

Sistemas UV-VIS y FTIR de altas prestaciones para la caracterización de muestras biológicas y materiales

Agilent Technologies

Espectroscopía molecular UV-Vis-IR de altas prestaciones

- Hay ciertos tipos de análisis en los que resulta importante disponer de equipos de elevadas prestaciones técnicas para caracterizar las muestras.

  Nuevos materiales: Análisis de capas finas, SAM´s, nanotubos, grafeno, fullerenos, quantum dots, propiedades ópticas, semiconductores, fibras y sensores ópticos.

  Catálisis: Estudios de adsorción, “catálisis in situ”, cinéticas.

  Polímeros: Copolímeros, adhesivos, tacticidad, cristalinidad, control de síntesis, curado, envejecimiento, microanálisis.

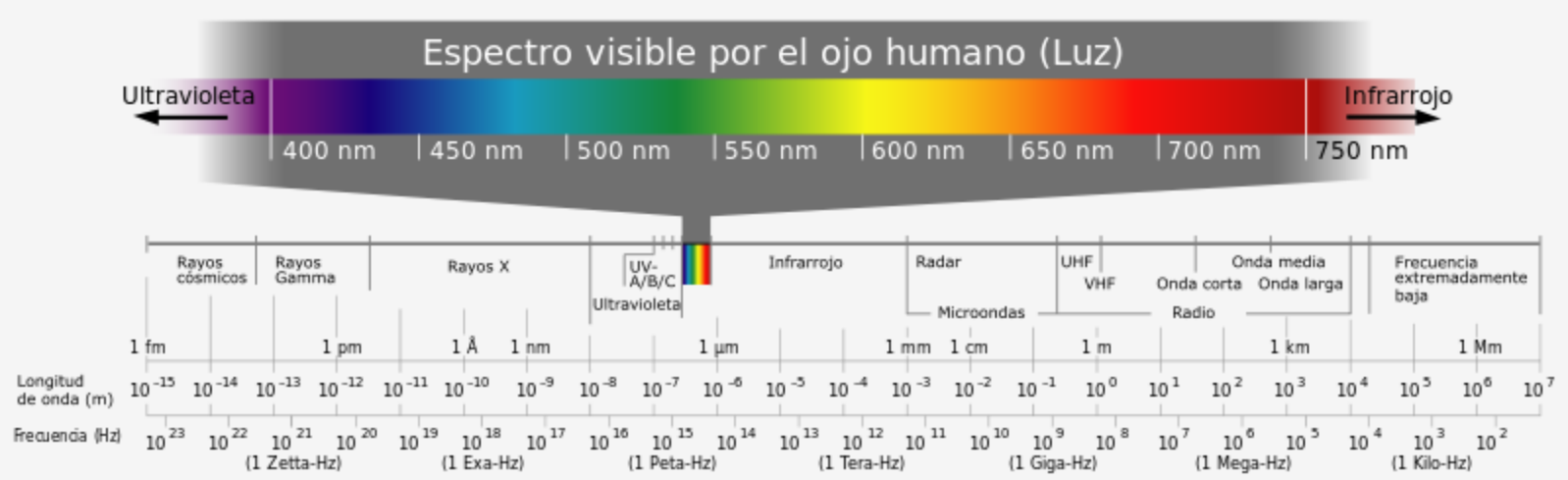
  Pinturas: Caracterización, análisis de color, microscopía.

  Biología: Dinámica y estructura de proteínas. Biosensores. Análisis de tejidos.

  Toxicología/Criminología: Análisis de fibras, paint chips, drogas, huellas.

- El análisis de las muestras en muchos de los casos puede realizarse por medios no destructivos.
- Permite tanto ensayos de identificación como análisis cuantitativo.
- Análisis a nivel macroscópico como microscópico.

Zona del espectro electromagnético UV-Vis-IR



Equipos de óptica dispersiva



UV-Vis-Nir
Cary 4000,5000 y 6000

Equipos por transformada de Fourier



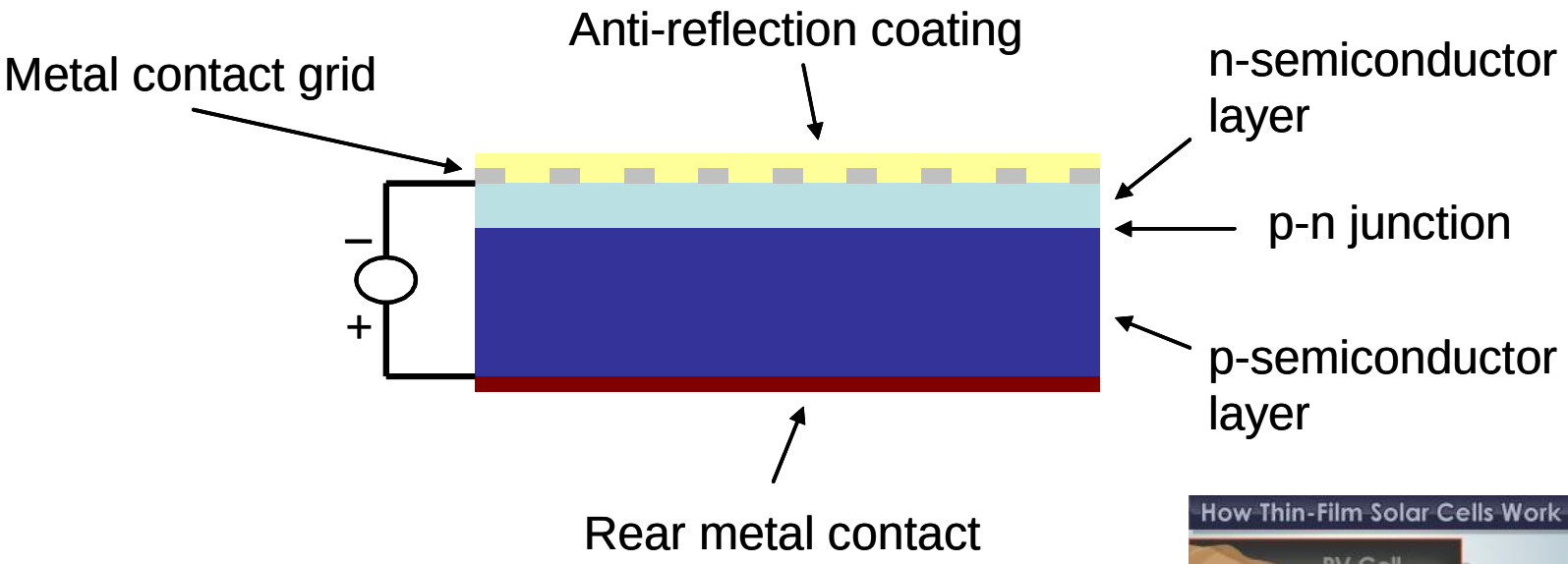
Vis-Nir-MIR-FIR
Agilent 660,670 y 680

Primer ejemplo:



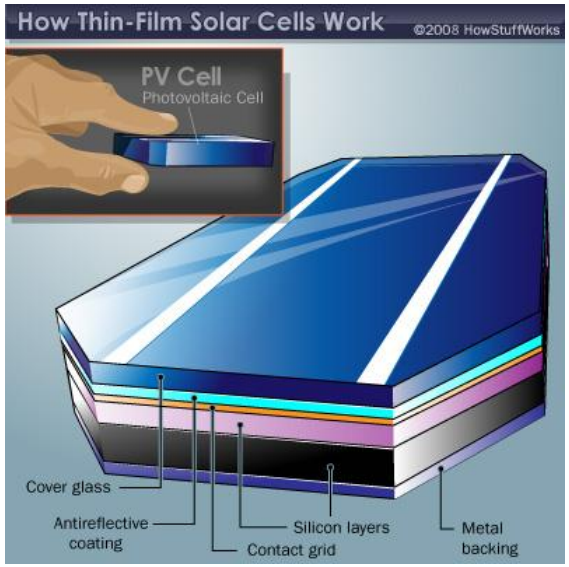
Análisis de materiales empleados en células fotovoltaicas por UV-Vis-NIR

Esquema de una célula fotovoltaica

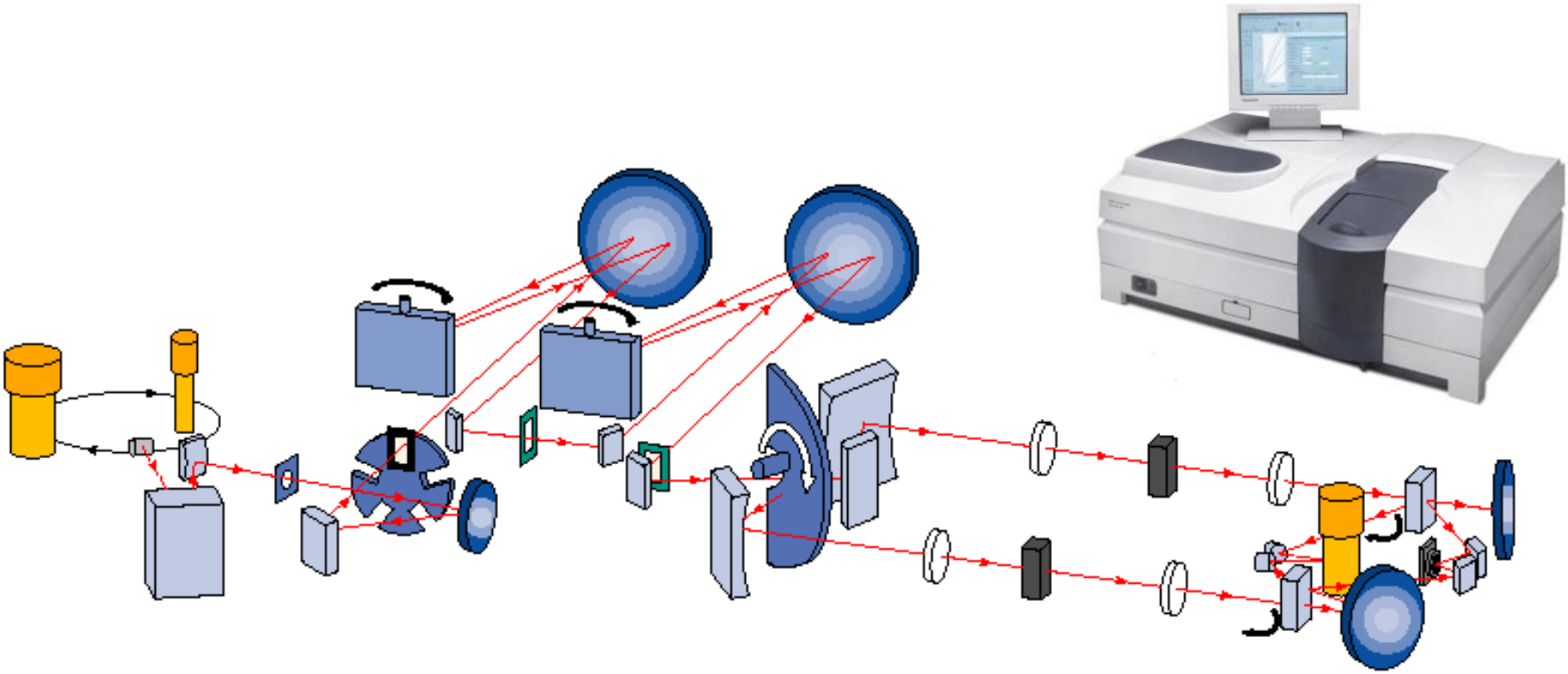


El estudio por UV-Vis-Nir, permite obtener información para:

- la caracterización de las deposiciones para generar los recubrimientos.
- La reflectividad de la muestra a diferentes ángulos.
- Análisis de los band gaps de semiconductores



Esquema òptico equipo de altas prestaciones

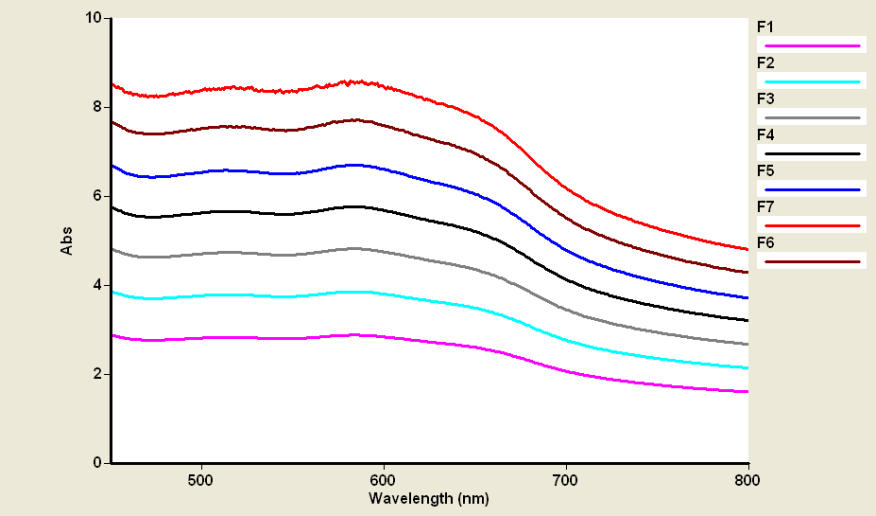


Sistema óptico Littrow fuera de plano

Cary 4000, Cary 5000 y Cary 6000

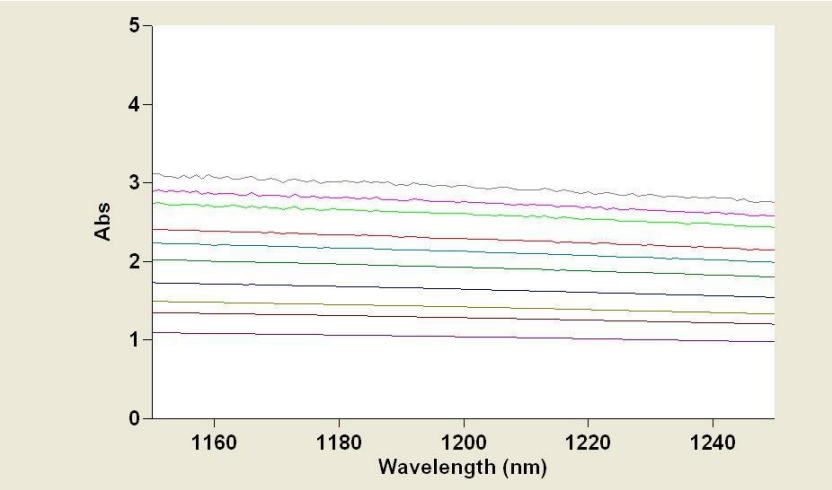
Alta resolución (<0.047 nm)
Bajísima luz difusa (<0.00007)
9 Unidades de Absorbancia
Altísima estabilidad (<0.00018)

ESPECTROSCOPÍA DE MUESTRAS SOLIDAS O LIQUIDAS: AGILENT CARY 4000/5000/6000



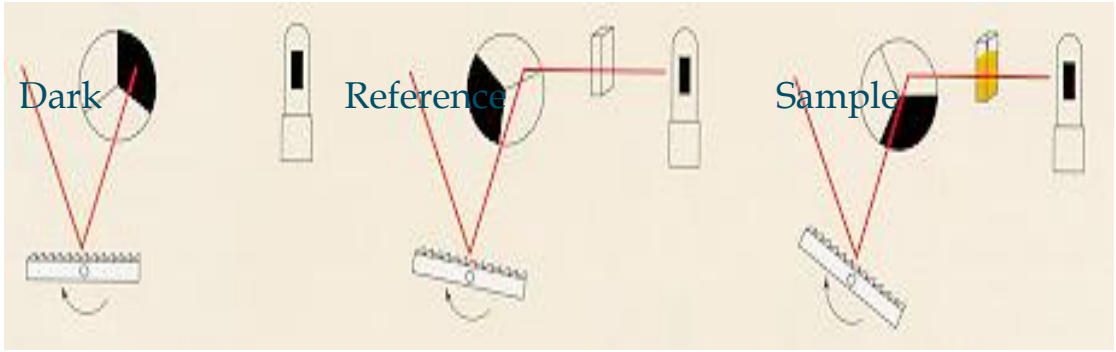
Hasta 9 UA de linealidad.
Medidas con filtros Hellma a partir de cristal Schott NG1.
Una calibración a Abs@546 nm vs. grosor nominal de los filtros permite obtener un coeficiente de correlación de $r^2 = 0.999951$

Más de 6 UA de linealidad con esfera integradora en UV-Vis y más de 3 en NIR con Cary 5000
. Medidas con filtros Hellma a partir de cristal Schott NG1.



Non-Measurement Phase Stepping (NMPS)

Barridos convencionales

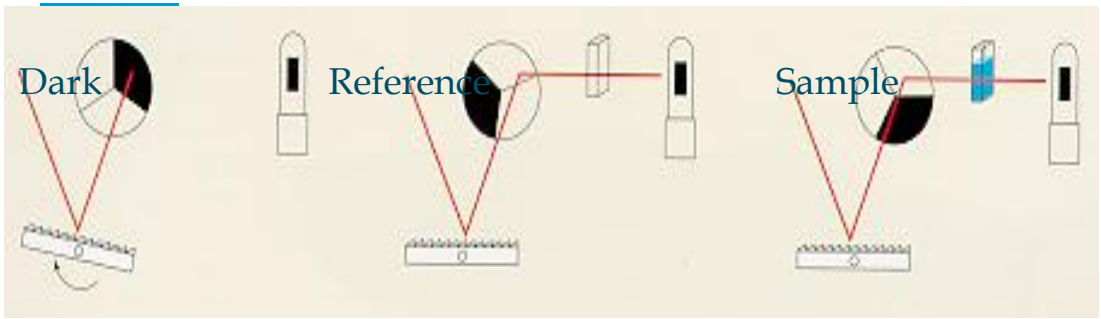


Grating moves

Grating continues to move

Sample measured at different wavelength to reference

NMPS



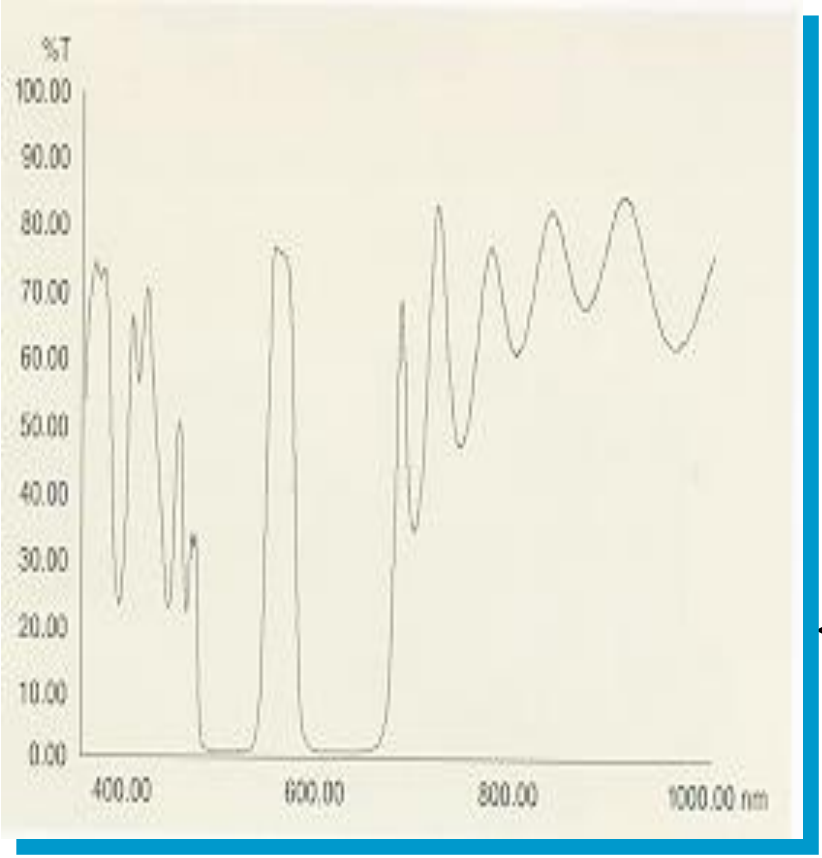
Chopper moves only during NMFS of the chopper cycle

Grating stops

Sample measured at same Wavelength as reference

NMPS los resultados son mucho más precisos!

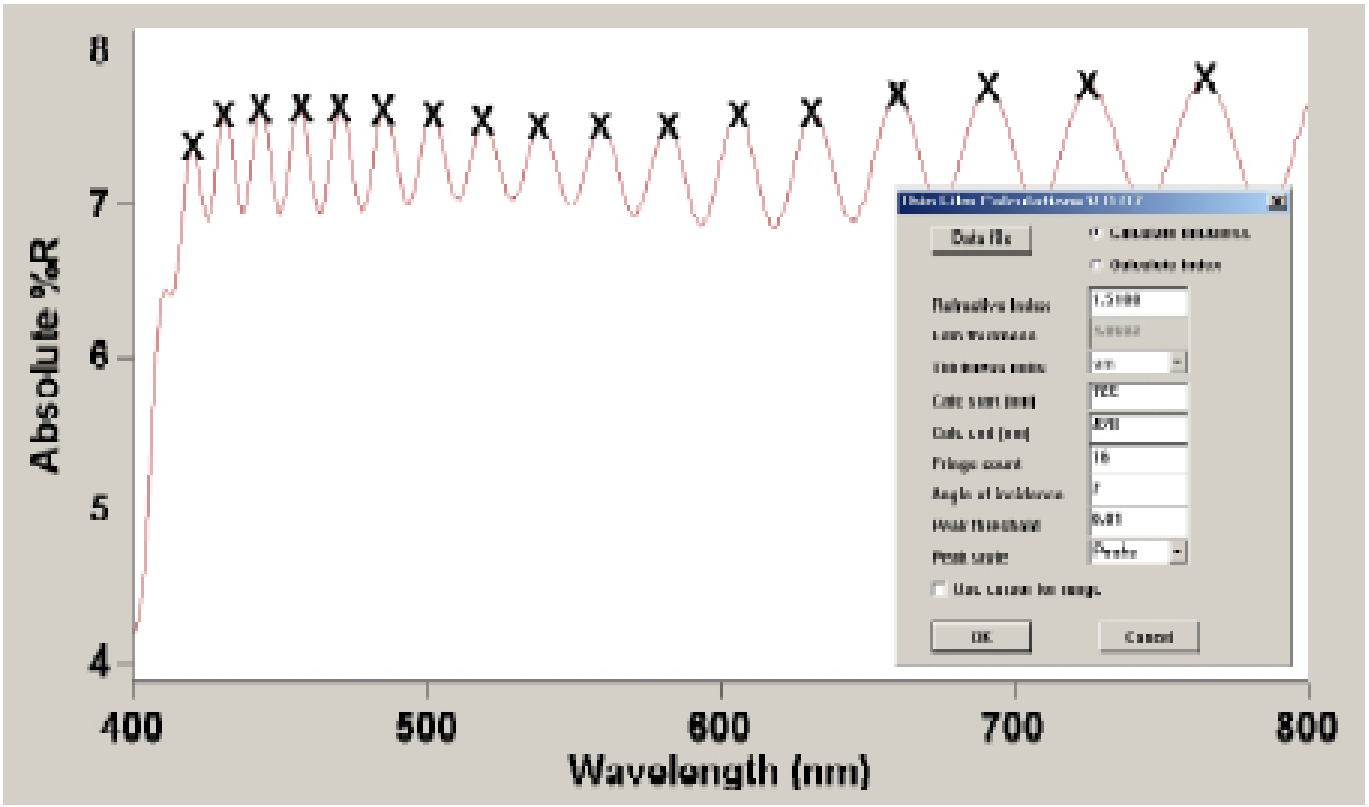
Non-Measurement Phase Stepping (NMPS)



El NMFS asegura que las medidas fotométricas a una long de onda particular, se mantienen constantes independientemente de la velocidad de barrido.

Se muestran los espectros superpuestos de una misma muestra medida a 1800, 900, 600, 450 y 200 nm/min

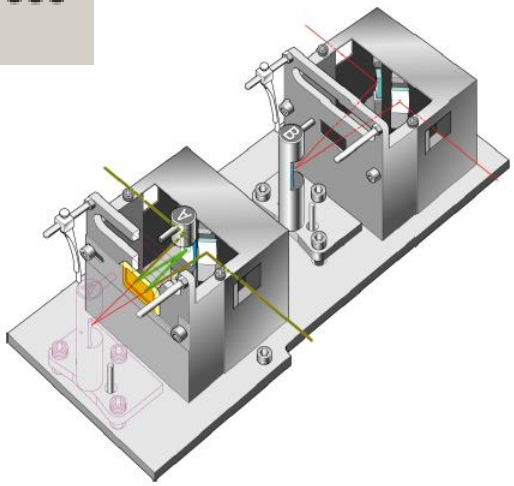
ESPECTROSCOPÍA DE MUESTRAS SOLIDAS: ANALISIS DE CAPAS FINAS CON AGILENT CARY 4000/5000/6000



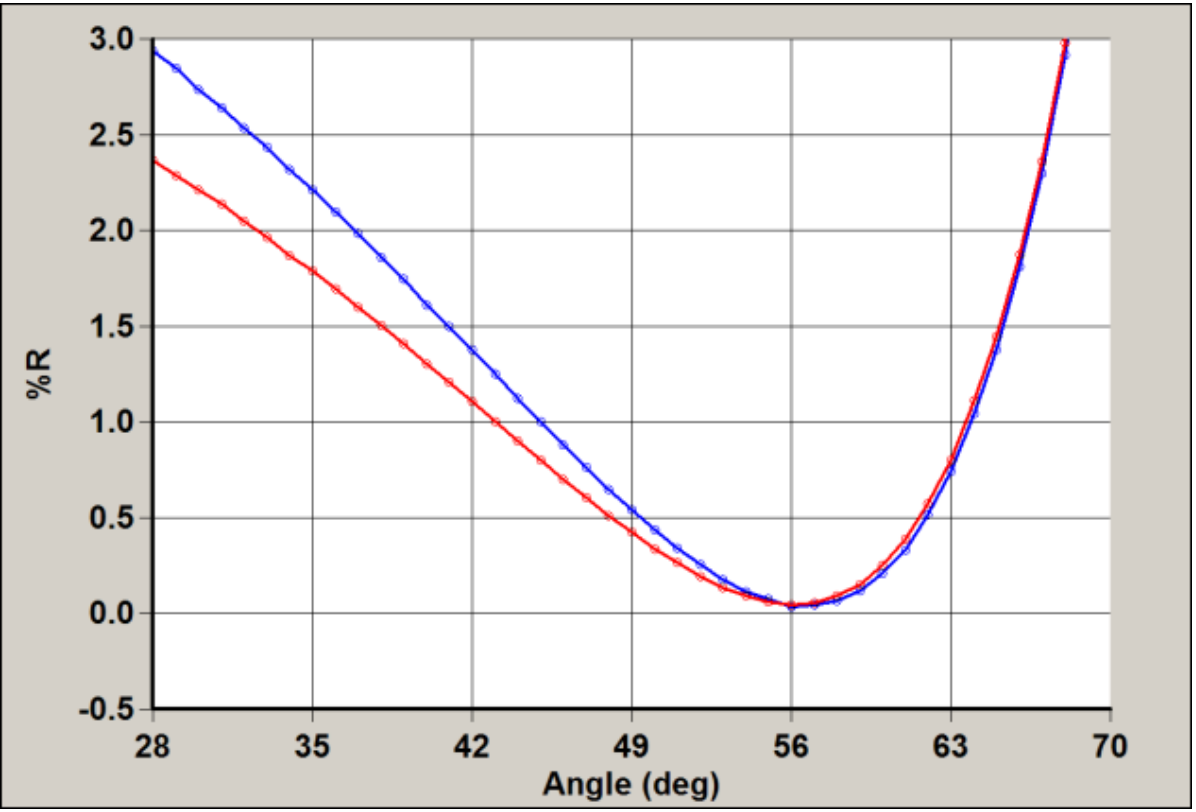
Basado en un ángulo de incidencia de 7º, índice de refracción de 1.51 y la cuenta de 16 franjas de interferencia el grosor calculado fue de 4.95 μm

Reference material

UV application note 90 – Determination of thin films thickness using reflectance spectroscopy



ESPECTROSCOPÍA DE MUESTRAS SOLIDAS: AGILENT CARY 4000/5000/6000



Medida de %R frente al ángulo de incidencia para el sustrato con y sin recubrir

El cálculo del índice de refracción es determinado tomando la tangente del ángulo a que los dos barridos intersectan.

Luego el índice puede usarse para calcular el grosor del recubimiento

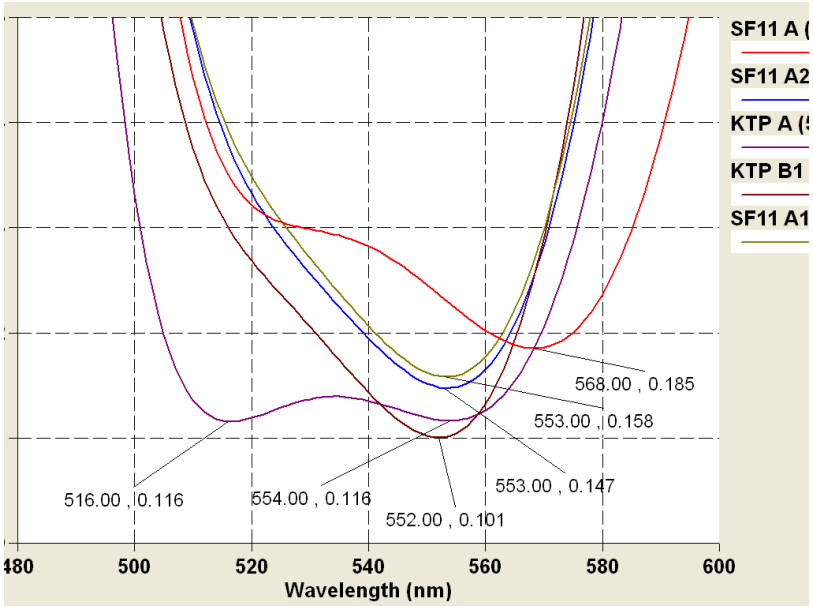
Analizado en un Cary 5000 con un Accesorio de Reflectancia Especular de Angulo Variable con el ADL VASRA refractive Index



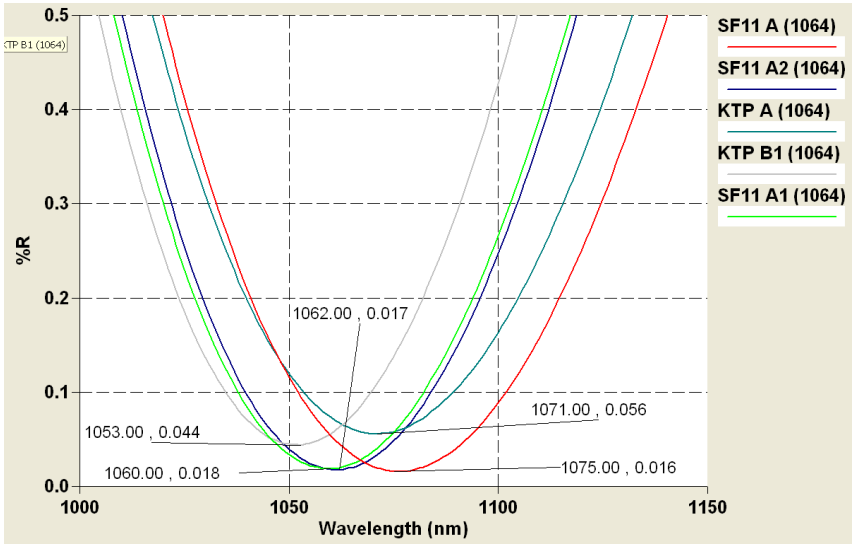
ESPECTROSCOPÍA DE MUESTRAS SOLIDAS: AGILENT CARY 4000/5000/6000



Espectros de cristales recubiertos con capas finas antireflectivas con Cary 6000



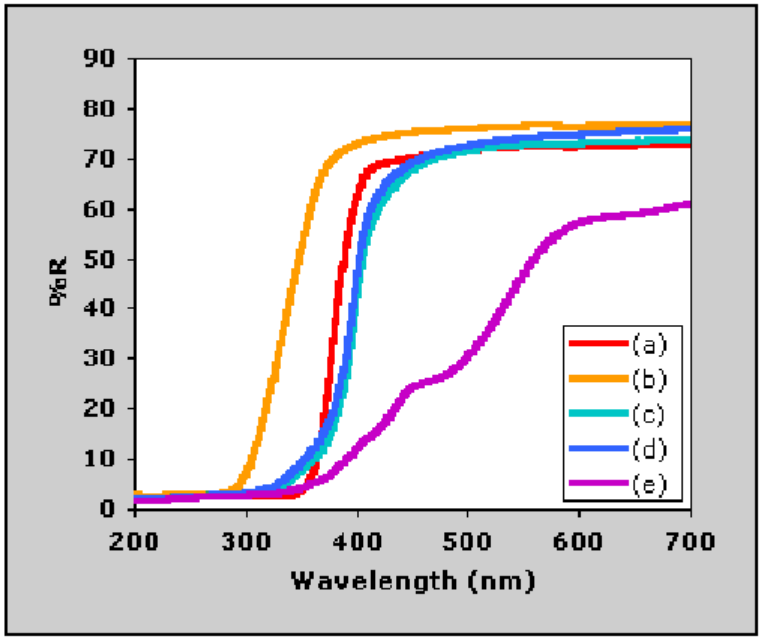
Nota: Excelente relación señal/ruido en las regiones de muy baja reflectancia dentro de la zona Vis y tambien en NIR NIR



Este ejemplo ilustra la potencia de la configuración del Cary 6000 con un sistema optico específico para disminuir enormemente la luz difusa en NIR y la mayor sensibilidad del detector de InGaAs sobre el de PbS. Con este sistema se consique mayor rendimiento óptico, mejor resolución, menores tiempos de lectura y mayor sensibilidad

ESPECTROSCOPÍA DE MUESTRAS SOLIDAS: AGILENT CARY 4000/5000/6000

Determinación del energy band gap de diferentes materiales por DRA



Compound	Absorption Edge (nm)	Band Gap Energy (E_g; eV)
TiO_2	370	3.35
$K_2Ti_4O_9$	310	4.00
$(C_3H_7NH_3)_2Ti_4O_9$	387	3.20
$C_6H_{12}(NH_3)_2Ti_4O_9$	384	3.23
$(Fe_3(CH_3COO)_7OH)Ti_4O_9$	510	2.43

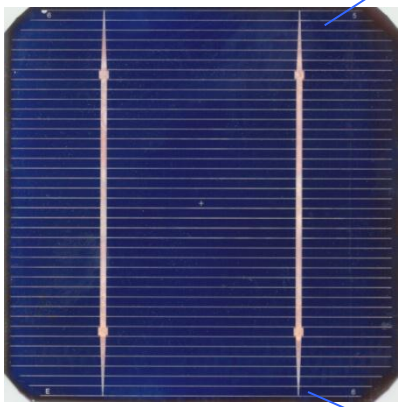
Reference material

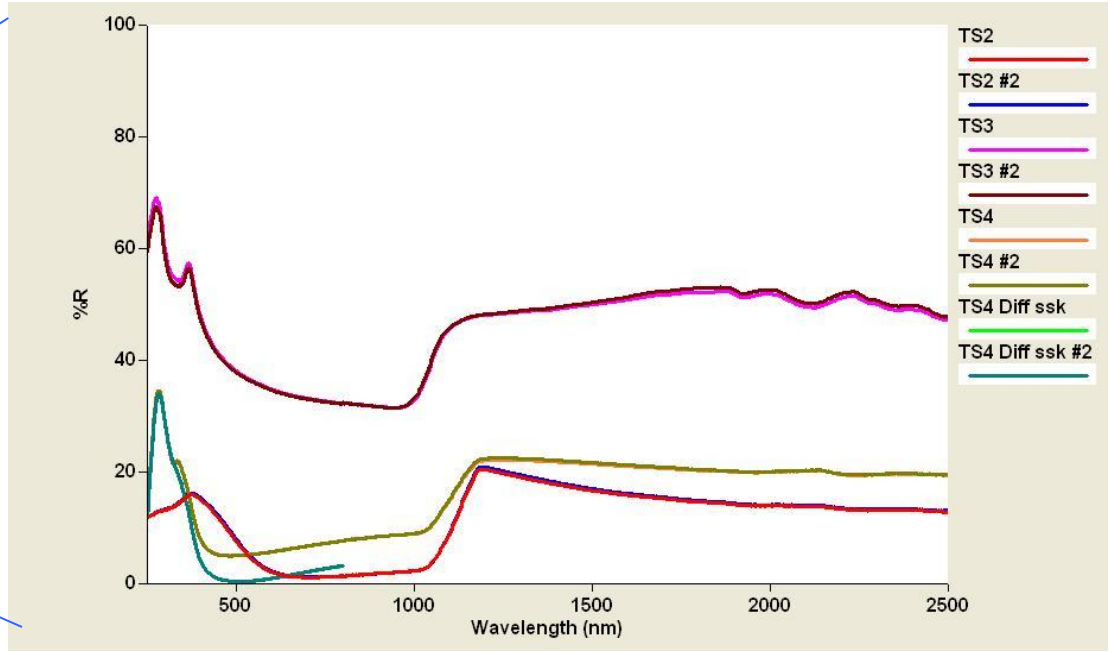
UV application note 81 – The measurement of absorption edge and band gap properties of novel nanocomposite materials



ESPECTROSCOPÍA DE MUESTRAS SOLIDAS: AGILENT CARY 4000/5000/6000

Estudio de la reflectividad de células termo-solares en UV-VIS.NIR



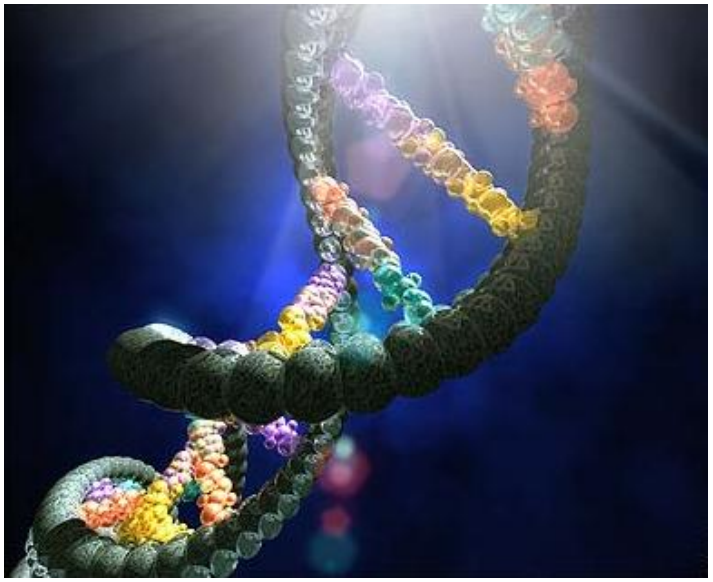


Reference material

UV application note 93 – Measuring the optical properties of photovoltaic cells using the Varian Cary 5000 UV-Vis-NIR spectrophotometer and the External DRA-2500



Segundo ejemplo:



Análisis de muestras biológicas por UV-Vis-NIR y emisión de fluorescencia.

Campos de aplicación

Muestras líquidas (bioquímica)

Estructura y estabilidad de proteínas.

Estructura y estabilidad de DNA y RNA. Tm, cromaticidad.

Cinéticas diferenciales.

Espectroscopía diferencial de proteínas. Interacciones.

Estudios de membranas. Orientación de Lípidos y Proteínas.

Requiere de sistemas de doble haz

Alta estabilidad frente al tiempo

Bajo nivel de ruido

Sistemas de control de temperatura



Control de temperaturas. Sistemas biomelt



El mejor sistema de control de temperaturas.

Desde -10ºC a 100ºC
Con un error inferior a 0.05ºC en el medio en el que está la muestra.

Collect Temperatures

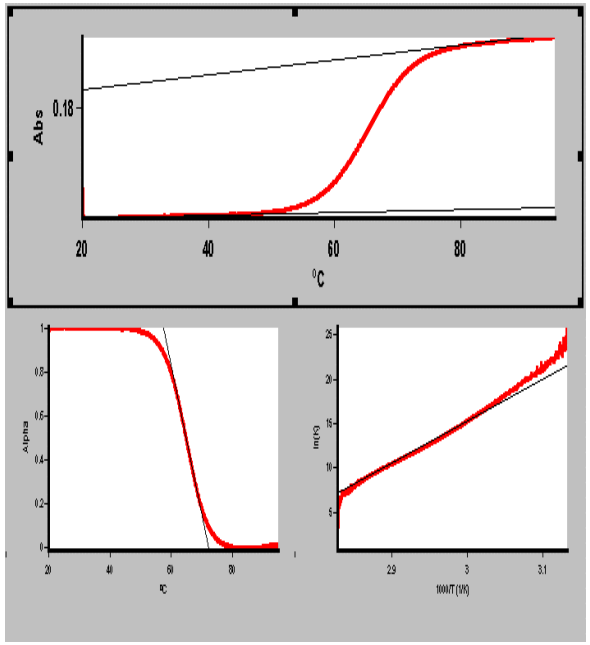
Start °C: 15.0 — Temperature Monitor: Probe 1

Return to °C: 25.0

Simple Collect

Advanced collect — Number of Stages: 4

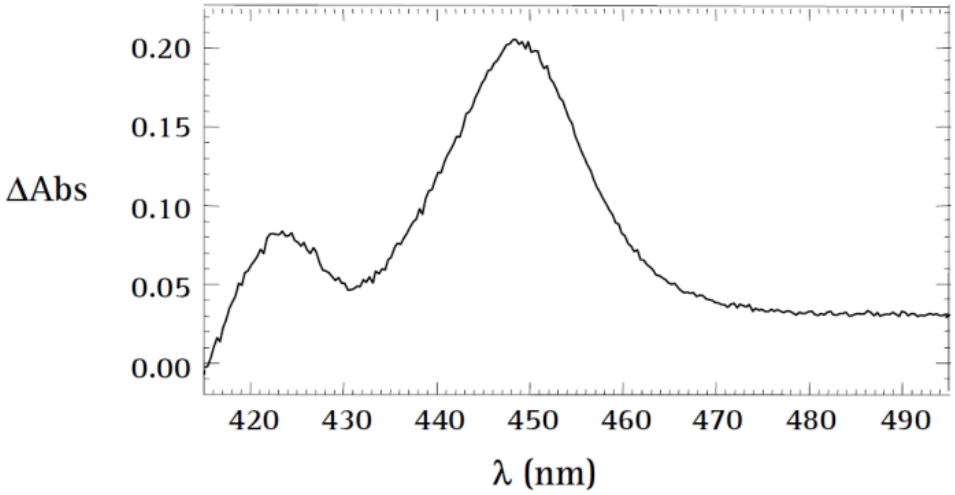
Stage	Collect Data	Data Interval	Rate (°C/min)	End (°C)	Hold (min)
1	☐	2.00	2.00	95.00	2.00
2	☐	2.00	2.00	15.00	2.00
3	☑	0.20	0.50	95.00	5.00



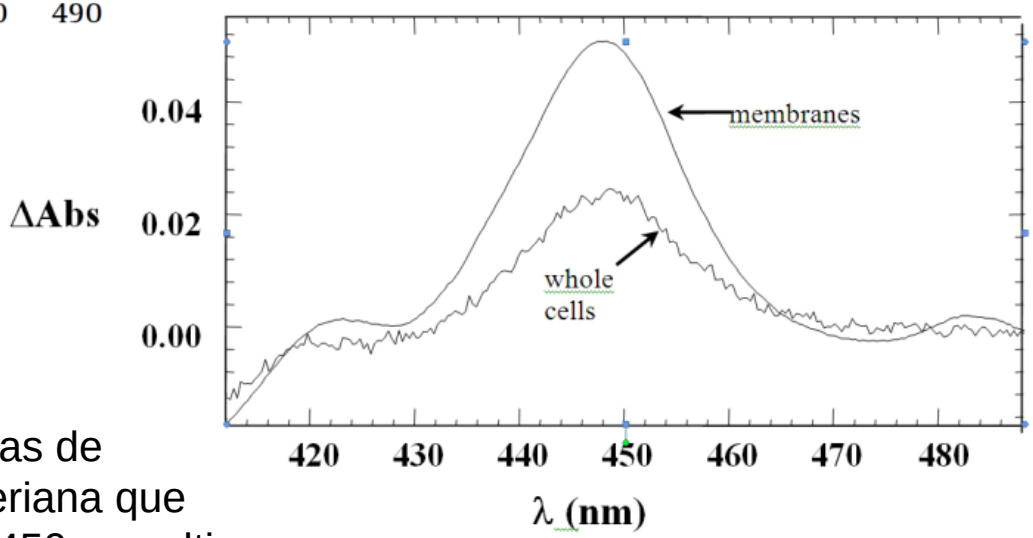
Análisis de la expresión en bacterias recombinantes de citocromo P 450 humano



Ensayos espectrofotométricos realizados con un Agilent Cary 300 en cultivos de más de 3 UA



Espectro diferencial de cultivos de células DJ4309 que expresan niveles elevados de citocromo P-450

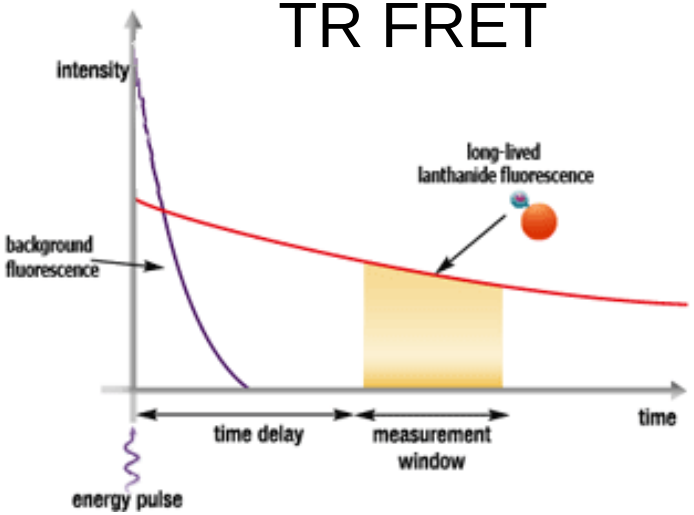


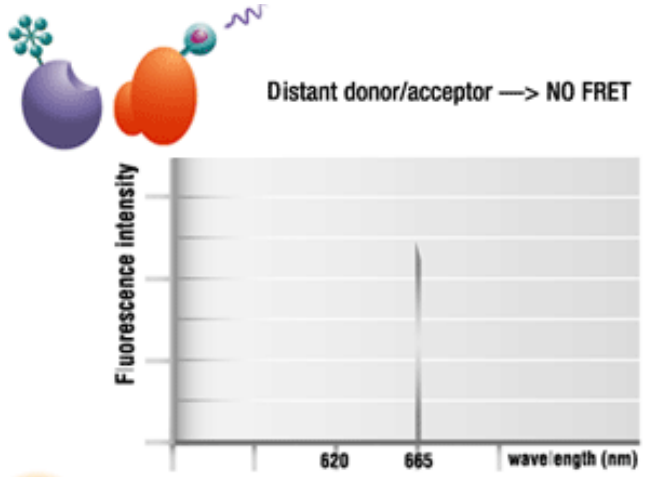
Espectro diferencial de células y de vesículas de membranas plasmáticas de una cepa bacteriana que expresa muy bajos niveles de citocromo P-450 en cultivo

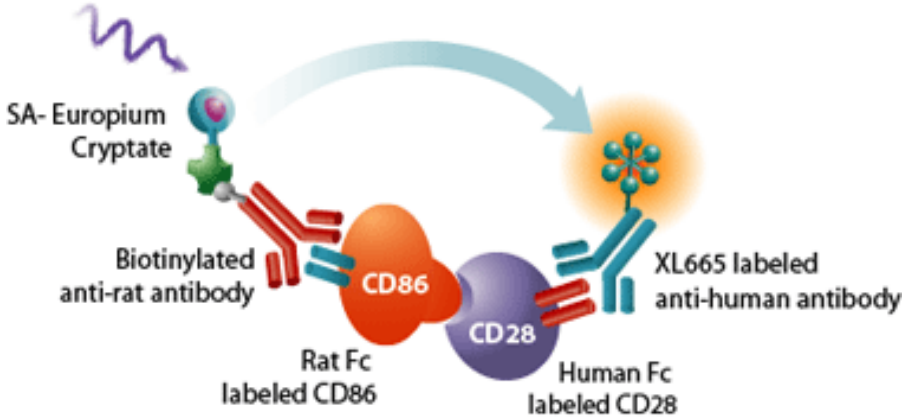
Aplicaciones en emisión: FRET o RT FRET

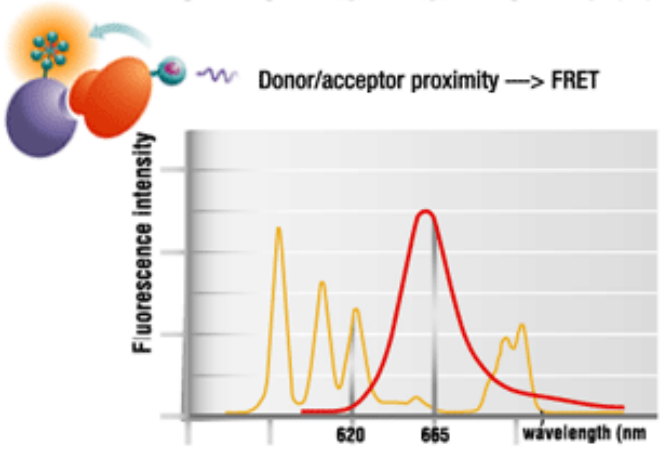


TR FRET



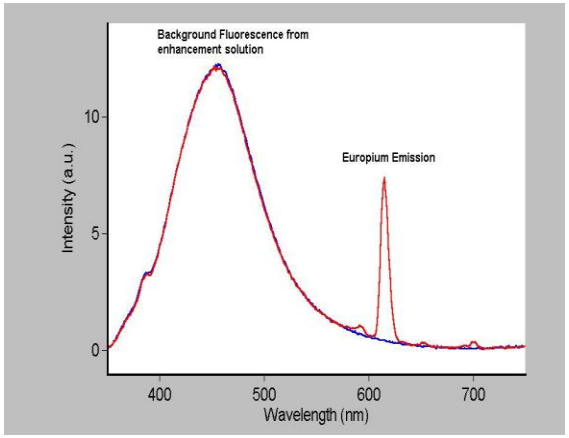




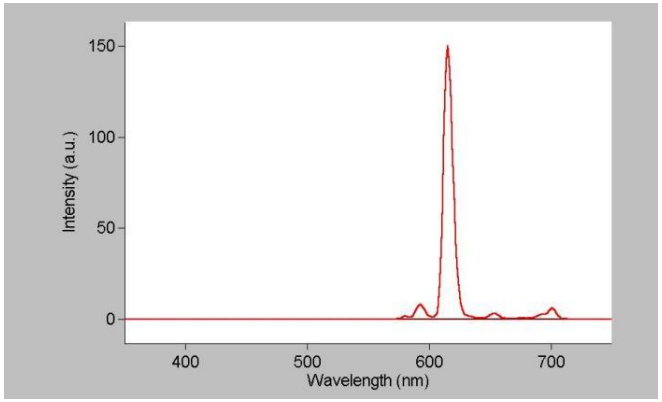


Espectro de fluorescencia de Europio en disolución potenciadora DELFIA™

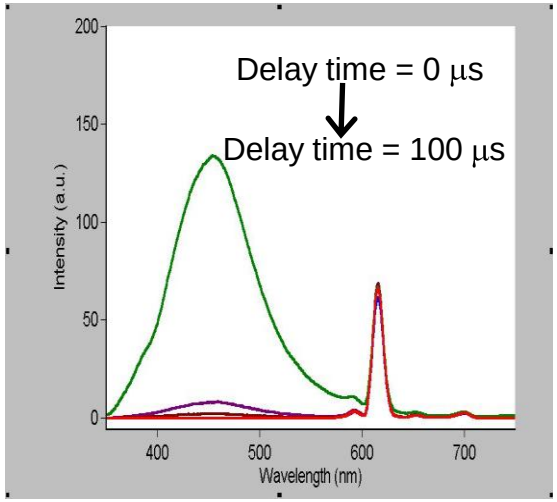
Pico desestructurado a 450 nm atribuido a la emisión de fondo de la solución potenciadora



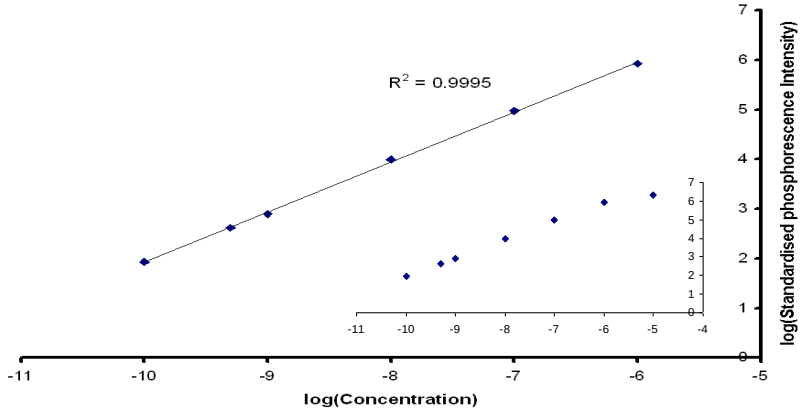
Modo Fluorescencia



Modo Fosforescencia (TRF) mode



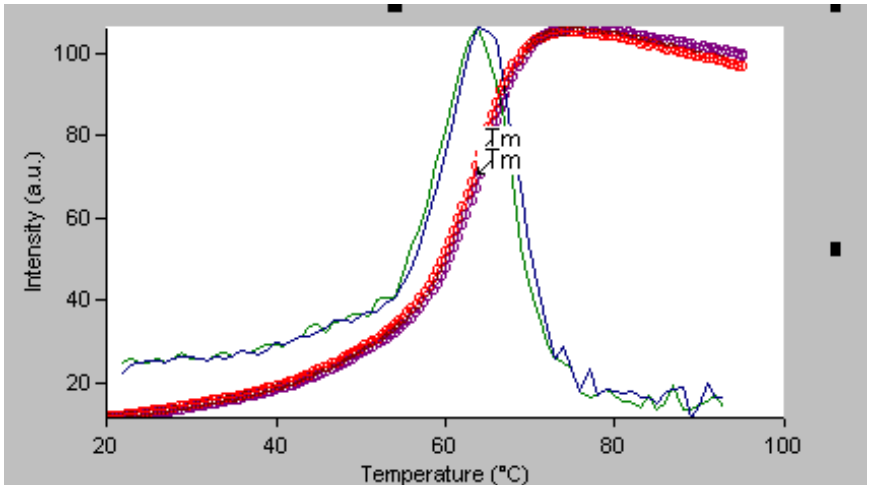
Optimización del delay time

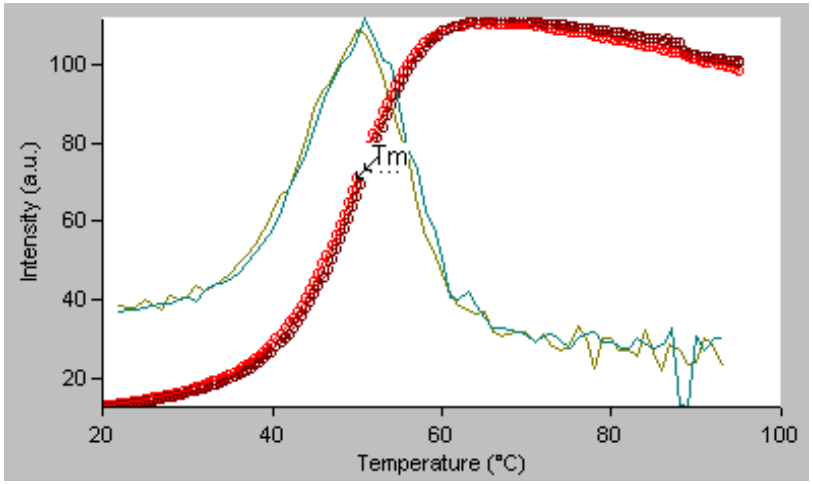


Gráfica logarítmica de la intensidad de la fosforescencia vs. Concentración.
Linealidad en el intervalo entre 0.1 – 1000 nM (inserto 0.1 – 10000 nM)

Aplicaciones: Estudios de interacciones e hibridación de ácidos nucléicos y proteínas.

Caracteriación del proceso de hibridación por FRET de una proteína marcada con un quencher (DABCYL) y una sonda de DNA marcada con un compuesto fluorescente (5 y 6 carboxifluoresceína)



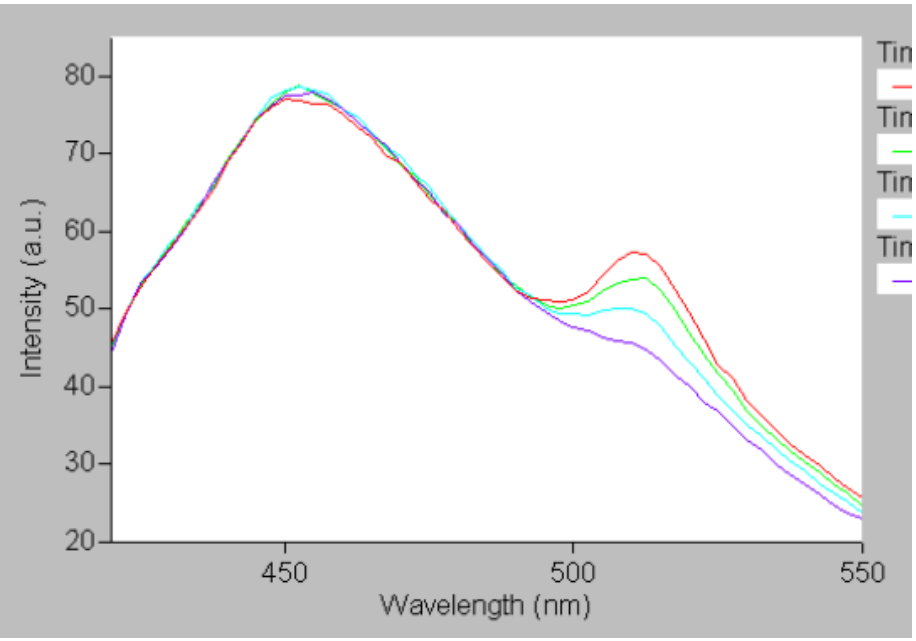


Cary Eclipse equipado con paquete biomelt (sistema multiceldas termostatizado con peltier, controlador y sondas de temperatura. Software para el cálculo de temperaturas de melting (Tm) mediante el método de la derivada

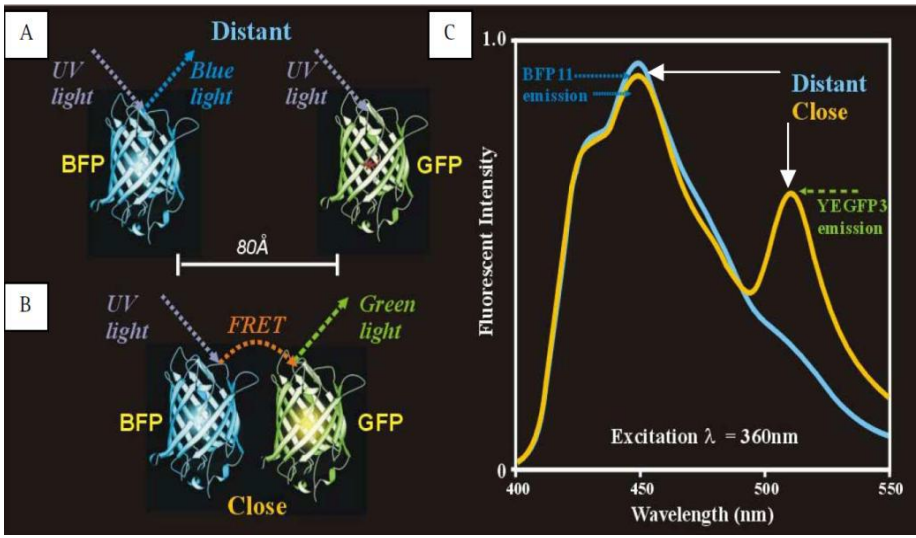
Aplicaciones: Estudios de interacciones entre proteínas.



Agilent Cary Eclipse

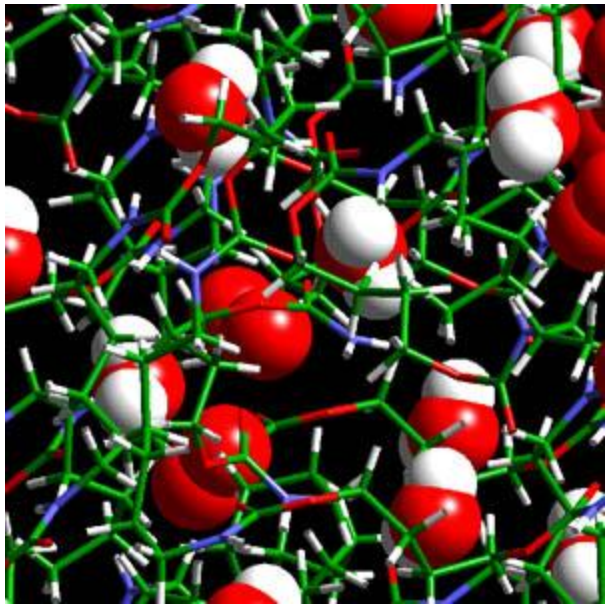


Espectros de intensidad de la emisión del conjugado una vez sometido al tratamiento con tripsina. La tripsina se añadió tras el barrido inicial a tiempo cero



Marcaje de las proteínas con BFP y GFP

Tercer ejemplo:



Espectroscopía FTIR a tiempo real de un proceso de curado de un polímero.

Procesos de curado UV, categorías y mecanismo de reacción

A photoinitiator can be categorized in different ways —-

According to its mechanism

- free radical
- cationic

According to its form

- liquid
- solid

According to its absorption

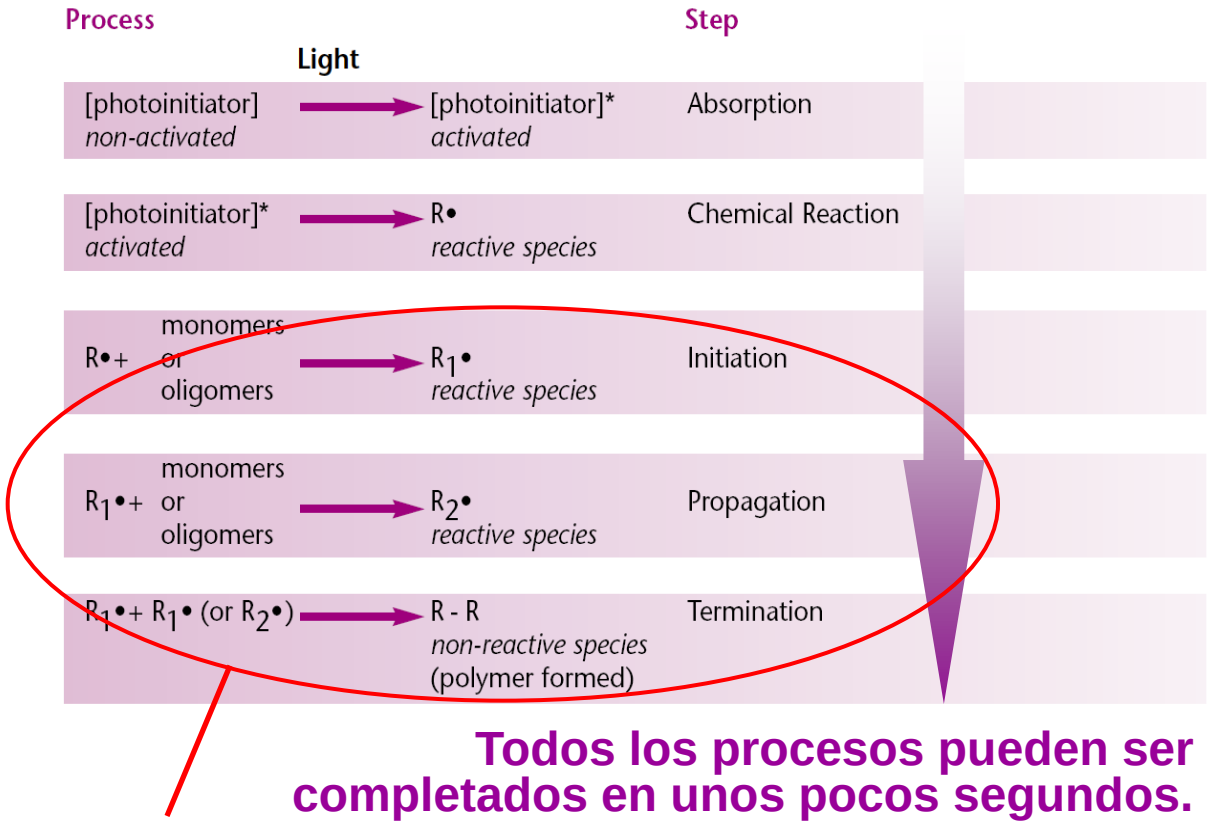
- UV light
- visible light

According to its application

- clear
- pigmented
- white

According to the Depth of Cure

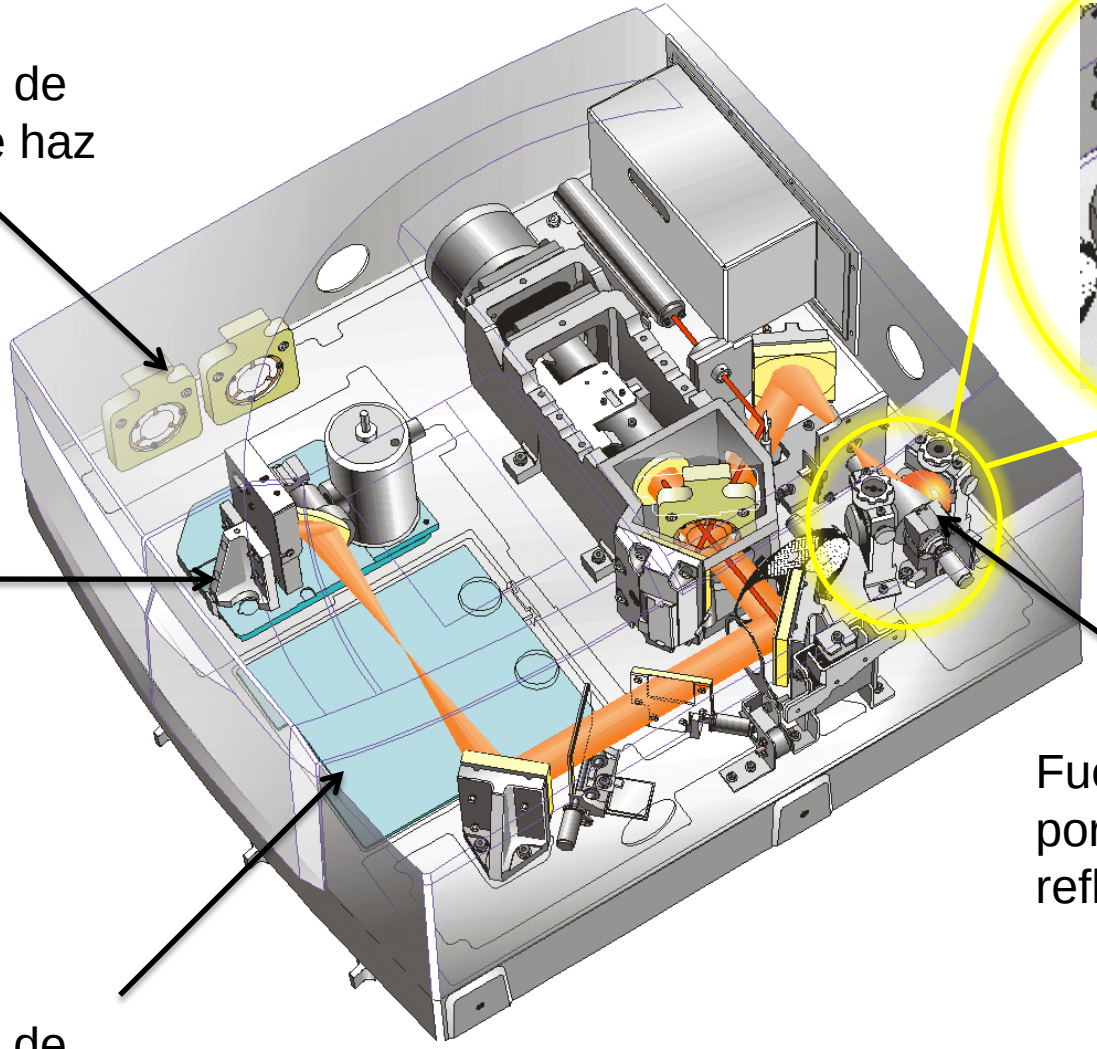
- Thick layers
- Thin Layers



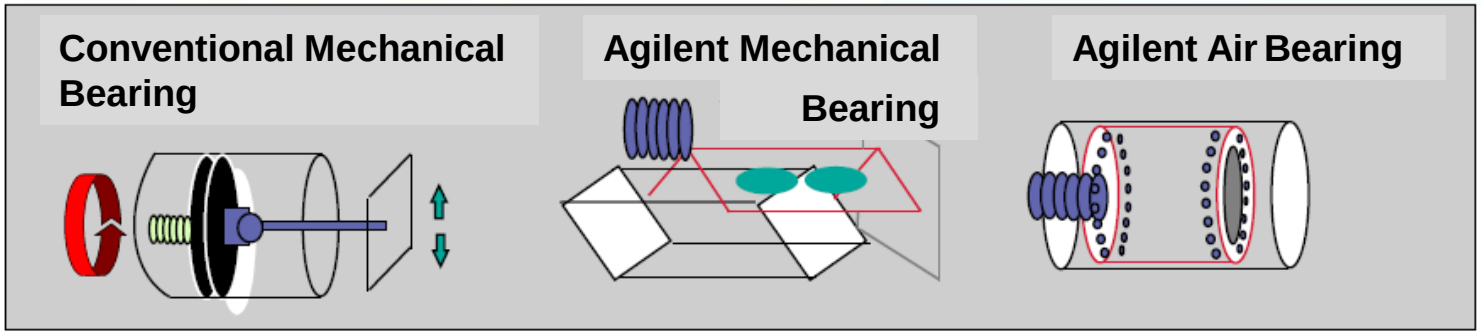
Todos los procesos pueden ser completados en unos pocos segundos.

"El FT-IR a tiempo real" is util para determinar el grado de estas reacciones

Plataforma óptica Agilent serie 600



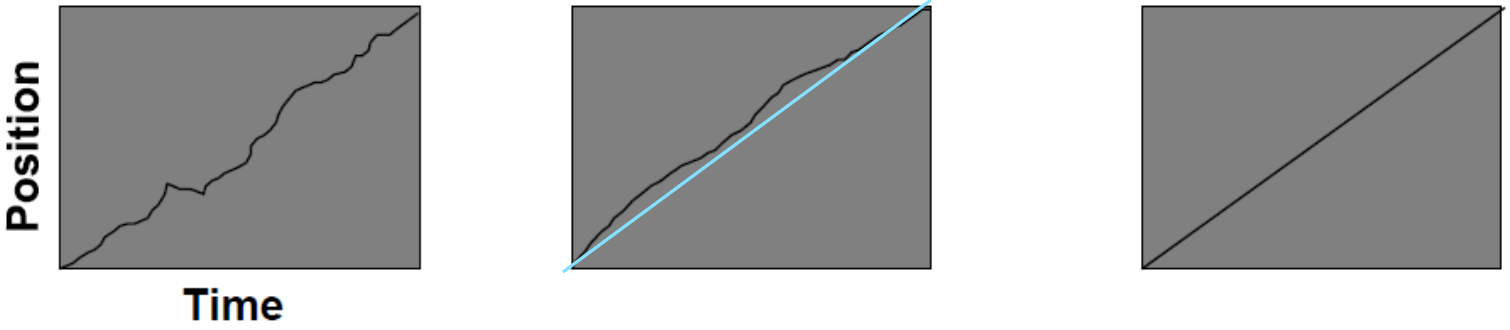
Tipos de interferómetros



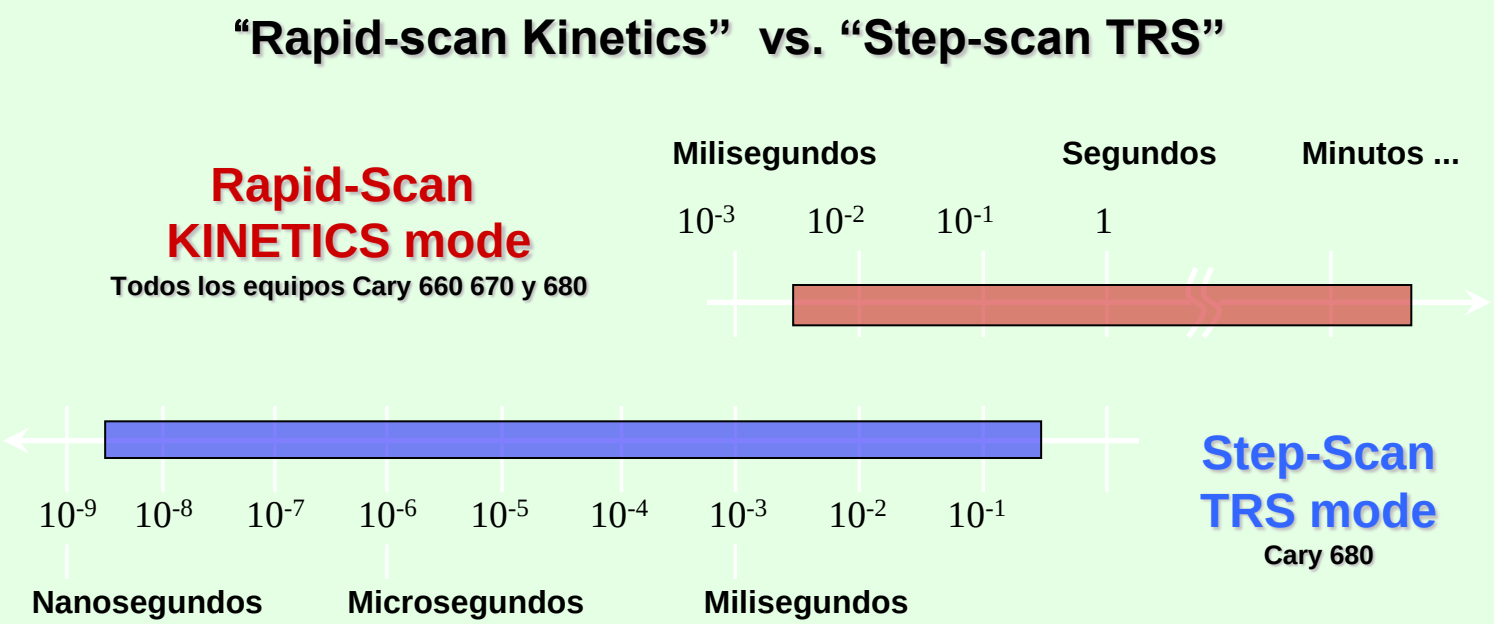
* High friction
* Poor reproducibility
* Poor reliability
* Poor precision and accuracy
* Control mechanism AC in rapid scan and DC in step-scan
* Rotation, sticking and wobble errors

* Low friction
* Good reproducibility
* Good reliability
* Good precision and accuracy

* Least friction
* Highest reproducibility
* Smoothest motion
* Most Reliable Short and Long term operation
* Fast scan rates
* Highest precision and accuracy
* AC control in rapid scan and step-scan



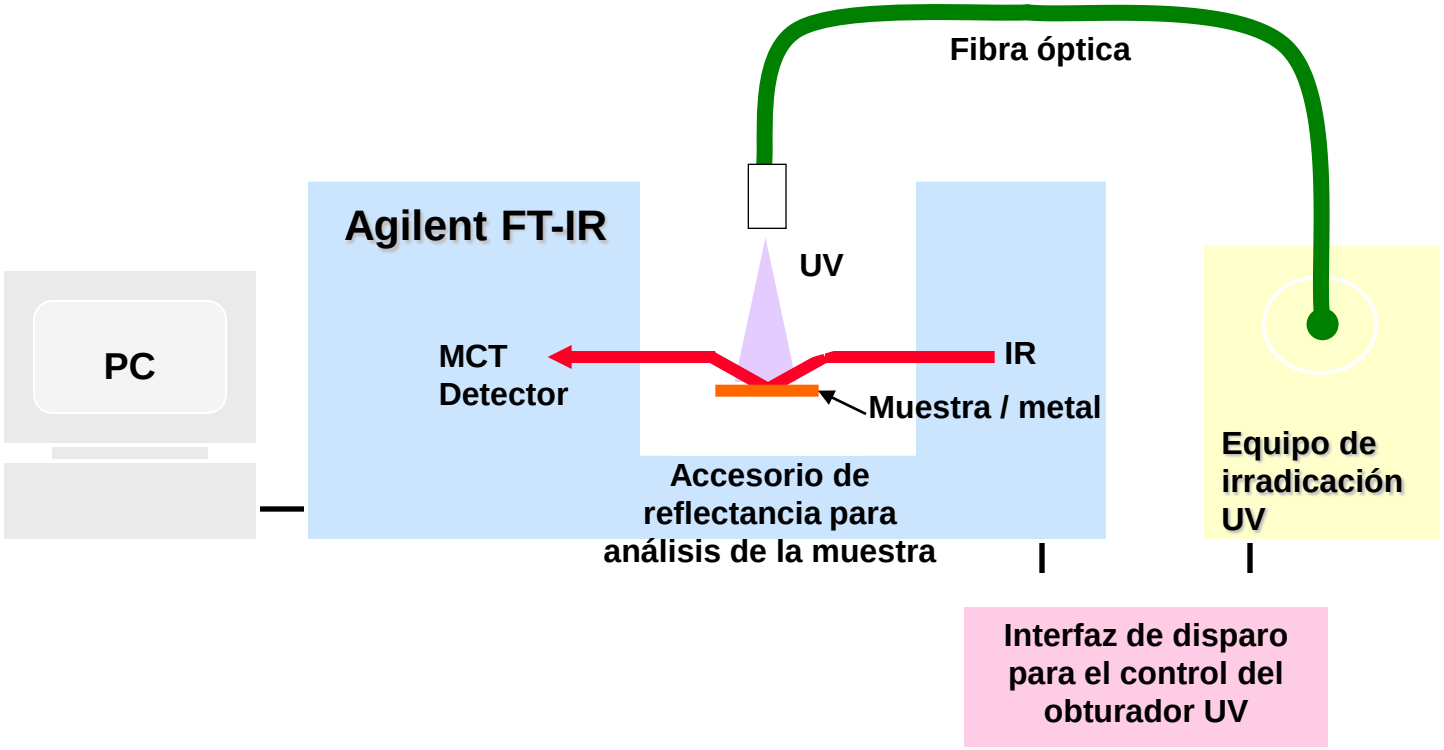
Escala temporal disponible en los FTIR Agilent



Rapid-scan Kinetics: Aplicable a reacciones reversibles o irreversibles.
Step-scan TRS: Aplicable solo a reacciones reversibles.

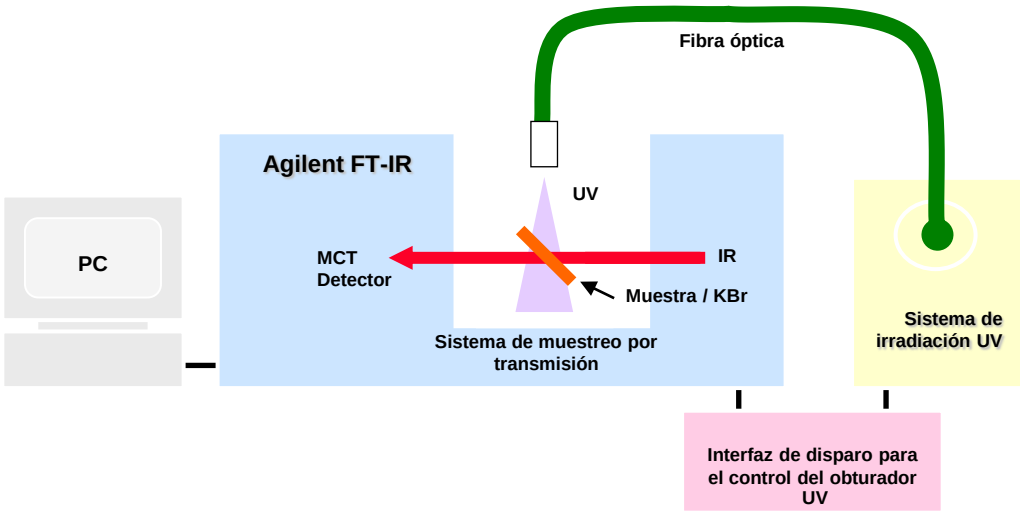
Análisis RTFTIR sobre curado UV

Diagrama de Bloque del sistema de foto-plimerización cinética acoplando a un FTIR Agilent 660 un sistema de irradiación UV

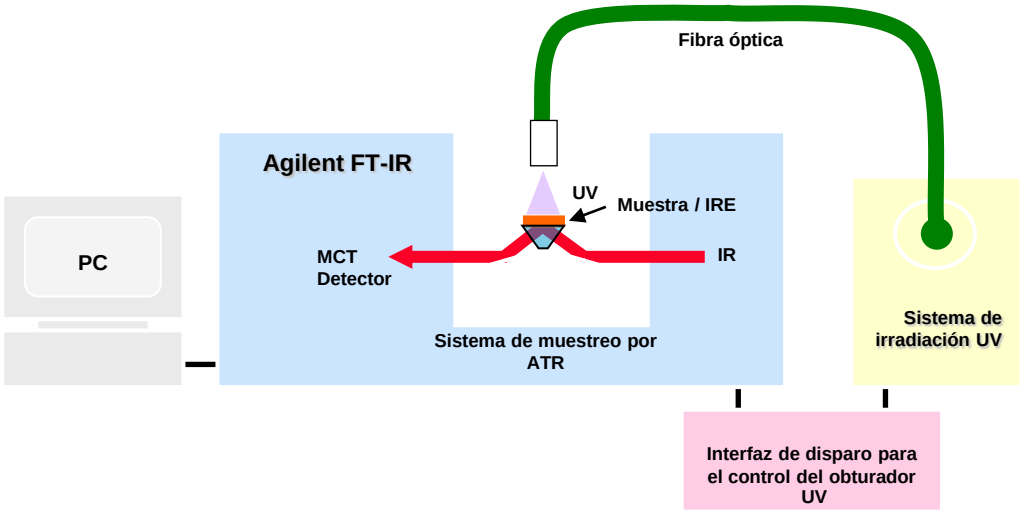


Configuración en reflexión

Análisis RTFTIR en curado UV



Configuración en transmisión

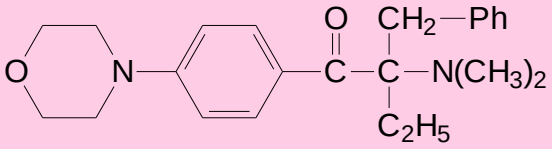


Configuración en ATR

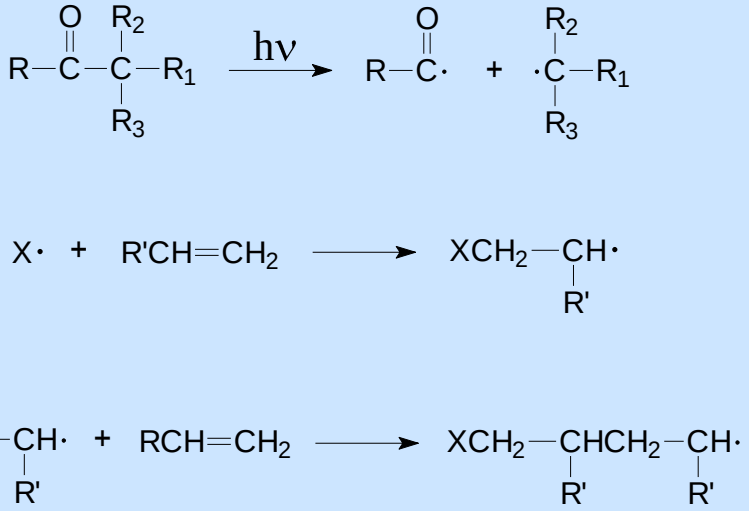
FTIR en tiempo real en el curado UV RTFTIR

Estructura química de la muestra y mecanismo general del proceso de polimerización inducida por radicales.

1,6-Hexanediol diacrylate (HDDA)



Ciba's Irgacure 369
(as photo-initiator)

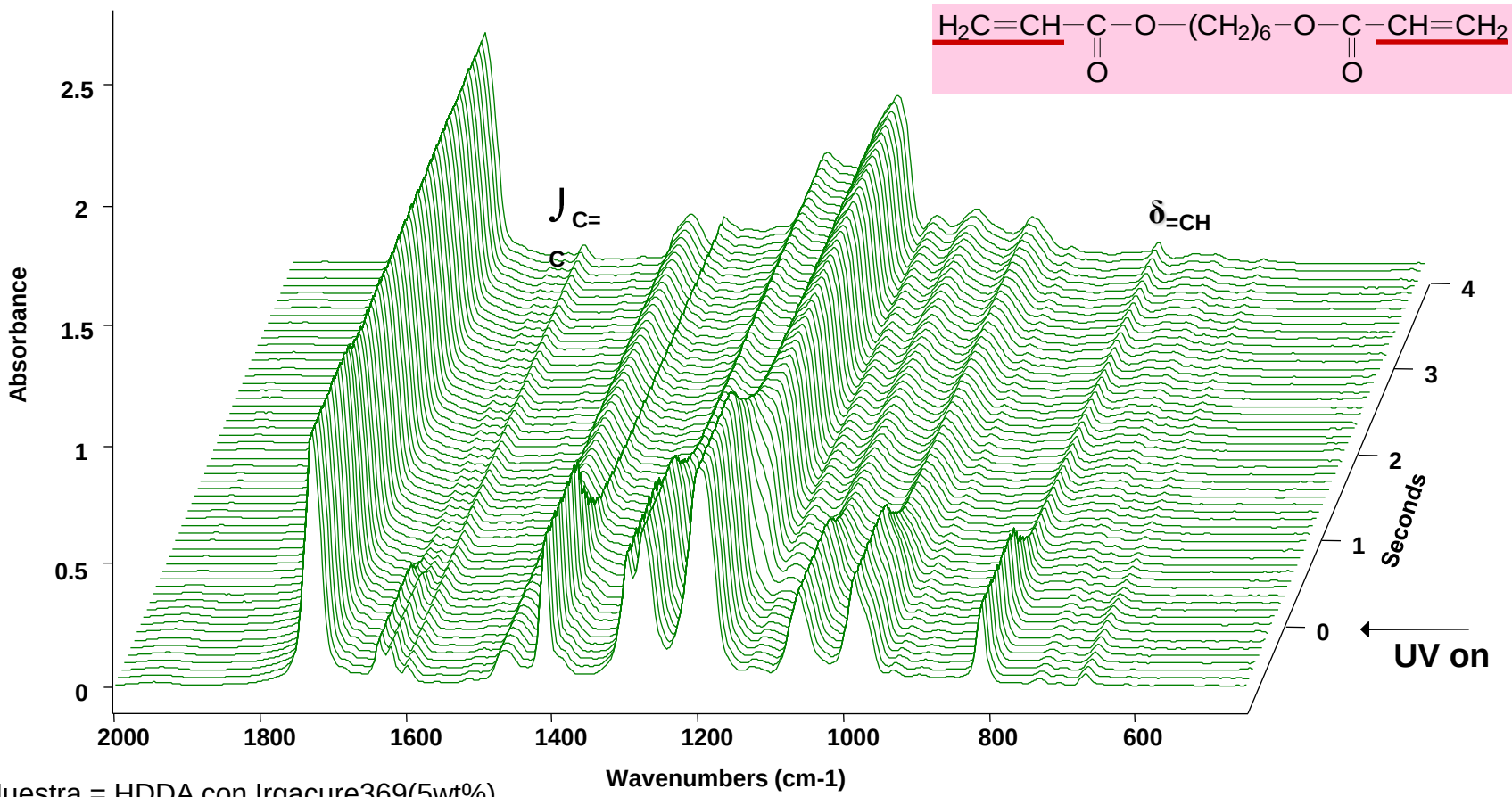


Mecanismo general de la reación de polimerización inducida por radicales

Muestras suministradas amablemente por DAINIPPON INK AND CHEMICALS, INC.

FTIR en tiempo real del curado UV

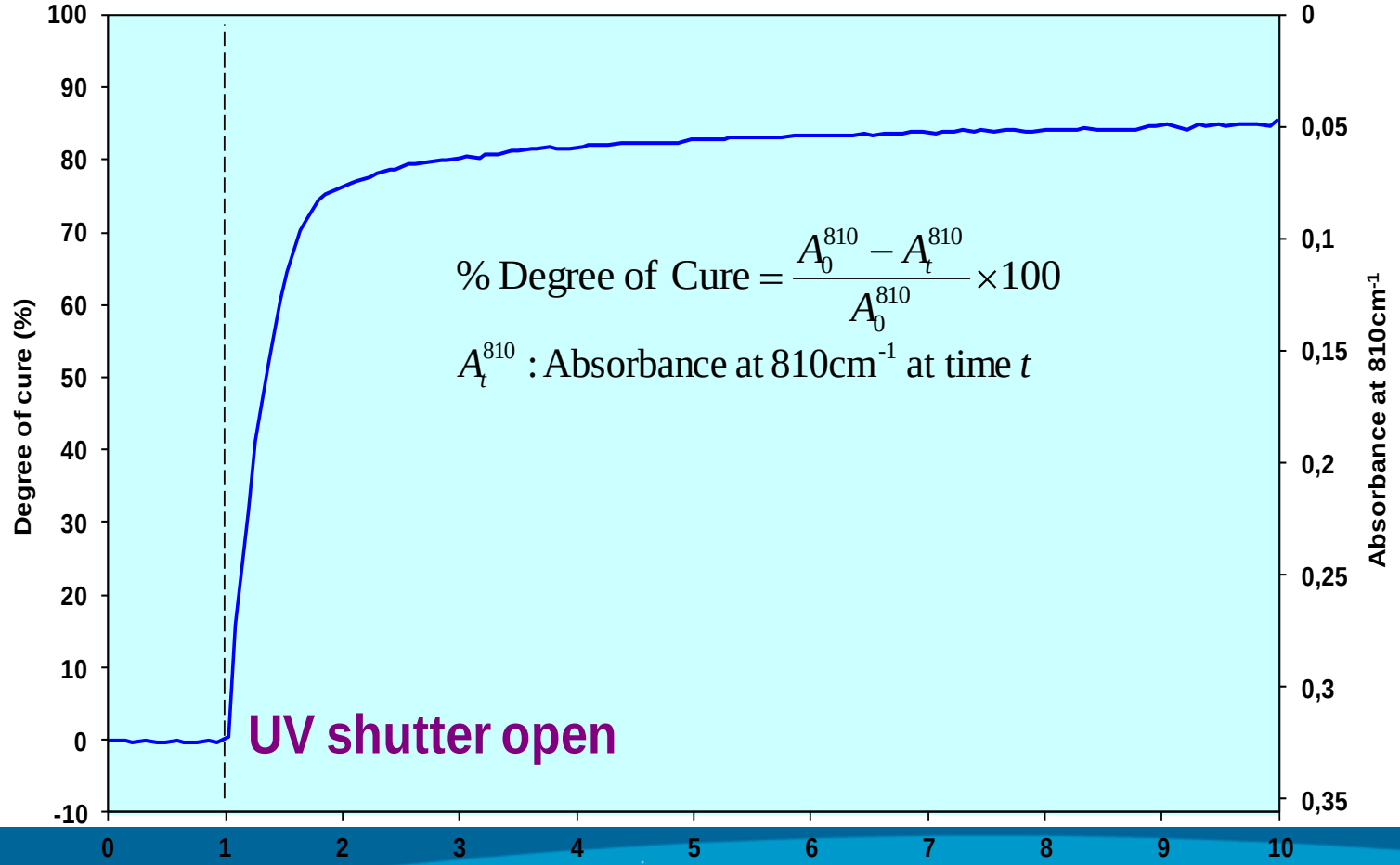
Un ejemplo a tiempo real por FT-IR recogidos durante la polimerización inducida por UV de los monómeros acrílicos



Muestra = HDDA con Irgacure369(5wt%)
Resolución = 8cm^{-1}
Resolution temporal = 0.085sec/spec.(Scans=1)
UV Power = 30mW/cm^2 at 365nm
Con purga de Nitrogeno

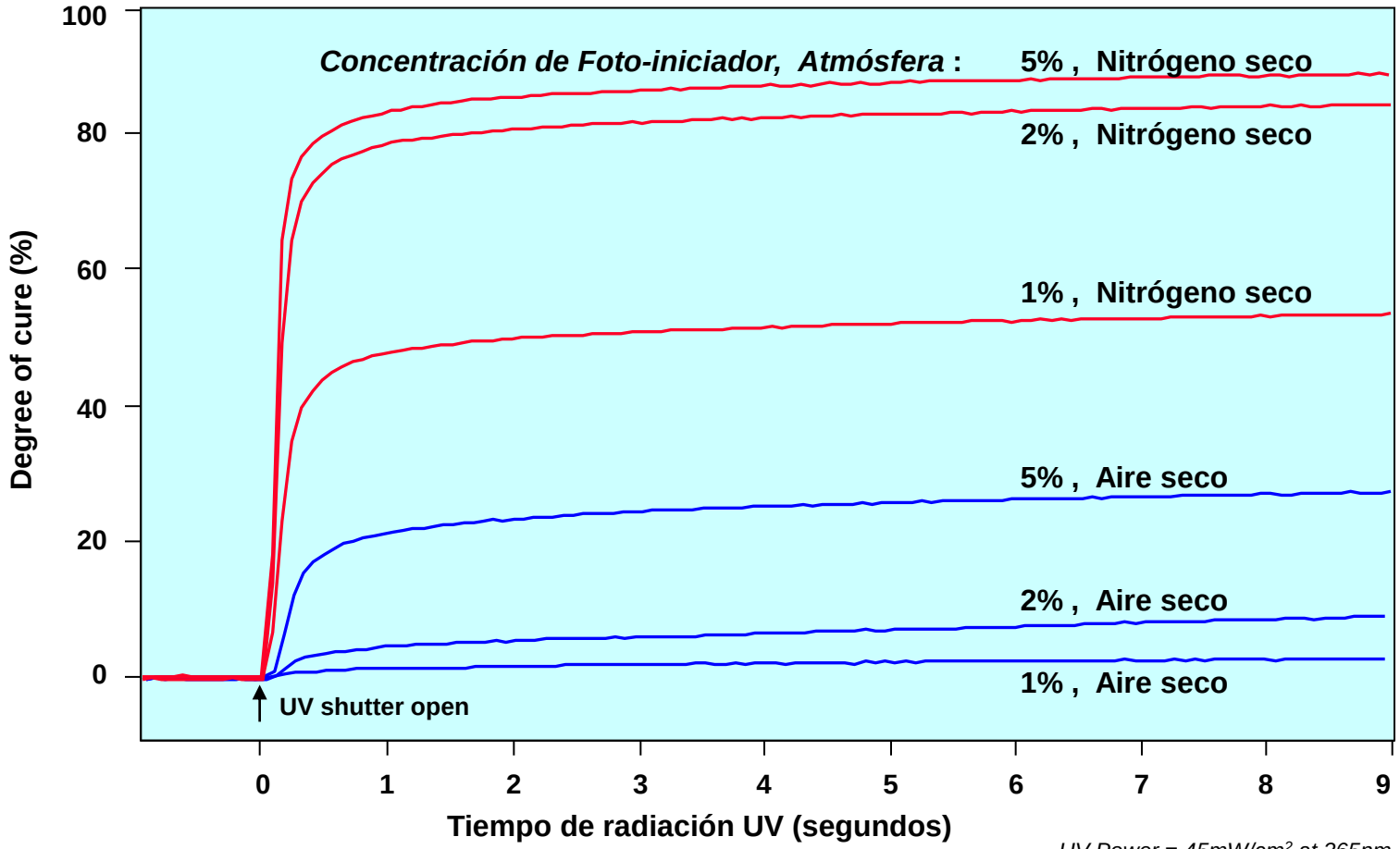
Análisis RTFTIR del curado UV

Grado del curado calculado a partir de la evolución temporal de la intensidad de la banda del grupo vinilo (δ =CH)



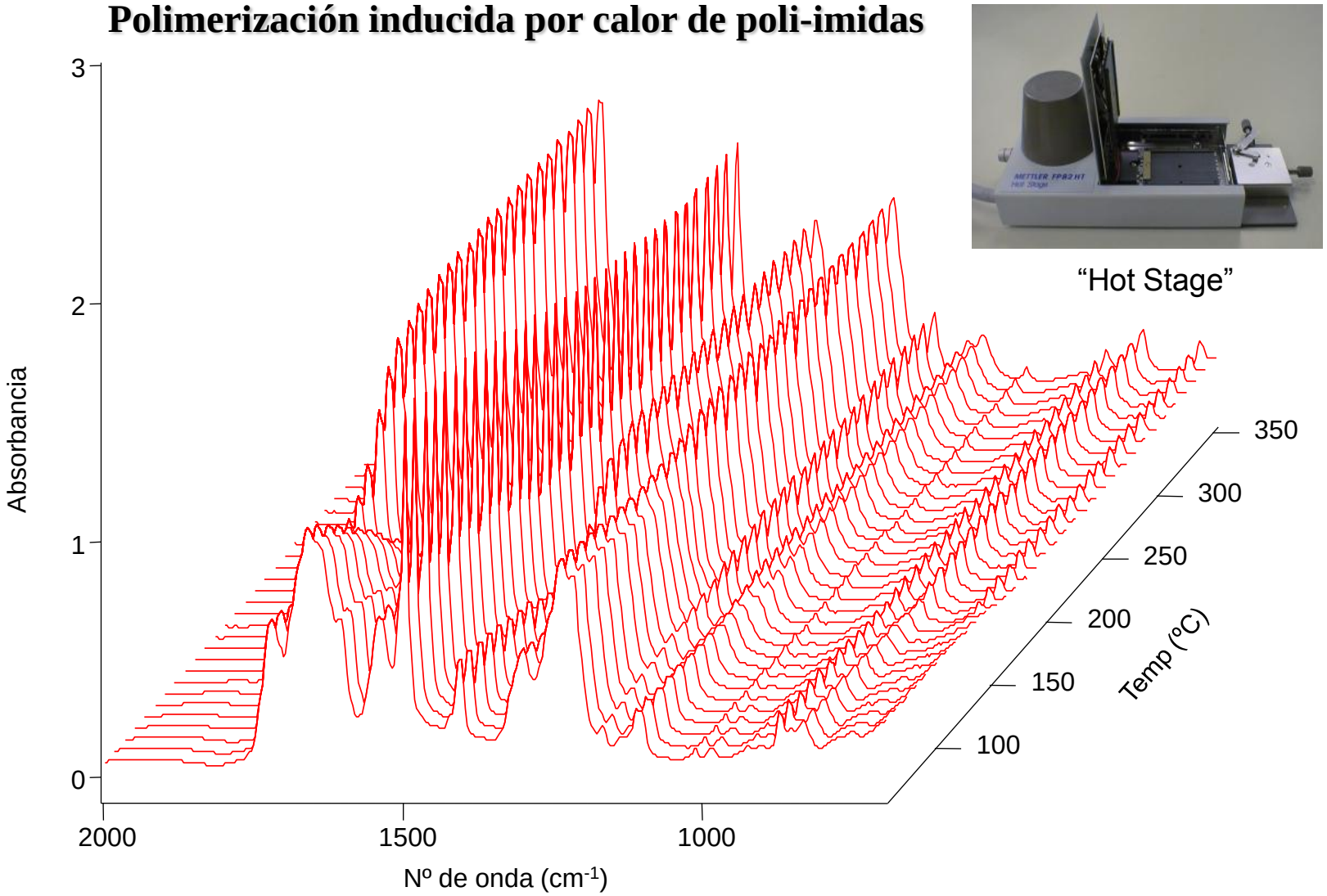
Análisis RTFTIR del curado UV

Efectos de la concentración del foto-iniciador y la atmósfera de la reacción en el proceso de curado UV inducido por radicales

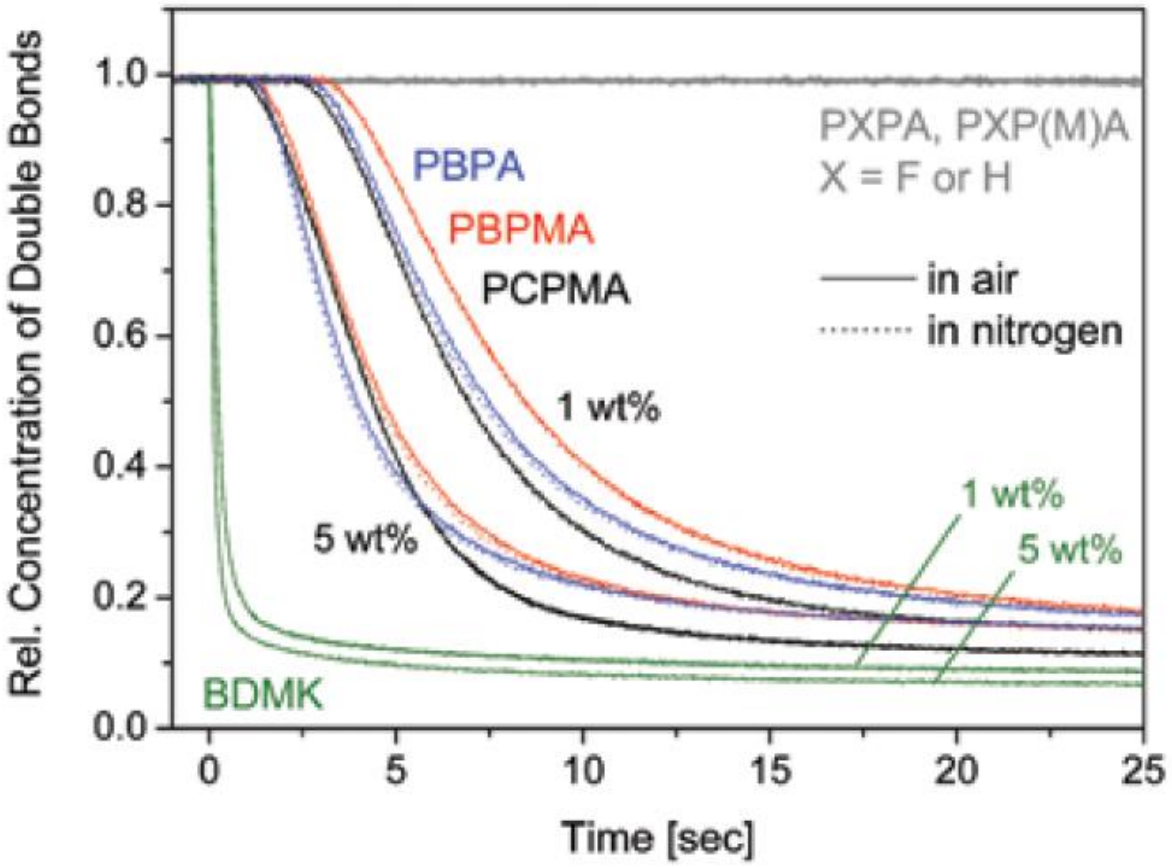


UV Power = 45mW/cm^2 at 365nm

RTFTIR analisis frente a la temperatura

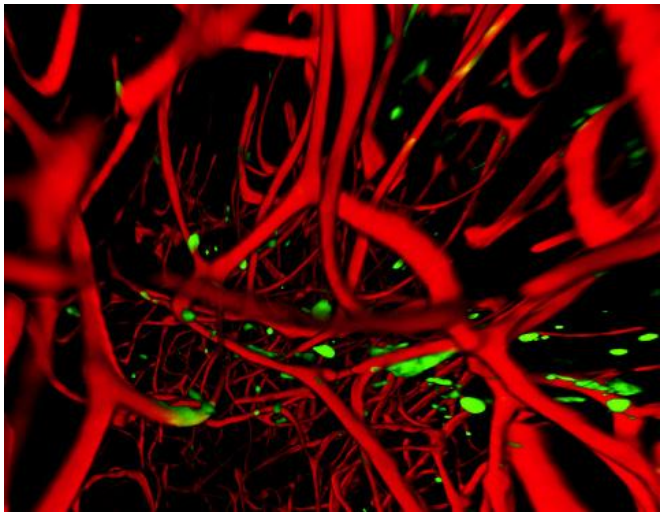


Perfiles cinéticos de reacciones de foto-polimerización de distintos tipos de acrilatos en aire y N2



ISSUE 4 2012 **RADTECH REPORT**

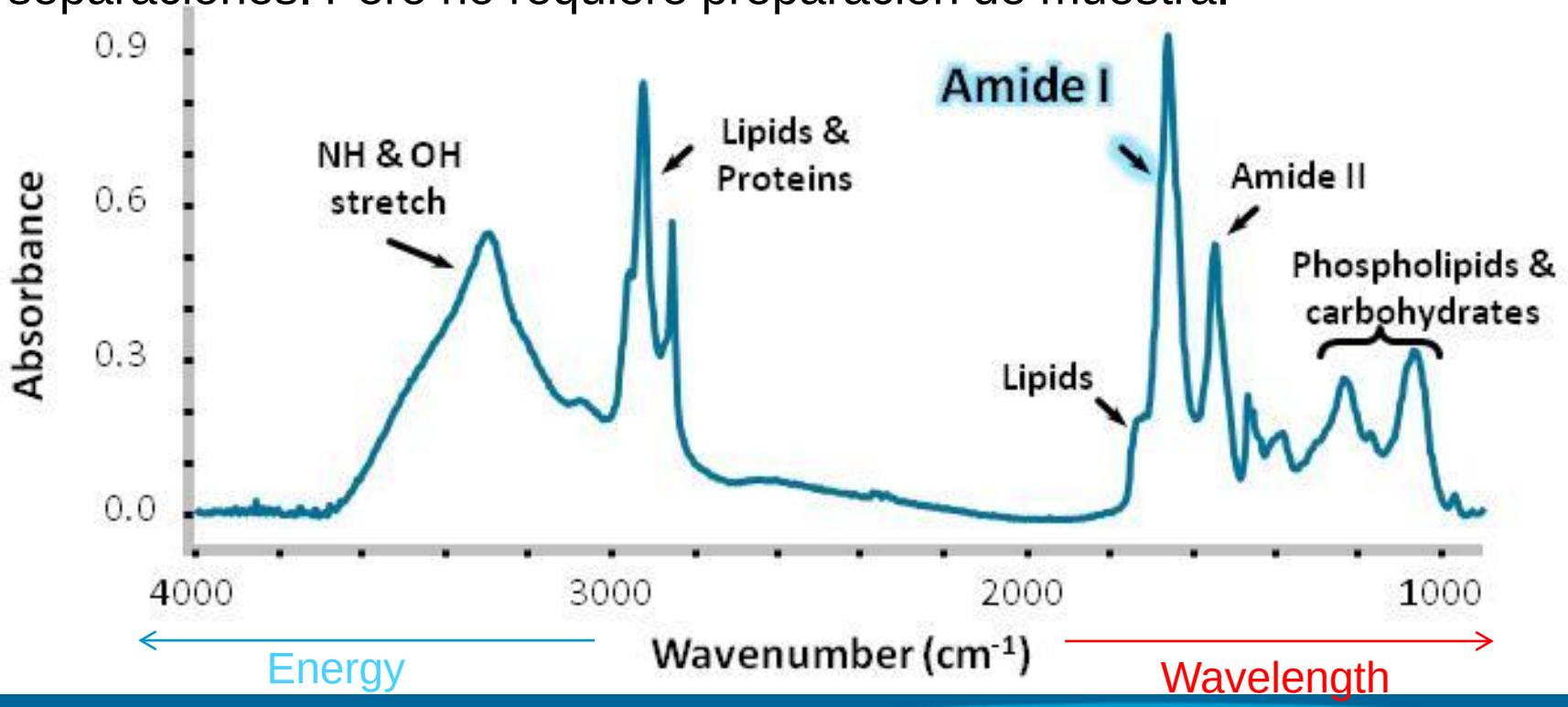
Cuarto ejemplo:



Microscopía FTIR aplicada al análisis de tejidos biológicos.

Interés de la Espectroscopía IR en el análisis de tejidos biológicos

- La espectroscopía FTIR permite estudiar la absorción de la luz por grupos funcionales relacionados con la presencia y estructura de determinadas macromoléculas en los sistemas biológicos.
- Los espectros representan la composición química total; no hay separaciones. Pero no requiere preparación de muestra.



Microscopios Serie 610-IR / 620-IR

Los Binoculares le permitirán ver la muestra y hacer los ajustes antes de recolectar los datos (CCD)

Un amplio abanico de objetivos le permitirá optimizar la recolección de datos

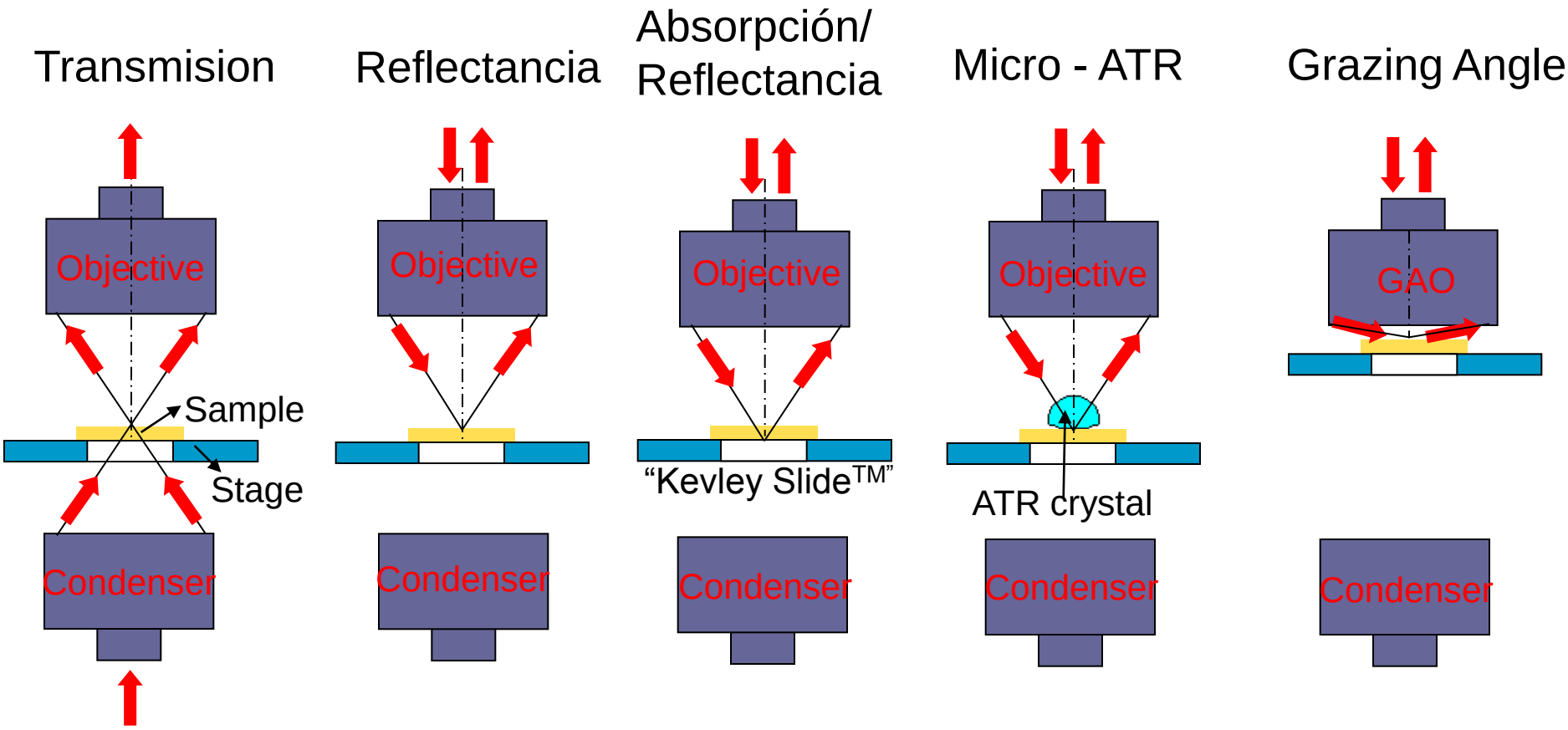




El Keypad permite el control directo del microscopio

Mueva sus muestras con el controlador joystick

Tecnicas de análisis posibles en los UMA 610/620



Grosor de muestra: 10 – 20 μm

Grosor de muestra : NA

Grosor de muestra : 5 - 10 μm

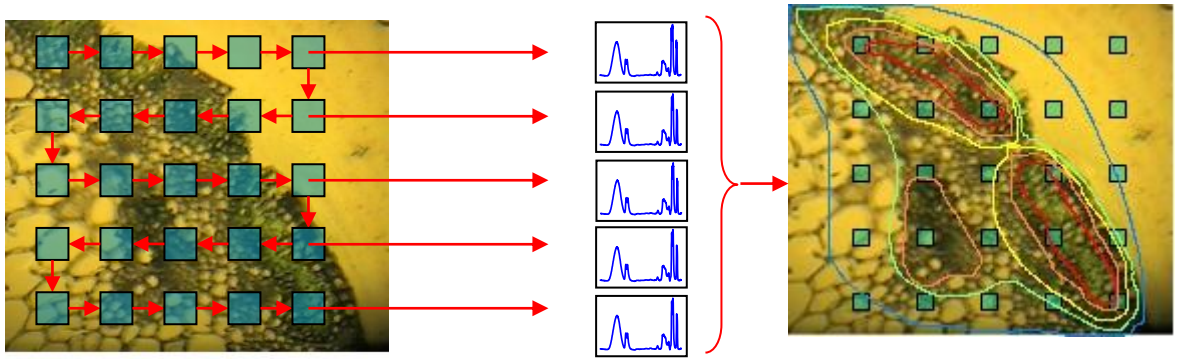
Grosor de muestra : NA

Grosor de muestra : NA

Modos de medida en espectroscopía FTIR

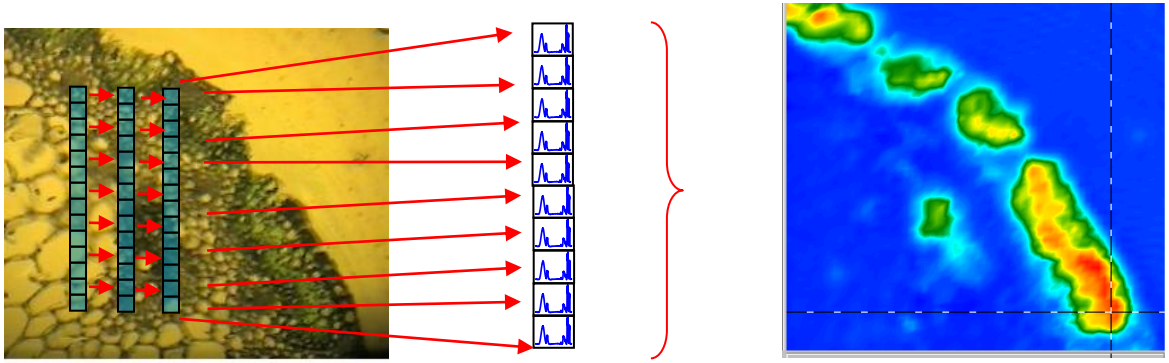
1: Mapping Single Point

Adquisición automatizada de espectros (uno a uno) definida con un grid a una resolución espacial definida por una máscara. Unos cientos de puntos pueden llevar horas.



2: Mapping Linear array

Adquisición de espectros a través de una fila de detectores (1x16). Más rápido que single point mapping, pero mucho más lento que los sistemas de imagen FPA.



Microscopía de imagen química: Detectores FPA

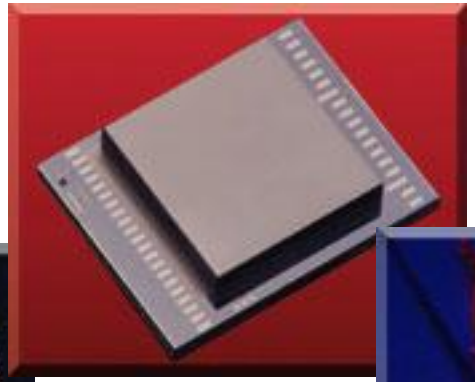


- Amplia variedad de detectores disponibles

- MCT, InSb, PtSi,Si, Si:As IBC, etc..
- Tamaños de matriz desde 40 x 16 hasta 1024 x 1024 pixels



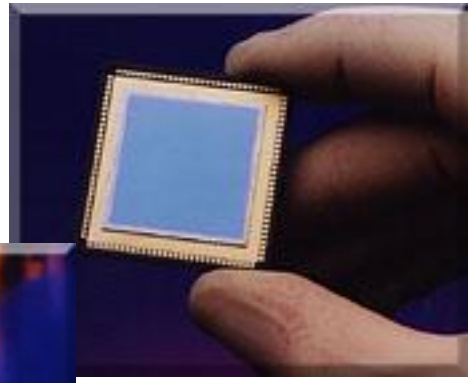
320 x 240 Si:As



128 x 128 MCT

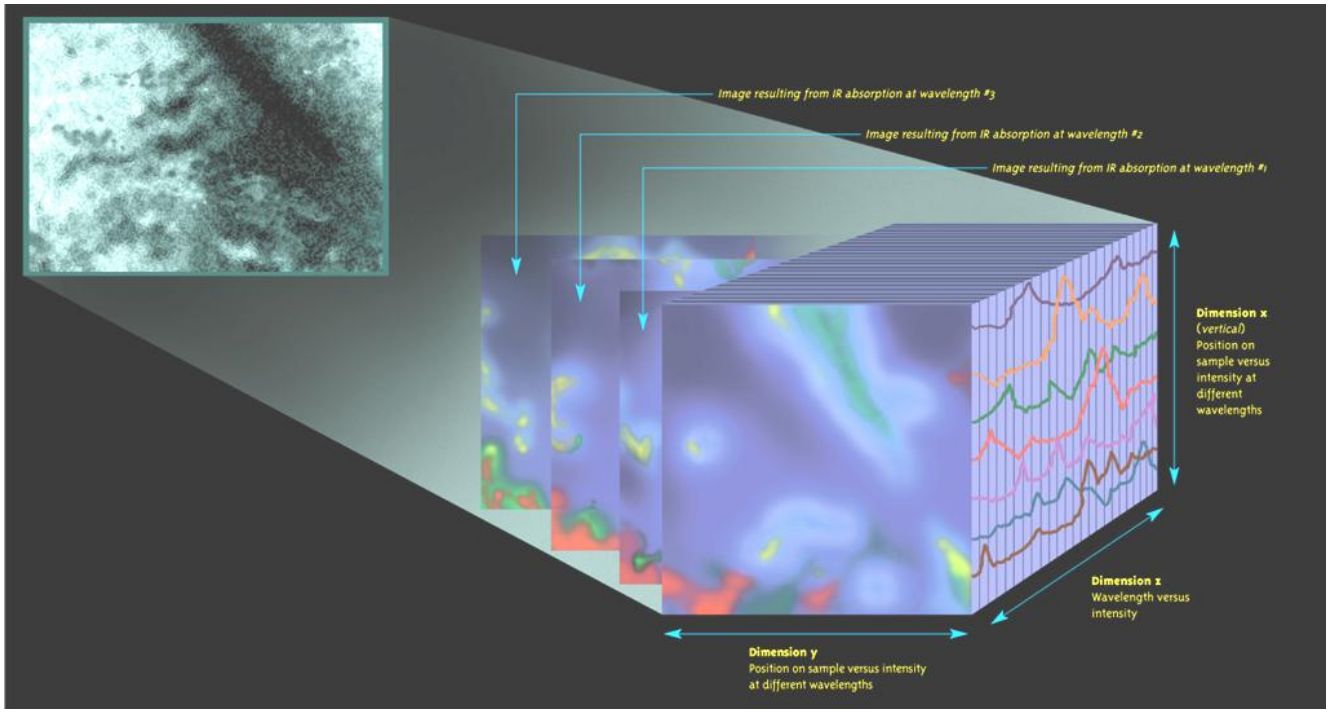


64 x 64 MCT



1024 x 1024 InSb

¿Qué es Imagen en FTIR?



En cada posición de la imagen hay un espectro

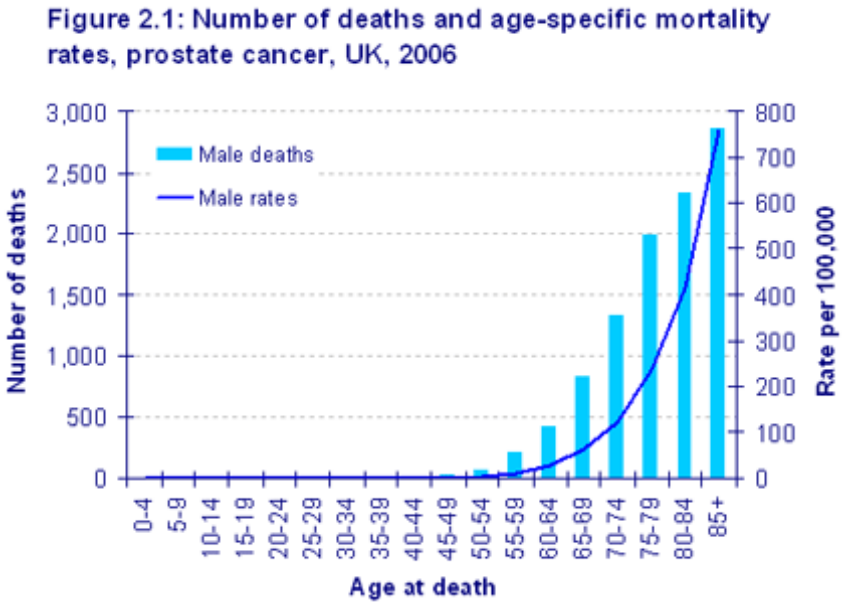
En cada punto del espectro hay una imagen

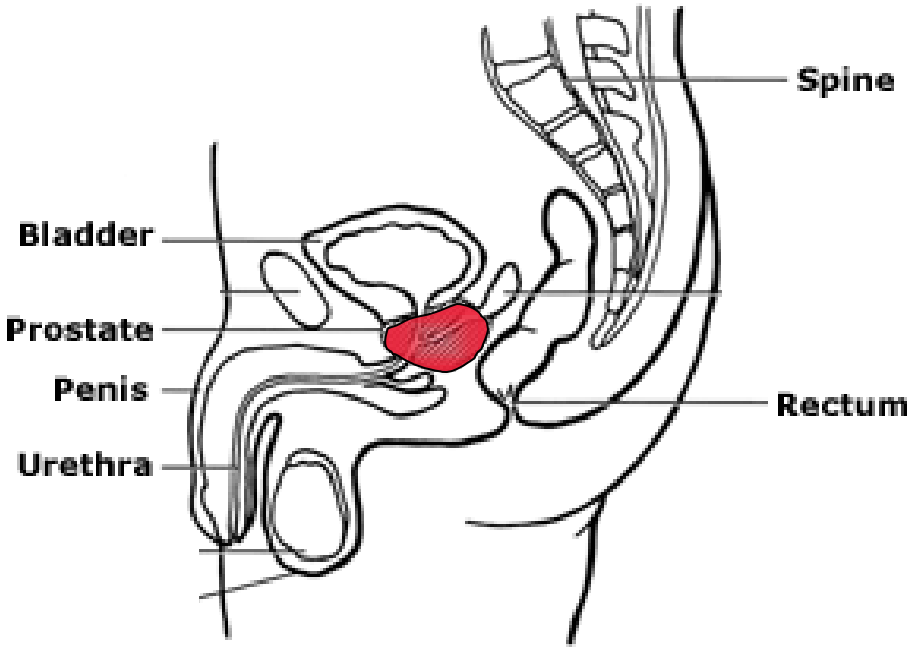
La imagen en cada punto del espectro está definida por la química de la muestra

Estudios de Cancer de Próstata con FTIR Imagen

En 1999 el ***Cancer de próstata*** desbancó al ***Cancer de pulmón*** como el cancer más diagnosticado en hombres en UK

En 2008 se produjeron aproximadamente **10.000 fallecimientos** atribuídos al cancer de próstata en UK

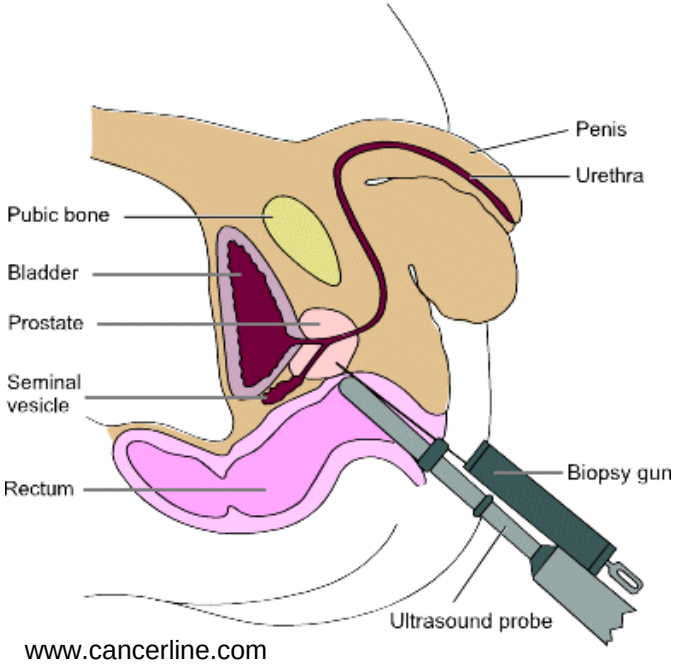




El diagnóstico se hace a través de una biopsia

Se hace una biopsia guiada por ultrasonografía. Habitualmente se toman 6, pero ya se empiezan a tomar 12-18 muestras espaciadas regularmente

Se comienza a hablar de incluso tomar más cantidad de muestras ~30 muestras

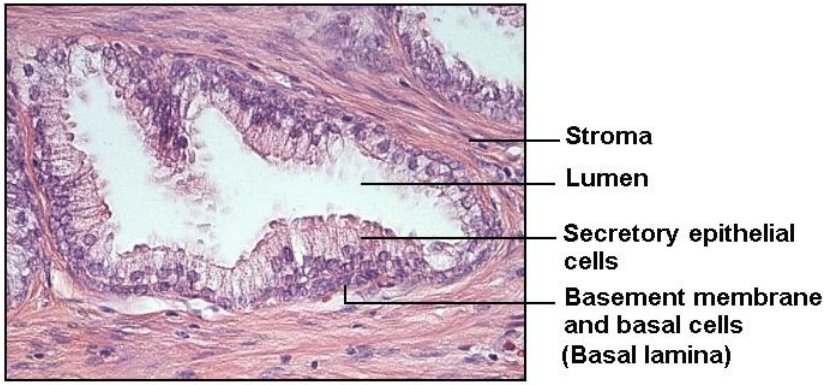


www.cancerline.com



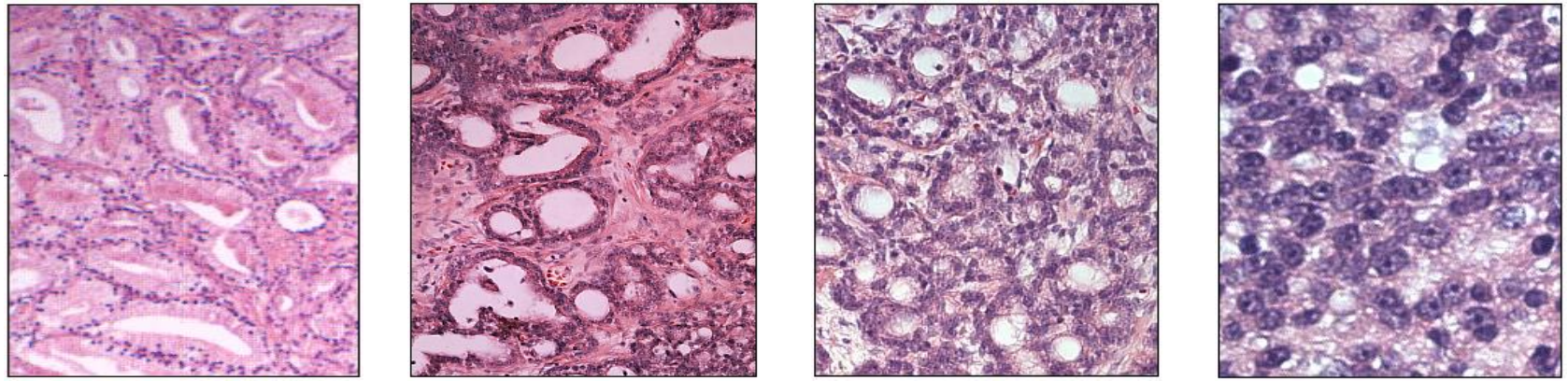
Pepe P, Aragona F, Urology 2007;70:1131–5

El sistema de grados de Gleason



Se usa un microscopio para relacionar la arquitectura del tejido al criterio de grado.

Grado 2 Grado 3 Grado 4 Grado 5



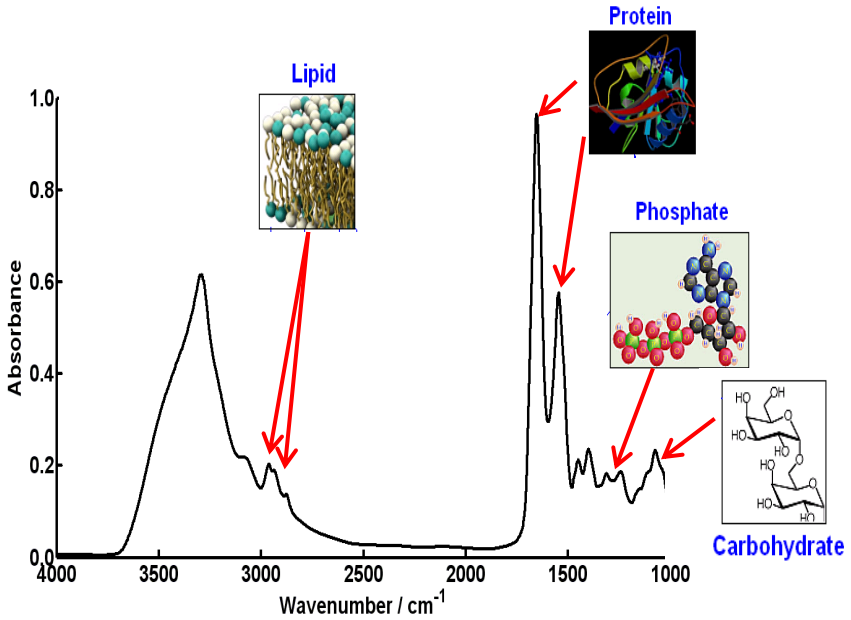
Aumento de la agresividad del tumor

Es necesaria la implementación de un método *objetivo*

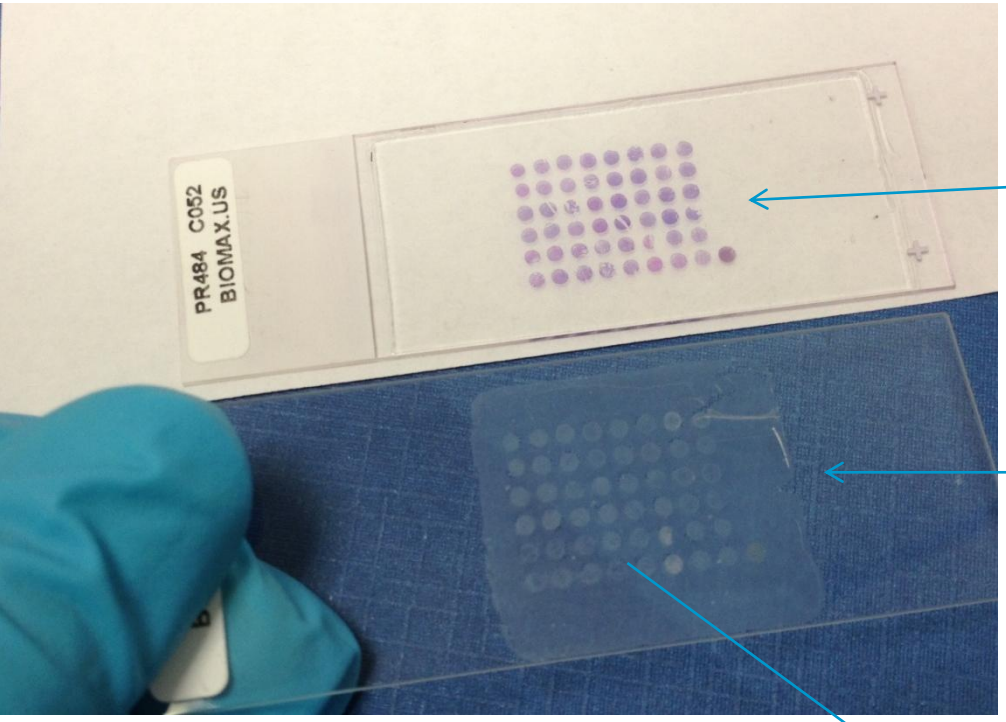
Se puede usar una firma biológica para distinguir entre los diferentes tipos de tejidos y relacionarlo con la escala de grados del cancer de próstata para desarrollar un método *objetivo* de diagnóstico?

Esa firma bioquímica puede ser obtenida usando la técnica de Espectroscopía por transformada de Fourier (FTIR)





Biopsias de aguja de varios pacientes



Tinción tradicional de H&E seguida de una evaluación subjetiva bajo un microscopio

Sección de tejidos adjacente SIN TINCION NI MARCAJES usada para análisis por FTIR de imagen seguida de un algoritmo cluster objetivo supervisado o no supervisado



Chemical Imaging for Tissue

Unstained Biopsy Sample

H&E Staining

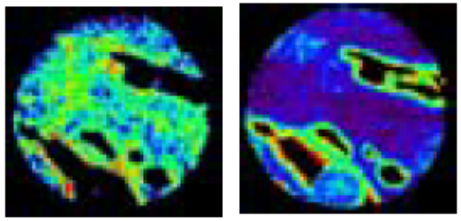


Pathologist

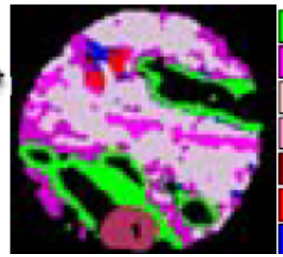
Histology
Grade
Therapy

Spectroscopic imaging





Computation



Epithelium
Fibrous Stroma
Pale Stroma
Smooth Muscle
Stone
Blood
Endothelium

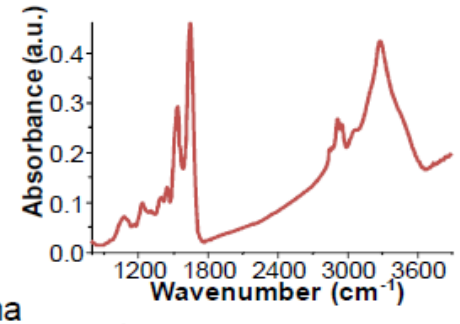
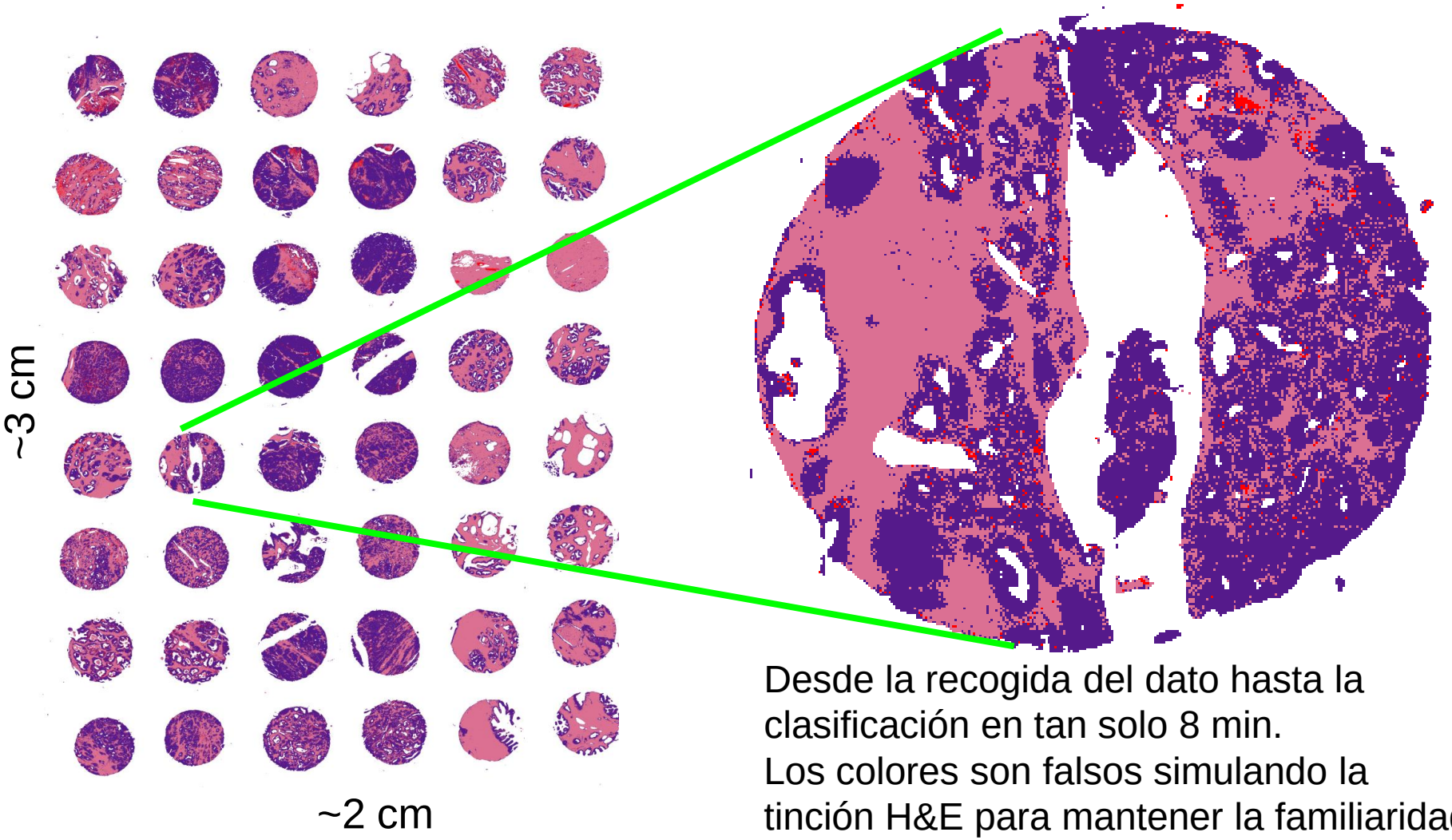
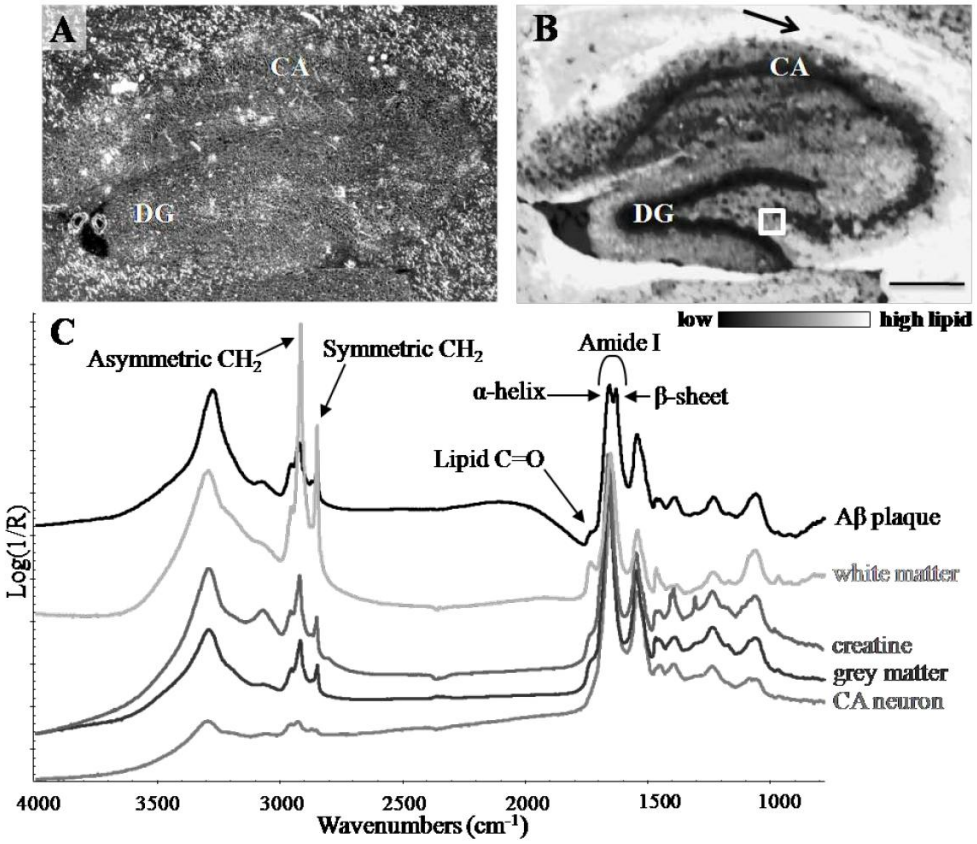


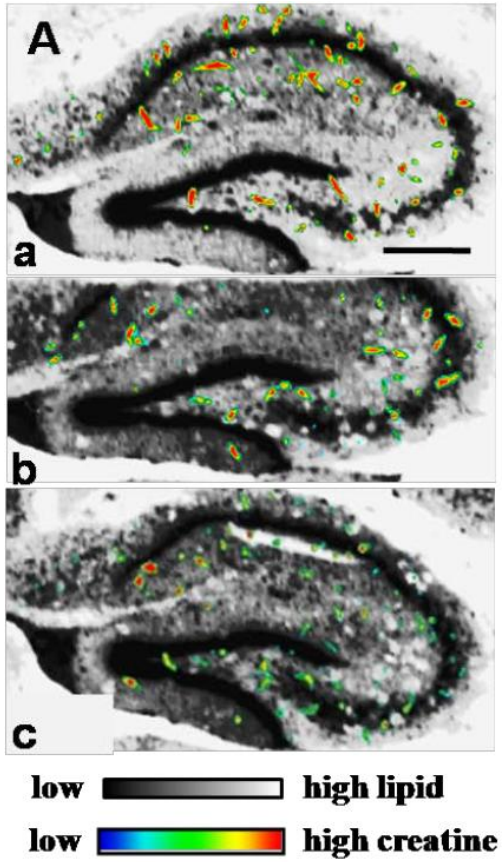
Imagen FTIR de un Micro Array de tejidos
(Procedentes de biopsia tejido por aguja)



Desde la recogida del dato hasta la clasificación en tan solo 8 min.
Los colores son falsos simulando la tinción H&E para mantener la familiaridad para los patólogos

Asociación entre placas amiloides, lípidos y creatinina en hipocampos de ratón.





http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.142174

Resumen

Agilent a día de hoy dispone de la gama más completa de equipos de altas prestaciones en UV-Vis-NIR y FTIR.

Disponemos de tecnologías diferenciales: Air bearing, Step scan, software DSP, microscopía de imagen en FTIR, o los sistemas Pbsmart, NMPS y accesorios específicos de Agilent en UV-Vis.

Todos estos sistemas permiten abrir nuevas posibilidades en la caracterización de nuevos materiales y aplicaciones biológicas.

THANK YOU

Fernando Tobalina
Spectroscopy Product Specialist
Agilent Technologies
fernando.tobalina@agilent.com

QUESTIONS?