	Temp. coefficient of I _d T _C /I _d (times/°C)	Rise time t _r V _R =0 V R _L =1 kΩ (μs)	Terminal capacitance C _t V _R =0 V f=10 kHz (pF)	Shunt resistance R _{sh} V _R =10 mV		NEP (W/Hz ^{1/2})					
			λ _p	200 nm		He-Ne laser 633 nm	Min. (μA)					Typ. (μA)	Min. (GΩ)		Typ. (GΩ)				
				Min.	Typ.														
S1336-18BQ	190 to 1100	960	0.5	0.10	0.12	0.33	1	1.2	20	0.1	20	0.5	2	5.7 × 10 ⁻¹⁵					
S1336-18BK	320 to 1100														-	-			
S1336-5BQ	190 to 1100														0.10	0.12	4	5	30
S1336-5BK	320 to 1100														-	-	8	10	50
S1336-44BQ	190 to 1100														0.10	0.12	22	28	100
S1336-44BK	320 to 1100														-	-	-	-	-
S1336-8BQ	190 to 1100														0.10	0.12	-	-	-
S1336-8BK	320 to 1100														-	-	-	-	-

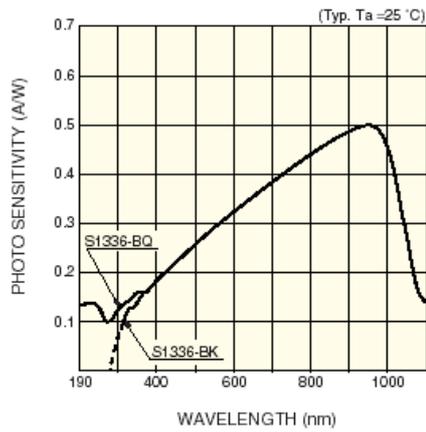
* Window material, K: borosilicate glass, Q: quartz glass



HAMAMATSU

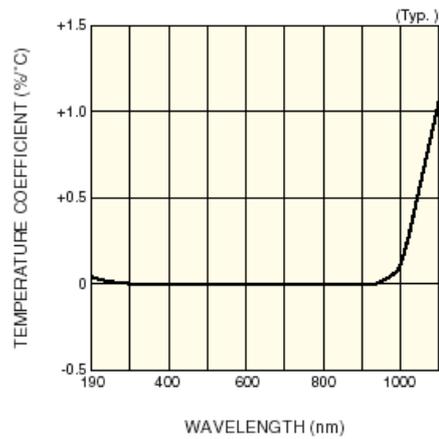
Si photodiode **S1336 series**

■ Spectral response



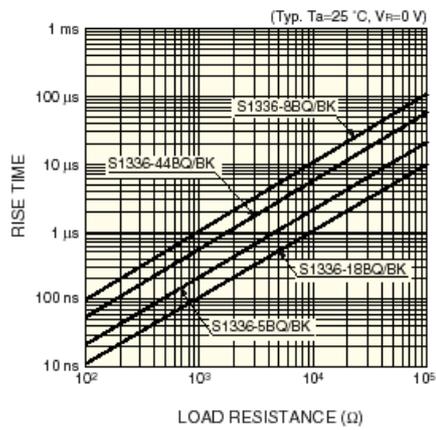
KSPCE036EA

■ Photo sensitivity temperature characteristic



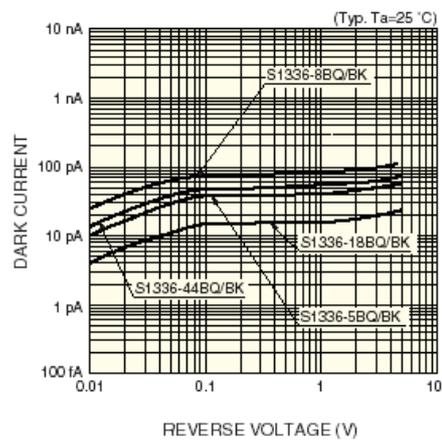
KSPCE036EB

■ Rise time vs. load resistance



KSPCE036EA

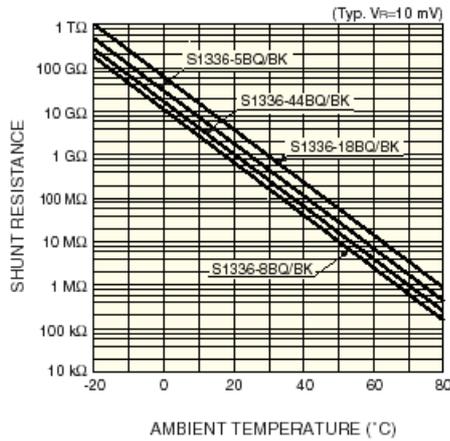
■ Dark current vs. reverse voltage



KSPCE0103EA

Si photodiode S1336 series

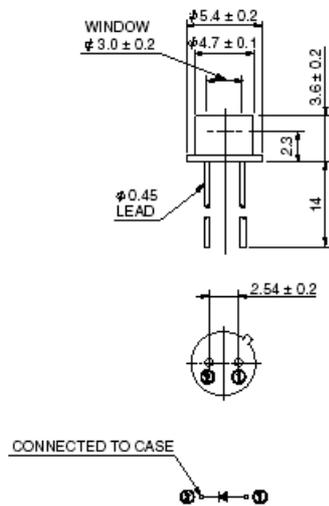
■ Shunt resistance vs. ambient temperature



KSPCAD016A

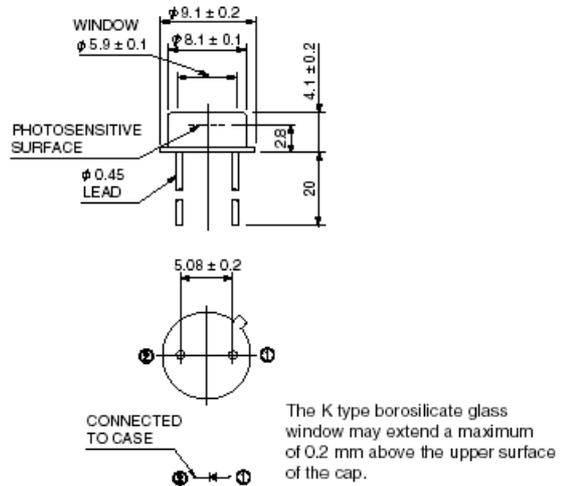
■ Dimensional outlines (unit: mm)

① S1336-18BQ/-18BK



KSPCAD032E

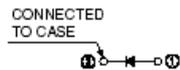
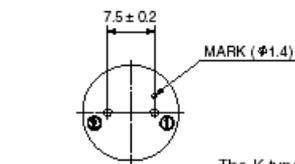
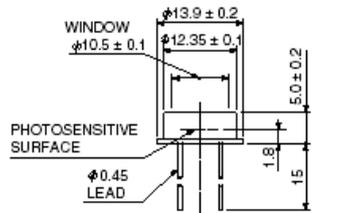
② S1336-5BQ/K, S1336-44BQ/K



KSPCAD032EA

Si photodiode S1336 series

③ S1336-8BQ/-8BK



The K type borosilicate glass window may extend a maximum of 0.2 mm above the upper surface of the cap.

KSPD0102EA

HAMAMATSU

Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions. Specifications are subject to change without notice. No patent rights are granted to any of the circuits described herein. ©2002 Hamamatsu Photonics K.K.

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Solid State Division

1126-1 Ichino-cho, Hamamatsu City, 435-8558 Japan, Telephone: (81) 053-434-3311, Fax: (81) 053-434-5184, <http://www.hamamatsu.com>

U.S.A.: Hamamatsu Corporation, 390 Foothill Road, P.O. Box 6910, Bridgewater, N.J. 08907-0910, U.S.A., Telephone: (1) 908-231-0990, Fax: (1) 908-231-1218

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Arzbangstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49) 08152-3750, Fax: (49) 08152-2658

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L., 5, Rue du Saule Trapu, Parc du Moulin de Massy, 91892 Massy Cedex, France, Telephone: 33(1) 69 53 71 00, Fax: 33(1) 69 53 71 10

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited, 2 Howard Court, Welwyn Garden City, Hertfordshire AL7 1BW, United Kingdom, Telephone: (44) 1707-254888, Fax: (44) 1707-325777

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB, Smideavägen 12, SE-171 41 Soha, Sweden, Telephone: (46) 8-509-031-00, Fax: (46) 8-509-031-01

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L., Strada della Moia, 1/E, 20020 Arese, (Milano), Italy, Telephone: (39) 02-935-81-733, Fax: (39) 02-935-81-741

Cat. No. KSPD1022
Oct. 2002 DN

ANEXO VII

Constantes físicas, eléctricas e prefixos nas unidades de engenharia

Constantes físicas e eléctricas

Nome	Símbolo	Valor
Permitividade eléctrica do vazio	ϵ_0	$8.854187817 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$
Permeabilidade magnética do vazio	μ_0	$4\pi \times 10^{-7} \text{ NA}^{-2}$
Constante dieléctrica SiO ₂	ϵ_{SiO_2}	$3.97\epsilon_0$
Constante de <i>Planck</i>	h	$6.62606876 \times 10^{-34} \text{ J s}$
Número de <i>Avogadro</i>	N_{AV}	$6.02214199 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Velocidade da luz no vazio	c_0	$2.99792458 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$
Carga do electrão	q	$1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$
Electrão Volt	eV	$1.602 \times 10^{-19} \text{ J}$

Prefixos nas unidades de engenharia

Factor multiplicativo	Prefixo	Símbolo
10^{12}	Tera	T
10^9	Giga	G
10^6	Mega	M
10^3	Kilo	k
10^2	Hecto	h
10	Deca	da
10^{-1}	Deci	d
10^{-2}	Centi	c
10^{-3}	Mili	m
10^{-6}	Micro	μ
10^{-9}	Nano	n
10^{-12}	Pico	p
10^{-15}	Fento	f
10^{-18}	ato	a