UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA

JESSICA COLNAGHI FERNANDES

**Biossensores de pH, ureia e glicose utilizando a
microeletrônica de filmes finos de AZO e TiO₂**

Ribeirão Preto - SP
2016

JESSICA COLNAGHI FERNANDES

Biossensores de pH, ureia e glicose utilizando a microeletrônica de filmes finos de AZO e TiO₂

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:

Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Mulato.

Versão corrigida

Versão original disponível na FFCLRP-USP

Ribeirão Preto - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes, Jessica Colnaghi

Biossensores de pH, ureia e glicose utilizando a microeletrônica de filmes finos de AZO e TiO_2 / Jessica Colnaghi Fernandes; orientador Prof. Dr. Marcelo Mulato. Ribeirão Preto - SP, 2016. 251 f.:il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2016.

1. AZO. 2. TiO_2 . 3. biossensores. 4. pH. 5. ureia. 6. glicose.

Nome: FERNANDES, Jessica Colnaghi

Título: Biossensores de pH, ureia e glicose utilizando a microeletrônica de filmes finos de AZO e TiO₂

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

RESUMO

FERNANDES, J. C. **Biossensores de pH, ureia e glicose utilizando a microeletrônica de filmes finos de AZO e TiO₂**. 2016. 251 f. Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de biossensores de pH, ureia e glicose, utilizando óxidos como plataforma para a parte seletiva. Os filmes finos de óxidos condutores foram produzidos por diferentes técnicas de deposição, como spin-coat, dip-coat, spray-pyrolysis e casting. Os materiais fabricados foram AZO e TiO₂, ambos depositados sobre substratos de FTO, ITO ou vidro hidrofílico. O número de camadas foi variado para cada técnica e as caracterizações morfológicas e estruturais foram feitas por MEV, DRX e FTIR. As caracterizações elétricas foram feitas por EGFET e voltametria cíclica. Os filmes foram testados como sensores de pHs na faixa de 2 a 8. O filme depositado com AZO em substrato de FTO pela técnica de spray-pyrolysis apresentou melhor resposta, com sensibilidade de 31,7 mV/pH entre toda a faixa de pHs do 2 ao 8. Já para os filmes de TiO₂, o filme produzido por dip-coat com 5 camadas em substrato de FTO apresentou sensibilidade de 37,8 mV/pH entre a faixa de pHs de 2 a 8. Paralelamente, os filmes tiveram suas superfícies funcionalizadas com proteínas como urease ou glicose oxidase. Neste caso, os dispositivos foram testados entre as concentrações de 5 a 200 mg/dL de ureia e glicose. Como biossensor de ureia, o filme de TiO₂ depositado por spin-coat com 5 camadas em substrato de FTO apresentou a maior sensibilidade, com valor 3,32 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. Para os filmes estudados como biossensores de glicose, o melhor resultado também foi obtido pelo filme de TiO₂ depositado por spin-coat com 5 camadas em substrato de FTO, apresentando sensibilidade em torno de 6,18 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 200 mg/dL. Alguns resultados encontrados foram iguais ou melhores aos encontrados na literatura vigente, mesmo que os dispositivos ainda são passíveis de otimização.

Palavras-chave: 1. AZO. 2. TiO_2 . 3. biossensores. 4. pH. 5. ureia. 6. glicose.

ABSTRACT

FERNANDES, J. C. **pH, urea and glucose biosensors by the use of microelectronic of AZO and TiO₂ thin films** . 2016. 251 f. Thesis (Ph.D. - Postgraduate program in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2016.

This study presents the development of pH, urea and glucose biosensors, by the use of oxides as the base of the sensing membrane. Conducting oxide thin films were prepared by different deposition techniques, such as spin-coat, dip-coat, spray-pyrolysis, and casting. AZO and TiO₂ were produced and coated onto FTO, ITO and glass substrates. The number of layers were changed for each deposition technique, and the surface characterizations were made by SEM, XRD and FTIR, while the electrical characterizations were performed with an EGFET device and cyclic voltammetry. The samples were used as pH sensors in the pH range from 2 to 8. The AZO thin film onto FTO substrate deposited by spray-pyrolysis deposition technique presented sensitivity as 31.7 mV/pH for the total pH range from 2 to 8. TiO₂ thin films, produced by dip-coat deposition technique with 5 layers onto FTO substrate presented 37.8 mV/pH as sensitivity, for the same pH range. All the films have their surfaces immobilized with proteins as urease or glucose oxidase. In this case, the samples were performed in different concentrations of urea or glucose, respectively, from 5 to 200 mg/dL, for both. Urea biosensors presented good results for measurements performed with the same sample as well as performed with individuals samples, for all the concentrations range. Spin-coated TiO₂ thin films with 5 layers onto FTO substrates presented 3.32 mV/(mg/dL) as sensitivity from 5 to 120 mg/dL urea concentrations, while for glucose biosensors presented 6.18 mV/(mg/dL) for the same film between the glucose concentration range from 5 to 20 mg/dL. Some results were equal or better than the results in current literature, even the films are still capable of optimization.

Key-words: 1. AZO. 2. TiO₂. 3. biosensors. 4. pH. 5. urea. 6. glucose.

LISTA DE FIGURAS

1.1	Desenho esquemático das gerações dos biossensores [1]	4
1.2	Desenho esquemático de um biossensor	5
1.3	Diagrama de bandas de energia de um capacitor MOS com semicondutor do tipo p e com polarização nula ($V=0$), onde E_F é o nível de Fermi ou potencial químico tanto do semicondutor dopado como do metal, E_i é o nível de Fermi para o semicondutor intrínseco ou potencial químico do semicondutor intrínseco, E_C é a energia mínima da banda de condução do semicondutor, E_V é a energia máxima da banda de valência do semicondutor, E_g é a magnitude da região de energia proibida ou band-gap ($E_g=E_C-E_V$), $q\chi_i$ é a afinidade eletrônica do isolante, $q\chi$ é a afinidade eletrônica do semicondutor, $q\phi_m$ é a função trabalho do metal, isto é, a energia mínima necessária para retirar um elétron do metal e torná-lo um elétron livre, $q\phi_p$ é a função trabalho do semicondutor, isto é, a energia mínima necessária para retirar um elétron do semicondutor e torná-lo um elétron livre e $q\psi_{Bp}$ é a diferença de energia entre o potencial químico do semicondutor intrínseco e o do semicondutor dopado (nesse caso dopado tipo p) [2].	7
1.4	Diagramas de bandas de energia de um capacitor MOS com semicondutor do tipo p e com polarização, com configurações de: a) acumulação, b) depleção e c) inversão [2].	7
1.5	Desenho esquemático do MOSFET tipo p.	9
1.6	Respostas típicas do dispositivo MOSFET quando realizadas as medições: (a) VDS, com tensão Vgs fixa e (b) VGS, com tensão Vds fixa.	9
1.7	Desenho esquemático do dispositivo EGFET.	11
1.8	Comportamento iônico entre a superfície do sensor e os íons da solução.	12

1.9	Respostas típicas das medições: a) VDS, b) VGS e c) corrente ao longo do tempo, para filmes de óxidos no EGFET em função dos diferentes valores de pHs.	13
1.10	Desenho esquemático do potenciostato com a célula analítica com três eletrodos (referência, trabalho e contra eletrodo) para medição da voltametria cíclica [3].	14
1.11	Voltamograma cíclico, onde I_{pa} corresponde ao valor de corrente para o pico anódico e I_{pc} para o pico catódico. E_i é o potencial inicial, E_1 o potencial máximo e E_2 o potencial final. As setas tracejadas indicam o sentido da aplicação do potencial [4]	15
1.12	Voltamogramas cíclicos típicos para os processos (a) reversível, (b) quase-reversível e (c) irreversível [5]	17
1.13	Representação esquemática do site-binding model, onde o óxido está representado por grupos de SiOH [6]	18
1.14	Desenho esquemático do modelo de Gouy-Chapman-Stern [7].	21
1.15	Desenho esquemático dos tipos de imobilizações enzimáticas, sendo: a) adsorção, b) encapsulamento, c) ligação covalente e d) ligação covalente cruzada [8]	23
1.16	Molécula de urease [9]	25
1.17	Mecanismo de catálise da ureia pela enzima urease [9]	26
1.18	Mecanismo de catálise da glicose pela enzima glicose oxidase.	27
1.19	Resumo esquemático deste trabalho.	28
2.1	Processo de deposição pelo método de dip-coat [10].	32
2.2	Processo de deposição pelo método de spin-coat, (a) gotejamento da solução no substrato, (b) rotação da base com substrato, (c) evaporação do solvente e (d) formação do filme fino.	32
2.3	Processo de deposição pelo método de spray-pyrolysis [11].	33
2.4	Processo de deposição pelo método de casting.	33
2.5	Processo de imobilização de proteínas.	36
2.6	Formação da ligação crosslink entre o glutaraldeído e os grupos aminas residuais livres presentes nas enzimas [12, p. 48].	37

2.7	Sensibilidade retirada pela tangente da reta de ajuste linear dos pontos de correntes em função dos valores de pHs da medição VDS. .	41
2.8	Sensibilidade retirada pela tangente da reta de ajuste linear dos pontos de potencial em função dos valores de pHs da medição VGS. .	42
2.9	Modos de vibração molecular. Os sinais X indicam que os movimentos vibracionais ocorrem para dentro do plano do desenho, enquanto que os sinais • indicam movimento para fora do plano [13].	45
3.1	Vref x pH da média dos filmes depositados com 10 deposições por dip-coat em substratos de ITO pela Rota 04, com pós-aquecimento após cada deposição de 450 °C por 10 minutos e resfriamento por 20 minutos a temperatura ambiente. Sensibilidade de 24,75 mV/pH entre os pHs 3 e 8, com r^2 de 0,99.	48
3.2	Vref x pH dos filmes de ITO com sensibilidade de 37 mV/pH com $r^2 = 0,81$ entre os pHs 2 e 4 e 6,4 mV/pH com $r^2 = 0,98$ entre os pHs 4 a 7.	48
3.3	Valores finais das correntes Ids em função dos valores de pHs para os filmes depositados em substratos de ITO por dip-coat com 10 deposições pela Rota 04 com pós-aquecimento de 450 °C por 10 minutos e resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos por camada (quadrados pretos e círculos vermelhos), e do filme de ITO (triângulos verdes).	49
3.4	Vref x pH da média dos filmes depositados com 10 deposições por dip-coat em substratos de FTO pela Rota 04, com pós-aquecimento após cada deposição de 450 °C por 10 minutos e resfriamento por 20 minutos a temperatura ambiente. Sensibilidade de 25,62 mV/pH entre os pHs 3 e 8, com r^2 de 0,99.	50
3.5	Vref x pH dos filmes de FTO com sensibilidade 37,8 mV/pH com $r^2 = 0,96$ (linha preta) entre os pHs 2 e 6, e 11,3 mV/pH com $r^2 = 0,99$ (linha vermelha) entre os pHs 6 a 8.	50

3.6	Valores finais das correntes I_{ds} em função dos valores de pHs para os filmes depositados em substratos de FTO por dip-coat com 10 deposições pela Rota 04 com pós-aquecimento de 450 °C por 10 minutos e resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos por deposição (quadrados pretos e círculos vermelhos), e do filme de FTO (triângulos verdes).	51
3.7	$V_{ref} \times pH$ dos filmes depositados por spray-pyrolysis pela Rota 04 (AZO(7%)) em substratos de vidro com valores de sensibilidade de 40 mV/pH e r^2 de 0,99 (#1 – quadrados pretos) e 19,36 mV/pH com r^2 de 0,96 (#2 – círculos vermelhos).	53
3.8	$V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis pela Rota 04 com 3% de alumínio em substrato de FTO, com sensibilidade de 29,44 mV/pH e ajuste linear de 0,99.	54
3.9	$V_{ref} \times pH$ dos filmes depositados por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio em substrato de FTO, com sensibilidade de 27,28 mV/pH e r^2 de 0,92.	54
3.10	Resultados individuais dos filmes com o melhor (a) e o pior (b) resultado como sensores de pH depositados por spray-pyrolysis em substrato de FTO utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio, com sensibilidades de 31,7 mV/pH com r^2 de 0,99 entre os pHs 2 a 8 e 31,3 mV/pH com r^2 de 0,98 entre os pHs de 3 a 8, respectivamente.	55
3.11	$V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 8% de dopagem de alumínio, com sensibilidade de 30,9 mV/pH e r^2 de 0,99.	56
3.12	$V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis pela Rota 04 com 3% de alumínio em substratos de ITO. Sensibilidade em torno de 50,16 mV/pH (linha preta) entre os pHs 2 e 4, e de 14 mV/pH (linha vermelha) entre a faixa de pHs de 4 a 8, com ajustes lineares de 0,99 para ambas.	57

3.13	Vref x pH dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio em substratos de ITO, com sensibilidade de 24,2 mV/pH e r^2 de 0,99 na faixa de pHs entre 3-8. .	58
3.14	Resultados individuais dos filmes com o melhor (a) e o pior (b) resultado como sensores de pH depositados por spray-pyrolysis em substrato de ITO utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio, com sensibilidades de 26 mV/pH e r^2 de 0,99 entre os pHs 2 a 8, e 26 mV/pH com r^2 de 0,99 entre os pHs de 3 a 8, respectivamente.	58
3.15	Vref x pH dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 8% de dopagem de alumínio em substratos de ITO. Entre a faixa de pHs de 2 a 4 a sensibilidade possui valor de 77,7 mV/pH com r^2 de 0,99, e na faixa de pHs entre 4 e 8 a sensibilidade foi de 21,4 mV/pH com r^2 de 0,99.	59
3.16	Vref x pH dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 10% de dopagem de alumínio em substratos de ITO, com sensibilidade de 30 mV/pH e ajuste linear de 0,99.	60
3.17	Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme de FTO.	62
3.18	ΔE em função dos pHs para os filmes de FTO (quadrados pretos) e ouro (círculos amarelos).	63
3.19	(a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme de ITO, e (b) comparação dos valores de ΔE em função do pHs para os filmes de ITO (quadrados vermelhos), FTO (quadrados sólidos pretos) e ouro (círculos amarelos).	64
3.20	(a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme AZO/SP/FTO, e (b) comparação entre voltamogramas medidos no pH 02 dos filmes FTO (linha preta) e AZO/SP/FTO (linha azul). . .	65
3.21	(a) ΔE em função dos valores de pHs para os filmes AZO/SP/FTO (triângulos azuis) e FTO (quadrados pretos), e (b) n em função dos valores de pHs para os filmes AZO/SP/FTO (triângulos azuis) e FTO (quadrados pretos).	66

3.22	Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme AZO/SP/ITO. As setas indicam os valores de potenciais onde ocorrem dois processos de oxidação e um de redução no pH 02.	67
3.23	Imagens das espessuras dos filmes de: (a) FTO e (b) AZO/SP/FTO.	69
3.24	Imagens das espessuras dos filmes de: (a) ITO e (b) AZO/SP/ITO.	69
3.25	Imagens das superfícies dos filmes de: (a) FTO e (b) AZO/SP/FTO.	70
3.26	Imagens das superfícies dos filmes de: (a) ITO e (b) AZO/SP/ITO.	70
3.27	Difratograma dos filmes: AZO/SP/FTO (linha preta) e FTO (linha vermelha).	71
3.28	Difratogramas dos filmes AZO/SP/ITO (linha preta) e ITO (linha azul).	72
3.29	Comparação dos difratogramas dos filmes de AZO/SP/FTO (linha marrom) e AZO/SP/ITO (linha verde). As linhas verticais tracejadas indicam os picos referentes ao ZnO presentes em ambos os filmes.	73
3.30	FTIR do filme de FTO.	74
3.31	Comparação entre os espectros de absorbância de infravermelho dos FTO (linha preta) e AZO/SP/FTO (linha vermelha).	74
3.32	Comparação entre os espectros de absorbância de infravermelho dos ITO (linha preta) e AZO/SP/ITO (linha vermelha).	75
4.1	Corrente em função do tempo para os filmes FTO para diferentes concentrações de hidróxido de amônio.	78
4.2	Corrente em função do tempo para os filmes FTO para diferentes concentrações de fluoreto de amônio.	79
4.3	Corrente em função do tempo para os filmes FTO para diferentes concentrações de persulfato de amônio.	80
4.4	Ids em função das concentrações de ureia para os filmes U/FTO nas medições (a) US e (b) UI.	82

- 4.5 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,39 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 1,74 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de resposta útil dos biossensores. 83
- 4.6 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/AZO/SP/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,14 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,9 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 0,08 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. 85
- 4.7 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/ITO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 0,22 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é somente um guia para os olhos. 86
- 4.8 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/AZO/SP/ITO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,19 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 2,36 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade 1,33 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é somente um guia para os olhos. 87
- 4.9 Perfis voltamétricos para os filmes U/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos. 89
- 4.10 Perfis voltamétricos para os filmes U/AZO/SP/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI. 91

- 4.11 Perfis voltamétricos para os filmes de U/ITO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é somente um guia para os olhos 93
- 4.12 (a) Perfis voltamétricos e (b) ΔE em função da concentração de ureia para a medição US e (c) perfis voltamétricos para a medição UI, para os filmes U/AZO/SP/ITO. A linha vermelha é um guia para os olhos. 94
- 4.13 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 1,2 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,5 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. 97
- 4.14 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/AZO/SP/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,5 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL e de 0,08 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,56 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 0,18 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. 98
- 4.15 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/ITO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 3,18 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. 99
- 4.16 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/AZO/SP/ITO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 2,96 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. 100
- 4.17 Perfis voltamétricos para os filmes G/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. 102

4.18	Perfis voltamétricos para os filmes G/AZO/SP/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US, (b) UI e (c) ΔE em função da concentração de glicose para a medição US.	104
4.19	Perfis voltamétricos para os filmes de G/ITO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos	106
4.20	Perfis voltamétricos para os filmes G/AZO/SP/ITO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US, (b) UI e, (c) ΔE em função da concentração de glicose para as medição US. A linha vermelha é um guia para os olhos	107
5.1	$V_{ref} \times pH$ dos filmes $TiO_2/SC_1/FTO$ com a Rota 04. Valor de sensibilidade de 90,95 mV/pH entre os pHs 2-4 (linha preta sólida), e de 30,98 mV/pH entre os pHs 4-8 (linha preta pontilhada).	113
5.2	$V_{ref} \times pH$ dos filmes $TiO_2/SC_5/FTO$ com a Rota 04. Valor de sensibilidade de 49,1 mV/pH e r^2 de 0,94 entre os pHs 2-4 (linha preta sólida) e de 9,5 com r^2 de 0,97 mV/pH entre os pHs 4-8 (linha preta pontilhada).	114
5.3	$V_{ref} \times pH$ da média dos filmes $TiO_2/DC_1/FTO$ com a Rota 04. Sensibilidade de 39,7 mV/pH e r^2 de 0,85 entre os pHs 2-5 (linha preta sólida) e de 12,5 mV/pH e r^2 de 0,99 entre os pHs 5-8 (linha preta pontilhada).	115
5.4	$V_{ref} \times pH$ da média dos filmes $TiO_2/DC_{5-1}/FTO$ com a Rota 04. Sensibilidade de 25,5 mV/pH entre os pHs 2-8.	116
5.5	$V_{ref} \times pH$ da média dos filmes $TiO_2/DC_5/FTO$ com a Rota 04 com 4 horas de forno a 200 °C. Sensibilidade de 37,9 mV/pH entre os pHs 2-8.	117
5.6	Ponto de alteração da linearidade por faixa de pH em função do número de deposições realizadas por casting pela Rota 04 em substratos de FTO.	120
5.7	Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme $TiO_2/DC_5/FTO$	122

5.8	(a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs e (b) ΔE em função dos pHs, para o filme $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$	123
5.9	(a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs do filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$, (b) ΔE em função dos pHs para o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ e (c) perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$	124
5.10	Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, (b) $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$, (c) $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ e (d) comparação entre os perfis voltamétricos no pH 02 em função do número de deposições.	125
5.11	ΔE em função dos pHs para os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (quadrados pretos) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (círculos vermelhos).	126
5.12	Imagens das espessuras dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$	127
5.13	Imagens das superfícies dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$	127
5.14	Imagens das espessuras dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$	128
5.15	Imagens das superfícies dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$	128
5.16	Imagens das (a) espessuras dos filmes (I) $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, (II) $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e (III) $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$, e das (b) superfícies dos filmes (IV) $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, (V) $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e (VI) $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$	129
5.17	Difratograma dos filmes produzidos por: (a) spin-coat e (b) dip-coat, com 1 deposição (linhas pretas) e 5 deposições (linhas vermelhas). . .	130
5.18	(a) Difratogramas dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha verde) e (b) comparação entre os difratogramas dos filmes com 1 deposição produzidos por spin-coat (linha preta), dip-coat (linha vermelha) e casting (linha verde).	132

5.19	Comparação entre os difratogramas do filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (linha preta) e do filme FTO (linha vermelha).	133
5.20	Espectro de absorbância (FTIR) dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (linha verde), do filme de FTO (linha azul pontilhada) e do etanol (linha rosa pontilhada - * retirada da referência [14]).	135
5.21	Aumento da figura 5.20 dos espectros de absorbância dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (linha verde), do filme de FTO (linha azul pontilhada) e do etanol (linha rosa pontilhada) nas regiões (a) 3400 a 2600 cm^{-1} e (b) 1800 a 600 cm^{-1}	136
5.22	Espectros de absorbância na região entre 1700 e 600 cm^{-1} dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ (linha verde).	136
6.1	ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes $\text{U}/\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ nas medições (a) US, com sensibilidade de $0,78\text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$ entre as concentrações de 40 a $120\text{ mg}/\text{dL}$ e $0,15\text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$ entre as concentrações de 120 a $200\text{ mg}/\text{dL}$, e (b) UI. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.	139
6.2	ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes $\text{U}/\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$ nas medições (a) US, com sensibilidade de $0,48\text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$ entre as concentrações de 5 a $80\text{ mg}/\text{dL}$ e $0,06\text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$ entre as concentrações de 80 a $160\text{ mg}/\text{dL}$, e (b) UI, com sensibilidade de $3,32\text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$ entre as concentrações de 5 a $120\text{ mg}/\text{dL}$. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. . .	140

- 6.3 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,05 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e (b) UI, com sensibilidade de 0,82 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 200 mg/dL. A linha vermelha é um guia para os olhos. 141
- 6.4 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/DC₅/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,18 mV/(mg/dL) e (b) UI, com sensibilidade de 0,23 mV/(mg/dL). . . . 142
- 6.5 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/CA₁/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,61 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e (b) UI, com sensibilidade de 0,39 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. 143
- 6.6 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/CA₄/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,32 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 0,06 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,47 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. . . . 144
- 6.7 ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/CA₈/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,16 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 160 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,67 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. . . 145
- 6.8 Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO₂/SC₁/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI, e (c) ΔE em função da concentração de ureia para a medição UI. A linha vermelha é um guia para os olhos. 147

6.9	Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO ₂ /SC ₅ /FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos.	149
6.10	Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO ₂ /DC ₁ /FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos.	151
6.11	Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO ₂ /DC ₅ /FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI.	152
6.12	Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO ₂ /CA ₁ /FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para a medição (c) US. A linha vermelha é um guia para os olhos.	153
6.13	Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO ₂ /CA ₄ /FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI.	154
6.14	Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO ₂ /CA ₈ /FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para a medição (c) UI.	155
6.15	ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO ₂ /SC ₁ /FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,05 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 2,32 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes.	158
6.16	ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO ₂ /SC ₅ /FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 6,18 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.	159

- 6.17 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/DC₁/FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 0,48 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 e 200 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. 160
- 6.18 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/DC₅/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 1,27 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 e 80 mg/dL e 0,16 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 80 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 6,31 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. . . . 160
- 6.19 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/CA₁/FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 0,47 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. 161
- 6.20 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/CA₄/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,17 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,51 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. 162
- 6.21 ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/CA₈/FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 2,16 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos. 163
- 6.22 Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/SC₁/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. . 164

6.23	Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO ₂ /SC ₅ /FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. .	166
6.24	Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO ₂ /DC ₁ /FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. .	168
6.25	Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO ₂ /DC ₅ /FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. .	169
6.26	Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO ₂ /CA ₁ /FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. .	170
6.27	Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO ₂ /CA ₄ /FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. .	172
6.28	Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO ₂ /CA ₈ /FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e (c) ΔE em função da concentração de glicose para a medição US.	173
A.1	Vref x pH dos filmes depositados por spin-coat com a Rota 03, com 4 deposições e pré-aquecimento por deposição de 200 °C por 10 minutos em substratos de vidro (quadrados pretos - sensibilidade de 12 mV/pH com r ² de 0,95) e FTO (círculos vermelhos - sensibilidade de 19,6 mV/pH com r ² de 0,74).	204
A.2	Vref x pH dos filmes produzidos por spin-coat com 4 deposições e pré-aquecimento de 100 °C por 10 minutos, em substratos de ITO utilizando a Rota 02.	207
A.3	Vref x pH dos filmes produzidos por dip-coat em substratos de ITO com a Rota 02, com 4 deposições e pré-aquecimento de 100 °C por 10 minutos.	210
B.1	FTIR dos filmes AZO/SP/FTO (linha preta) e U/AZO/SP/FTO (linha vermelha).	214

B.2 FTIR dos filmes AZO/SP/ITO (linha preta) e U/AZO/SP/ITO (linha vermelha).	214
B.3 FTIR dos filmes TiO ₂ /SC ₁ /FTO (linha preta) e U/TiO ₂ /SC ₁ /FTO (linha vermelha).	215
B.4 FTIR dos filmes TiO ₂ /DC ₁ /FTO (linha preta) e U/TiO ₂ /DC ₁ /FTO (linha vermelha).	216
B.5 FTIR dos filmes TiO ₂ /CA ₈ /FTO (linha preta) e U/TiO ₂ /CA ₈ /FTO (linha vermelha).	216

LISTA DE TABELAS

2.1	Siglas utilizadas na nomeação dos filmes referentes as técnicas de deposição utilizadas.	37
2.2	Nomenclatura dos filmes finos estudados neste trabalho.	39
3.1	Valores dos potenciais onde ocorrem as reações de oxidação (E_{ox}) e redução E_{red} e do ΔE ($\Delta E = E_{ox} - E_{red}$) em função dos diferentes valores de pHs, para os filmes de FTO e de ouro.	63
3.2	Comparação entre os valores obtidos por XRD para o filme AZO/SP/FTO e os valores da literatura para ZnO.	72
5.1	Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares para diferentes faixas de pHs da média dos filmes $TiO_2/SC_1/FTO$ produzidos com a Rota 04 e de cada filme individualmente.	112
5.2	Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares para diferentes faixas de pHs da média dos filmes $TiO_2/DC_1/FTO$ com a Rota 04 e individualmente.	116
5.3	Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares para diferentes faixas de pHs da média dos filmes $TiO_2/DC_{5-1}/FTO$ com a Rota 04 e dos resultados individuais.	116
5.4	Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares por faixa de pH para os filmes depositados por casting pela Rota 04 em substratos de ITO com 1 a 8 deposições.	118
5.5	Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares por faixa de pH para os filmes depositados por casting pela Rota 04 em substratos de FTO com 1 a 5 deposições ($c1-c5$) e com 1 a 8 deposições ($c1^*-c8^*$).	119
5.6	Relação percentual entre os picos dos filmes com 1 e 5 deposições depositados por spin-coat e dip-coat em função de 2θ	131
5.7	Relação percentual entre os picos dos filmes $TiO_2/CA_1/FTO$, $TiO_2/CA_4/FTO$ e $TiO_2/CA_8/FTO$ em função de 2θ	132
5.8	Relação percentual entre os picos do filme $TiO_2/CA_8/FTO$ com o filme FTO em função de 2θ	133

- 7.1 Resumo das principais sensibilidades em função da faixa de respostas para os sensores de pH, biossensores de ureia e biossensores de glicose. 181

SUMÁRIO

Lista de Figuras	viii
------------------	------

Lista de Tabelas	xxiv
------------------	------

1	Introdução	1
1.1	Introdução	1
1.2	Teoria	3
1.2.1	Biossensores	3
1.2.2	Dispositivos por efeito de campo	6
1.2.3	Voltametria Cíclica	14
1.2.4	Sensores de íons	18
1.2.5	Ureia e Glicose	22
1.3	Objetivos	27
1.3.1	Objetivos Gerais	27
1.3.2	Objetivos Específicos	28
2	Materiais e Métodos	30
2.1	Tratamento dos substratos	30
2.2	Rotas utilizadas para deposição dos filmes finos	30
2.3	Métodos de deposição	31
2.3.1	Parâmetros utilizados na deposição dos filmes de AZO	33
2.3.2	Parâmetros utilizados na deposição dos filmes de TiO ₂	34
2.4	Soluções	35
2.4.1	pH	35
2.4.2	Uréia	35
2.4.3	Glicose	35
2.5	Imobilização de proteínas	35
2.6	Nomenclatura dos filmes	36
2.7	Caracterização dos filmes	40
2.7.1	EGFET	40
2.7.2	Voltamétrica Cíclica	42

2.7.3	Miscroscopia Eletrônica de Varredura - MEV	43
2.7.4	Difração de Raios-X - DRX	44
2.7.5	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR	44
3	Estudo dos filmes finos de óxido de zinco dopados com alumínio - AZO	46
3.1	Caracterizações elétricas	46
3.1.1	Substratos de vidro	52
3.1.2	Substratos de FTO	52
3.1.3	Substratos de ITO	56
3.1.4	Voltametria Cíclica	61
3.2	Caracterizações Morfológicas e Estruturais	68
3.2.1	Microscopia Eletrônica por Varredura - MEV	68
3.2.2	Difratometria de Raios-X - DRX	70
3.2.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR	73
4	Biossensores de ureia e glicose utilizando filmes AZO	77
4.1	Biossensor de ureia	77
4.1.1	EGFET	77
4.1.1.1	Interações dos íons amônio com a superfície dos filmes	77
4.1.1.2	U/FTO	81
4.1.1.3	U/AZO/SP/FTO	84
4.1.1.4	U/ITO	85
4.1.1.5	U/AZO/SP/ITO	86
4.1.2	Voltametria Cíclica	88
4.1.2.1	U/FTO	88
4.1.2.2	U/AZO/SP/FTO	90
4.1.2.3	U/ITO	92
4.1.2.4	U/AZO/SP/ITO	92
4.2	Biossensor de glicose	96
4.2.1	EGFET	96

4.2.1.1	G/FTO	96
4.2.1.2	G/AZO/SP/FTO	97
4.2.1.3	G/ITO	99
4.2.1.4	G/AZO/SP/ITO	100
4.2.2	Voltametria Cíclica	101
4.2.2.1	G/FTO	101
4.2.2.2	G/AZO/SP/FTO	104
4.2.2.3	G/ITO	105
4.2.2.4	G/AZO/SP/ITO	107
5	Estudo dos filmes finos de óxido de titânio - TiO_2	111
5.1	Caracterizações elétricas	111
5.1.1	Spin-coat	111
5.1.2	Dip-coat	113
5.1.3	Casting	117
5.1.4	Voltametria Cíclica	121
5.2	Caracterizações Morfológicas e Estruturais	126
5.2.1	Microscopia Eletrônica por Varredura - MEV	127
5.2.2	Difratogramas de Raios-X - DRX	130
5.2.3	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR	135
6	Biossensores de ureia e glicose utilizando filmes de TiO_2	138
6.1	Biossensor de ureia	138
6.1.1	EGFET	138
6.1.1.1	Spin-coat	138
6.1.1.2	Dip-coat	141
6.1.1.3	Casting	143
6.1.2	Voltametria Cíclica	146
6.1.2.1	Spin-coat	146
6.1.2.2	Dip-coat	150
6.1.2.3	Casting	152
6.2	Glicose	157

6.2.1	EGFET	157
6.2.1.1	Spin-coat	158
6.2.1.2	Dip-coat	159
6.2.1.3	Casting	161
6.2.2	Voltametria Cíclica	163
6.2.2.1	Spin-coat	163
6.2.2.2	Dip-coat	167
6.2.2.3	Casting	169
7	Conclusões e Perspectivas	175
7.1	Conclusões	175
7.2	Perspectivas	182
	Referências	183
A	Rotas utilizadas para produção dos filmes finos de óxidos de zinco e de titânio	200
A.1	Produção dos filmes - Óxido de zinco (ZnO)	200
A.1.1	Rotas	200
A.2	Produção dos filmes - TiO ₂	205
A.2.1	Rotas	205
B	Caracterização por FTIR dos filmes finos de óxidos imobilizados com urease	213
B.1	Filmes U/AZO/SP/FTO e U/AZO/SP/FTO	213
B.2	Filmes U/TiO ₂ /SC ₁ /FTO, U/TiO ₂ /DC ₁ /FTO e U/TiO ₂ /CA ₈ /FTO	215
	Anexos	218
	Padrões Raios-X	218

INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

BIOSENSORES são sensores químicos cujo reconhecedor é um componente biológico ativo utilizado para detecção de um analito específico, onde o processo bioquímico é a fonte do sinal analítico. O desenvolvimento de novos biossensores é de extrema importância para utilização na área médica, visando principalmente à miniaturização destes dispositivos, com menor quantidade de amostra, somados a rápida resposta, alta sensibilidade e seletividade. Para isso, diversos materiais para produção de biossensores já foram propostos na literatura utilizando a tecnologia de filmes finos.

Os filmes finos desempenham uma função essencial em dispositivos, circuitos integrados e em sensores. Normalmente, são formados por grãos monocristalinos dispostos em várias direções cristalográficas. Podem ser condutores, semicondutores ou isolantes, dependendo da utilização requerida [15]. Os filmes finos apresentam uma infinidade de aplicações tecnológicas, como por exemplo, a utilização como dispositivos eletrocromáticos [16, 17], fotovoltaicos [18, 19], fotoluminescentes [20], sensores [21], baterias de estado sólido [22] e células solares [23, 24] entre muitos outros. Já os filmes finos de óxidos são largamente utilizados como materiais sensíveis para diversos tipos de sensores, como por exemplo, sensores de pH [25], glicose [26], ureia [27], cálcio [28], glutamato [29], DNA [30] e ácido úrico [31].

Existem diversos tipos de deposição de filmes finos, sendo que as propriedades dos filmes, como por exemplo, o tamanho do grão e a rugosidade, são altamente dependentes do processo de deposição. A escolha do material também é de extrema

importância, pois a sensibilidade do sensor vai depender largamente das propriedades deste material. Muitos materiais são amplamente utilizados em sensores, como óxido de zinco (ZnO) [32], óxido de estanho puro (SnO₂) [33] ou dopado com flúor (FTO) [34], óxido de tungstênio (WO₃) [35], pentóxido de tântalo (Ta₂O₅) [36], óxido de titânio (TiO₂) [37], entre outros.

Os filmes de ZnO têm atraído significativa atenção devido as suas propriedades óticas e elétricas, podendo ser aplicado em um ampla área. O ZnO é um material semicondutor muito versátil, o qual exibe uma interessante combinação entre as propriedades piezelétrica, elétrica, ótica e térmica, e com isso, pode ser aplicado nas áreas de eletrônica e optoeletrônica, sensores de gases, osciladores ultra-sônicos, eletrodos transparentes em células solares, biossensores, entre outros [38]. O ZnO possui uma vasta resposta em função do pH, sendo amplamente aplicado como sensor de pH. Devido ao seu alto ponto isoelétrico, ou ponto de zero carga, em torno de 9,5, filmes de ZnO são altamente apropriados para a adsorção de proteínas ou enzimas com baixo ponto isoelétrico, e por isso, este material é de grande interesse na construção de biossensores [39].

O TiO₂ é um material amplamente estudado, devido a sua versatilidade [40]. Como propriedades deste material podem ser citados seu elevado índice de refração, foto estabilidade e biocompatibilidade [41]. É um material de grande utilização tecnológica, como sensores de gases, células fotovoltaicas e biossensores [40]. São largamente utilizados como filmes finos devido às suas propriedades físicas [42]. Filmes finos de TiO₂ foram propostos para aplicações em sensores de pH devido a sua abrangente faixa de resposta em função do pH, alta sensibilidade e baixo custo [43]. Seu uso em biossensores se deve a boa compatibilidade e alta uniformidade [44].

Diversos estudos e desenvolvimento de sensores avançam rapidamente devido ao grande crescimento de aplicações em diferentes áreas, como clínica química e processos industriais. Além disso, a determinação dos valores de pH é uma das tarefas mais importantes em química analítica [45]. A medida de pH é um dos procedimentos mais importantes e mais freqüentes para a bioquímica, pois o pH afeta a estrutura e a atividade das macromoléculas biológicas, como por exemplo a atividade catalítica das enzimas [46]. As medidas de pH do sangue e da urina

são comumente empregadas no diagnóstico médico [47]. Com isso, os estudos no desenvolvimento de biossensores de pH vêm crescendo muito atualmente, para serem utilizados na área médica.

Diversos tipos de dispositivos são utilizados para detecção de analitos utilizando biossensores. Os dispositivos potenciométricos são de grande interesse nesse campo, como por exemplo os dispositivos baseados em efeito de campo.

Os transistores por efeito de campo (FETs) foram empregados pela primeira vez para medidas neurofisiológicas por Bergveld em 1970 [48]. A partir disso, transistores por efeito de campo sensíveis a íons (ISFETs) foram desenvolvidos em um novo tipo de eletrodo químico-sensível. Diversos estudos teóricos e experimentais têm sido publicados para descrever o comportamento desses dispositivos eletrônicos químico-sensíveis [49]. O primeiro material utilizado como dielétrico sensível a pH para o ISFET foi o dióxido de silício (SiO_2) [50], sendo depois testados materiais como Al_2O_3 (óxido de alumínio), Si_3N_4 (nitreto de silício), Ta_2O_5 (pentóxido de tântalo) e SnO_2 (óxido de estanho) [51, 52, 53, 54].

O ISFET possui como principal desvantagem sua difícil fabricação, além da impossibilidade de troca da camada sensível a íons, impedindo a reutilização do dispositivo. Para minimizar esses problemas, foi desenvolvido o dispositivo chamado EGFET (extended-gate field-effect-transistor), onde a camada seletiva a íons é ligada a porta de um MOSFET comercial por um fio, sendo por isso chamado de porta estendida [55, 56].

1.2 Teoria

1.2.1 Biossensores

A crescente necessidade de identificação e quantificação dos metabólitos de forma rápida, específica e em pequenas quantidades de amostras no campo da medicina, trouxe um eminente crescimento no desenvolvimento de biossensores [38, 57, 58]. Os biossensores possuem diversas aplicações na área médica, com intuito de produção em larga escala de forma miniaturizada e com preços acessíveis. A miniaturização dos dispositivos permite uma menor invasão ao paciente, adicionado a respostas rápidas e efetivas, características dos biossensores [47, 58].

Dependendo do mecanismo utilizado na transferência de elétrons, os biossensores podem ser classificados em primeira, segunda ou terceira gerações. Os biossensores de primeira geração são classificados pelo acoplamento eletrônico entre a enzima e o eletrodo baseado na eletroatividade do substrato da enzima, ou no produto gerado na reação enzimática. Neste caso, substrato é definido como a molécula na qual a enzima age especificamente. O sinal amperométrico é produzido pela oxidação ou redução do substrato sobre a superfície do eletrodo. Os biossensores de segunda geração são classificados quanto a sua eletroatividade, por auxílio de mediadores livres em solução ou imobilizados com a enzima. O mediador diminui o potencial de detecção, de modo a reduzir a interferência causada por outros compostos que poderiam oxidar sobre a superfície do eletrodo. Já os biossensores de terceira geração, são classificados pela transferência direta de elétrons entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima. Para isso, a distância entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo deve ser de maior aproximação, pois a transferência direta só será possível quando as moléculas das enzimas formarem uma monocamada sobre o eletrodo [1]. A figura 1.1 mostra o desenho esquemático das gerações dos biossensores.

Figura 1.1: *Desenho esquemático das gerações dos biossensores [1]*

A figura 1.2 mostra o esquema básico de um biossensor, onde a superfície seletiva (bioreceptor) reconhece o sinal biológico e converte em sinal mensurável, geralmente um sinal elétrico, pelo transdutor [38, 47, 59]. Podem possuir tamanhos variados, com característica principal a alta seletividade para uma determinada substância, alta sensibilidade e rápida resposta [60].

O bioreceptor é o captador do sinal biológico, e pode ser constituído por anticorpos, fragmentos de DNA, enzimas, etc, que podem ser imobilizados sobre um substrato, trazendo assim a especificidade do biossensor. O transdutor é a parte do

Figura 1.2: *Desenho esquemático de um biossensor*

biossensor que vai reconhecer o sinal biológico e transformá-lo no sinal elétrico. Logo, dependendo do tipo de sinal biológico captado deve-se utilizar um tipo de transdutor para captação do sinal. Com isso, o tipo de transdutor utilizado classifica o tipo de biossensor [61].

Os biossensores são classificados de acordo com as propriedades do sensor, e portanto podem ser classificados em quatro tipos: óticos, calorimétricos, piezoelétricos ou eletroquímicos. Dentro desses tipos existem subclasses que especificam ainda mais esses tipos de sensores. Dentre os sensores eletroquímicos, que nos é de maior interesse, ainda são classificados de acordo com o tipo de detecção, sendo os amperométricos, potenciométricos, condutométricos e os baseados em transistor de efeito de campo (FETs) [62, 61].

Os transistores de efeito de campo são largamente utilizados a base de enzimas na literatura vigente, chamados de ENFET (Enzyme-Based Field Effect Transistor). Esses dispositivos são baseados no princípio dos transdutores potenciométricos, onde basicamente as enzimas são imobilizadas sobre a camada seletiva de íons do biossensor e conectada a um transistor de efeito de campo. Essa classe de biossensores ganhou tamanha proporção atualmente que, em 1999, a IUPAC recomendou a criação de uma nova subclasse de biossensores baseados em FET [57].

Alterando-se a matriz de imobilização dos bioreceptores pode-se gerar diferentes tipos de biossensores, que reconhecerão diferentes analitos. Por exemplo, a detecção de glicose tem sido muito estudada para análise em pacientes diabéticos, onde o nível de glicose pode ser estudado tanto em vivo como em vitro [47, 58].

Pode-se, por exemplo, imobilizar a enzima glicose oxidase na superfície do filme do sensor, e com isso construir um sensor de glicose ou um sensor de pH, pois o produto final da reação da glicose com a glicose oxidase altera o pH da solução. A quantificação de uréia é de fundamental importância para o monitoramento dos rins e de desordens associadas a estes [63, 64], a mensuração de lactato ajuda no estudo da insuficiência respiratória, falhas no coração, desordens de metabolismo e no monitoramento de condições físicas de atletas [28], entre outros. Com isso, a matriz de imobilização se torna de extrema importância para a construção do biossensor de interesse, devido à alta especificidade que ela acarreta ao biossensor.

Portanto, para a construção de um biossensor, deve-se primeiro definir que tipo de detecção é requerido. A partir disso, deve-se escolher o material que melhor se encaixa nesse tipo de biossensor, apresentando a melhor sensibilidade e que possui menor interferência na possível reação que resultará no sinal medido, e que tenha alta especificidade.

Além do mais, existe a necessidade de se aperfeiçoar os métodos de imobilização de enzimas em eletrodos, de forma a se obter filmes com concentração ideal de biomoléculas e com a atividade preservada por longos períodos de tempo. Para a escolha do material, diversos estudos de caracterização devem ser realizados, e para isso existem diversas técnicas de caracterização. Dentre estas técnicas utilizadas no estudo de biossensores eletroquímicos, destacam-se a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância.

1.2.2 Dispositivos por efeito de campo

A base dos dispositivos por efeito de campo é o capacitor MOS (Metal–Oxide–Semiconductor), que é um dispositivo muito utilizado no estudo de superfícies semicondutoras [2] e consiste basicamente em uma junção metal-óxido-semicondutor como mostra a figura 1.3.

As únicas cargas que podem existir na estrutura sem polarização são as cargas do semicondutor e as cargas da superfície do metal adjacente ao isolante, sendo que estas possuem polaridades opostas às cargas do semicondutor. Ao aplicarmos uma determinada voltagem no metal podem ocorrer três possíveis configurações, como mostra a figura 1.4.

Figura 1.3: Diagrama de bandas de energia de um capacitor MOS com semicondutor do tipo p e com polarização nula ($V=0$), onde E_F é o nível de Fermi ou potencial químico tanto do semicondutor dopado como do metal, E_i é o nível de Fermi para o semicondutor intrínseco ou potencial químico do semicondutor intrínseco, E_C é a energia mínima da banda de condução do semicondutor, E_V é a energia máxima da banda de valência do semicondutor, E_g é a magnitude da região de energia proibida ou band-gap ($E_g=E_C-E_V$), $q\chi_i$ é a afinidade eletrônica do isolante, $q\chi$ é a afinidade eletrônica do semicondutor, $q\phi_m$ é a função trabalho do metal, isto é, a energia mínima necessária para retirar um elétron do metal e torná-lo um elétron livre, $q\phi_p$ é a função trabalho do semicondutor, isto é, a energia mínima necessária para retirar um elétron do semicondutor e torná-lo um elétron livre e $q\psi_{Bp}$ é a diferença de energia entre o potencial químico do semicondutor intrínseco e o do semicondutor dopado (nesse caso dopado tipo p) [2].

Figura 1.4: Diagramas de bandas de energia de um capacitor MOS com semicondutor do tipo p e com polarização, com configurações de: a) acumulação, b) depleção e c) inversão [2].

Ao aplicarmos uma voltagem negativa ($V < 0$) ao metal, os portadores majoritários do semicondutor tipo p (buracos) se acumulam à região adjacente ao óxido. Com isso, o semicondutor tipo p se assemelha a um semicondutor altamente dopado chamado de p^+ . Não há passagem de corrente na estrutura

entre o semicondutor e o metal, devido ao isolante e com isso, o nível de Fermi do semicondutor, as bandas de condução e de valência, e conseqüentemente a energia de Fermi intrínseca se deslocam, como mostrado na figura 1.4(a). Essa configuração recebe o nome de acumulação.

Ao aplicarmos uma voltagem positiva ($V > 0$) ao metal, um aumento na região de depleção do semicondutor ocorre, como mostra a figura 1.4(b). Essa configuração recebe o nome de depleção. Mas, ao aplicarmos uma voltagem muito alta no metal ($V \gg 0$), as bandas de condução e de valência, e conseqüentemente a energia de Fermi intrínseca, chegarão à configuração da figura 1.4(c), isto é, onde o nível de Fermi para o metal é tão baixo que os elétrons da banda de condução do semicondutor são atraídos para a região adjacente ao isolante, até que essa região passe a ter características de um semicondutor do tipo n , e por isso, essa configuração é chamada de inversão.

Quando aplicamos um campo elétrico perpendicular ao plano da folha na região de inversão, construímos um condutor de resistência extremamente baixa, que podemos chamar de canal tipo n [2]. Com isso, montamos uma configuração de um dispositivo que tem como princípio de funcionamento o campo elétrico aplicado à ele.

Os FETs (Field Effect Transistors – transistores de efeito de campo) têm como característica básica o controle de uma corrente por um campo elétrico aplicado. Esses transistores de efeito de campo possuem três terminais chamados *gate* (porta), *drain* (dreno) e *source* (fonte) e possuem como vantagem a sua alta impedância de entrada, não necessitando de praticamente nenhuma corrente de entrada na porta para o controle de corrente do dreno.

Como a corrente nesses dispositivos é transportada predominantemente por portadores de somente uma polaridade, eles são chamados de dispositivos unipolares. Um dos dispositivos mais importantes baseados em efeito de campo é o dispositivo semicondutor chamado MOSFET (Metal–Oxide–Semiconductor Field–Effect–Transistor – transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor).

O MOSFET é um dispositivo com quatro terminais, sendo estes a fonte (*source*), o dreno (*drain*), a porta (*gate*) e o substrato. Ele consiste de um substrato semicondutor que pode ser do tipo p ou tipo n , neste caso estamos considerando um

substrato semiconductor tipo p, e portanto, formam-se duas regiões tipo n^+ chamadas de fonte e dreno. O contato metálico no isolante é chamado de gate ou porta, como mostrado na figura 1.5.

Figura 1.5: Desenho esquemático do MOSFET tipo p.

A porta do MOSFET é isolada do corpo do transistor pelo óxido e por isso tem como característica o controle da corrente entre o dreno e a fonte devido a uma variação de um sinal de tensão na porta. As respostas típicas do MOSFET estão demonstradas na figura 1.6. A chamada VDS é a tensão aplicada entre dreno e a fonte do MOSFET, e a chamada VGS, é a tensão entre a porta e a fonte.

Figura 1.6: Respostas típicas do dispositivo MOSFET quando realizadas as medições: (a) VDS, com tensão V_{gs} fixa e (b) VGS, com tensão V_{ds} fixa.

As medições chamadas de VDS são realizadas com aplicação da tensão V_{gs} com valor fixo e variando-se os valores da tensão V_{ds} , e apresentam como resposta

a figura 1.6(a), com aumento dos valores de correntes em função do aumento de V_{gs} . As curvas apresentam dois comportamentos, sendo o primeiro na região linear seguido para a saturação, região onde mesmo aumentando-se os valores de V_{ds} o dispositivo já entrou em um modo de saturação onde os valores de correntes serão sempre os mesmos. Esses valores dependem diretamente do valor de V_{gs} aplicado.

Já as medições VGS são realizadas variando os valores de V_{gs} para um V_{ds} fixo. A curva $V_{gs} \times I_{ds}$ da figura 1.6(b) mostra a resposta típica dessa medição para diferentes valores de V_{ds} .

Um dispositivo muito utilizado atualmente são os eletrodos íons seletivos, onde basicamente a porta de metal do MOSFET é substituída por uma camada sensível a íons, e com isso o dispositivo passa a se chamar ISFET (Ion-Sensitive Field-Effect-Transistor – transistor de efeito de campo sensível a íons). Eletrodos íon seletivos são sensores eletroquímicos que permitem a determinação potenciométrica da atividade de espécies iônicas na presença de outros íons [65], e podem sofrer interferência de outros íons [66]. O uso de ISFETs sanam esse problema, deixando os sensores extremamente seletivos.

O ISFET é um dispositivo integrado composto por um eletrodo sensível a íons convencional e um MOSFET, onde a camada seletiva a íons fica diretamente em contato com a solução eletrolítica. Esse dispositivo combina a detecção de íons através da camada seletiva e a transformação do potencial sentido na superfície pela camada [38], e pela alteração do campo elétrico na interface isolante-semicondutor que ocorre devido à concentração de íons presentes na solução, modula-se então a intensidade da corrente elétrica através do MOSFET [67].

A teoria empregada para explicar a interação dessa camada quando em contato com o eletrólito é a que leva em consideração o comportamento eletrólito-isolante-semicondutor e possui como sigla EIS (Electrolyte – Insulator – Semiconductor) [66, 68, 69, 70, 71]. Essa teoria é a base do funcionamento do ISFET, onde o comportamento EIS irá contribuir com novos termos na tensão de limiar ISFET, e considera a contribuição da dupla camada formada pelos íons que se ligam nos sítios de ligação. Essa dupla camada também é conhecida como dupla camada de Gouy-Chapman-Stern [68, 69, 70, 71].

A importância do uso do ISFET pode ser atribuída a sua capacidade de

miniaturização e a possibilidade de usar processos de microfabricação [67]. No entanto, como desvantagens, o ISFET apresenta a dificuldade de encapsulamento (pois a porta que funciona como a camada seletiva do dispositivo deve entrar em contato direto com a solução sem o corpo do transistor entrar em contato), sendo este problema mais expressivo para componentes miniaturizados, além da não possibilidade da troca da camada sensível, devendo todo o dispositivo ser reconstruído.

Com isso, comumente vem sendo utilizado o EGFET (Extended-Gate Field-Effect-Transistor – transistor de efeito de campo com porta estendida), que é uma variação do ISFET, onde a camada sensível a íons agora é conectada a um MOSFET comercial por um fio, fazendo com que a porta seja estendida para fora do dispositivo. Essa configuração traz diversos benefícios em relação ao ISFET, como a não necessidade de encapsulamento, alta reutilização do dispositivo com troca somente da camada seletiva a íons, podendo assim ser transformado em diversos tipos de biossensores.

A figura 2.7.1 mostra o desenho esquemático do EGFET.

Figura 1.7: *Desenho esquemático do dispositivo EGFET.*

O eletrodo de referência e o filme a ser testado (sensor) são imersos dentro da solução de interesse e o sensor é conectado na porta do MOSFET comercial. Da mesma forma que no MOSFET, a chamada V_{ds} é a tensão aplicada entre dreno e

a fonte do MOSFET, e a chamada V_{gs} , é a tensão entre a porta e a fonte. V_{ref} é a tensão de referência, aplicada no eletrodo de referência. A corrente medida é a chamada I_{ds} , pois é a corrente entre o dreno e a fonte.

Existe uma tendência aos óxidos se ligarem a íons H^+ . Segundo a literatura [47] quando o sensor entra em contato com moléculas de água, tanto da solução quanto as do processo de limpeza, essas moléculas de água são atraídas para a superfície da amostra pelo óxido. Essas moléculas de água formam uma espécie de folha d'água eletricamente neutra e servem como sítios livres de ligação capazes de adsorver íons H^+ , formando íons hidrônios (H_3O^+), e toda essa região adjacente a superfície da amostra envolvida pela folha d'água e pelos íons adsorvidos nessa folha formarão uma camada chamada de dupla camada [67, 68, 69, 70, 71].

De uma forma mais simples, as cargas positivas se deslocam para perto do filme criando uma barreira de cargas positivas entre o filme e a solução, fazendo com que no interior da solução exista um excesso de cargas negativas, como mostrado na figura 1.8. Como ocorre essa separação de cargas existirá então uma diferença de potencial entre a superfície do filme e o interior da solução, chamada de ΔV .

Figura 1.8: Comportamento iônico entre a superfície do sensor e os íons da solução.

Quando aplicada uma diferença de potencial à solução pelo eletrodo de referência com relação à fonte, obtemos o chamado V_{ref} . Portanto, o valor “lido” da diferença de potencial da amostra em relação a fonte (V_{gs}) será o valor do V_{ref} acrescido do valor ΔV ($V_{gs} = V_{ref} + \Delta V$). Portanto, quanto maior a oferta de íons H^+ , maior será ΔV e a corrente medida terá uma maior amplitude, como verificado

nas figuras 1.9(a) e (b).

Figura 1.9: Respostas típicas das medições: a) VDS, b) VGS e c) corrente ao longo do tempo, para filmes de óxidos no EGFET em função dos diferentes valores de pHs.

As figuras 1.9(a) e (b) mostram a resposta do EGFET em relação ao sistema de medições utilizado e a dependência que existe em função do pH utilizado. A figura 1.9(a) é a resposta típica quando da medição VDS, onde o valor de V_{gs} é mantido constante e varia-se os valores de V_{ds} , e a figura 1.9(b) é a resposta típica da medição VGS, onde fixa-se o valor de V_{ds} e varia-se os valores de V_{gs} . A figura 1.9(c) mostra a resposta no “tempo”, quando V_{ds} e V_{gs} são mantidos com valores fixos e a corrente é mensurada. Quanto maior a concentração de íons H^+ na solução maior será a resposta em corrente do sensor.

1.2.3 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é feita com três eletrodos inseridos na solução e conectados a um potenciostato, como mostra a figura 1.10 [3]. Os eletrodos utilizados são o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o contra eletrodo. O eletrodo de trabalho é o eletrodo onde ocorrerão as reações envolvendo o analito. O eletrodo de referência é utilizado para que o potencial aplicado no eletrodo de trabalho seja mantido com valor conhecido. O contra-eletrodo, ou eletrodo auxiliar, é utilizado para completar o circuito eletroquímico, permitindo o fluxo de corrente entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Quando aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, a resistência do eletrodo de referência vai aumentar e diminuir no contra-eletrodo, permitindo assim que a corrente passe entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo e evitando que ocorram perturbações no eletrodo de referência [72].

Figura 1.10: Desenho esquemático do potenciostato com a célula analítica com três eletrodos (referência, trabalho e contra eletrodo) para medição da voltametria cíclica [3].

A técnica de voltametria cíclica se baseia no controle da variável potencial elétrico em um sistema eletroquímico (como célula eletroquímica, eletrodos e potenciostato). O potencial elétrico variável ciclicamente no tempo é aplicado ao eletrodo de trabalho, enquanto se monitora a resposta em corrente. Com isso, o potencial é aplicado a partir de um determinado valor inicial (E_i), crescendo linearmente até atingir um valor máximo (E_1). Ao alcançar E_1 , o potencial é revertido, decrescendo até um determinado valor final (E_2). Com isso, o produto da reação redox que ocorreu na primeira etapa de varredura (E_i até E_1), pode ser

avaliado novamente na varredura reversa (E_1 até E_2).

Esse ciclo se repete diversas vezes, sendo denominado então como voltamograma cíclico, como pode ser visto na figura 1.11. A resposta da corrente no eletrodo de trabalho ocorre em função do potencial aplicado em cada ciclo [4].

Figura 1.11: Voltamograma cíclico, onde I_{pa} corresponde ao valor de corrente para o pico anódico e I_{pc} para o pico catódico. E_i é o potencial inicial, E_1 o potencial máximo e E_2 o potencial final. As setas tracejadas indicam o sentido da aplicação do potencial [4]

O potencial redox (E°) está centrado entre os potenciais do pico anódico (E_{pa} – valor de potencial onde ocorre I_{pa} , também pode ser citado como E_{ox}) e catódico (E_{pc} – valor de potencial onde ocorre I_{pc} , ou E_{red}), como mostra a equação 1.1.

$$E^\circ = \frac{(E_{pa} + E_{pc})}{2} \quad (1.1)$$

O número de elétrons transferidos (n) durante a reação redox na superfície do eletrodo de trabalho pode ser determinado pela separação dos potenciais de pico anódico e catódico, como mostra a equação 1.2.

$$\Delta E = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0,059}{n} \quad (1.2)$$

Como consequência, o potencial redox E° não depende da velocidade de varredura nem da concentração das espécies eletroativas da solução [5].

A intensidade de corrente depende de duas contribuições predominantes, sendo uma devida à reação de transferência eletrônica na superfície do eletrodo de trabalho e a outra em função do transporte da espécie eletroativa para a superfície. Além do mais, dois tipos de correntes podem ocorrer durante a medição na voltametria. A primeira, denominada corrente faradaica, ocorre devido à

transferência de cargas heterogêneas na interface eletrodo de trabalho/solução. A segunda, denominada como corrente capacitava, é diferente da faradáica e ocorre em função da separação de cargas na dupla camada entre interface eletrodo de trabalho/solução, não ocorrendo transferência eletrônica [5].

As correntes de pico são descritas pela equação de Randles-Sevick (equação 1.3), onde i_p é a corrente de pico (Ampéres - A), n é o número de elétrons transferidos, A é a área do eletrodo de trabalho (cm^2), D é o coeficiente de difusão da espécie (cm^2s^{-1}), C é a concentração da espécie (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura do potencial durante a medição (V s^{-1}) [73].

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad (1.3)$$

Com isso, a corrente de pico é diretamente proporcional à raiz da velocidade de varredura do potencial, visto que os outros parâmetros podem ser fixados. Com isso, pode-se estimar o número de elétrons envolvidos durante o processo de medição [74].

Algumas situações podem ocorrer durante o processo de medição devido à transferências das cargas e aos processos de redução e oxidação. O primeiro caso, chamado de processo reversível, ocorre quando a velocidade de transferência das cargas heterogêneas é tão elevada que consegue-se estabelecer um equilíbrio dinâmico na superfície do eletrodo de trabalho. Neste caso os potenciais de picos possuem valores constantes, e $i_p \propto v^{\frac{1}{2}}$. A razão entre as correntes de picos anódico e catódico é igual a 1 [5].

O segundo caso, chamado de processo irreversível, ocorre pela transferência eletrônica lenta entre as espécies redox da solução e o eletrodo de trabalho. Com isso, a reação na superfície do eletrodo de trabalho é controlada pela velocidade de transferência da carga heterogênea. Neste caso, só ocorre corrente de pico anódica ou catódica, sendo que a equação de Nernst não é válida, mas $i_p \propto v^{\frac{1}{2}}$ também é válido para este caso.

Quando os pares redox apresentam uma separação entre os potenciais de picos anódicos e catódicos, que são diretamente proporcionais à velocidade de varredura do potencial, é denominado de processo quase-reversível. Neste caso tanto, o processo de transferência de carga heterogênea e o transporte de massa

determinam a corrente, satisfazendo a equação de Nernst de forma parcial.

Os voltamogramas em função de cada processo estão demonstrados na figura 1.12.

Figura 1.12: Voltamogramas cíclicos típicos para os processos (a) reversível, (b) quase-reversível e (c) irreversível [5]

O estudo por um voltamograma cíclico mostra o sinal eletroquímico do qual podem ser extraídas diversas informações, tais como: reprodutibilidade, estabilidade do filme, reversibilidade da reação, concentração do analito de interesse, análise qualitativa para determinação da espécie em estudo, entre outros, que são estudos importantes no funcionamento de um biossensor.

Podem-se aplicar diferentes velocidades de varredura e com isso obter a raiz quadrada da velocidade de varredura e, portanto, verificar o aumento da intensidade dos picos, obtendo-se assim o sinal em função da concentração do filme estudado. Com isso, pode-se avaliar o comportamento da reação, isto é, se a reação é reversível, quase reversível ou irreversível e, portanto, estudar a repetitividade do biossensor, assim como a sua estabilidade. A voltametria cíclica é uma ferramenta muito favorável para estudos exploratórios, desde que a espécie sofra processos de oxirredução.

O voltamograma cíclico é um resultado de alta necessidade para a caracterização dos materiais estudados, pois das respostas obtidas por um

voltamograma cíclico podemos detectar a estabilidade do filme, o poder de reprodutibilidade, além de uma análise altamente qualitativa, onde é possível determinar a concentração do analito em função da corrente obtida, sendo uma técnica de caracterização de grande interesse para desenvolvimento de biossensores mais seletivos e com melhor sensibilidade.

1.2.4 Sensores de íons

O modelo de sítio de ligação (site-binding model) descreve o mecanismo responsável pelo aparecimento do potencial de superfície do filme devido à variação do pH da solução. A descrição desse modelo é baseada no equilíbrio entre os sítios da superfície e os íons H^+ presentes na solução [71].

A superfície de qualquer óxido metálico sempre contém grupos hidroxilas. Esses grupos podem doar ou aceitar prótons da solução, deixando a superfície negativamente ou positivamente carregada. A figura 1.13 mostra um desenho esquemático dessa interface óxido/eletrólito.

Figura 1.13: Representação esquemática do site-binding model, onde o óxido está representado por grupos de $SiOH$ [6]

Com isso, o sítio originalmente neutro pode se associar a um próton da solução e tornar-se um sítio positivo, ou então ceder um próton a solução e tornar-se um sítio negativo. Logo, são chamados de sítios anfóteros [6]. O comportamento

ácido ou básico do sítio neutro (A-OH) é caracterizado pelas constantes de equilíbrio K_a e K_b respectivamente, como mostram as equações 1.4 e 1.5.

$$K_a = \frac{[AOH][H]_s^+}{[AOH_2^+]} \quad (1.4)$$

$$K_b = \frac{[AO^-][H^+]_s}{[AOH]} \quad (1.5)$$

Onde AOH_2^+ representa os sítios positivos da superfície e AO^- os sítios negativos. H_s^+ representa os íons H^+ da solução.

Os valores de K são chamados de valores intrínsecos pois são válidos somente no equilíbrio químico na interface óxido-eletrólito.

O potencial que modula a corrente do dreno (ψ_0) em função da variação do pH pode ser descrito como a diferença entre o potencial da superfície (ψ_S) e o potencial da solução (ψ_B).

$$\psi_0 = \psi_S - \psi_B \quad (1.6)$$

Uma densidade superficial de carga σ_0 (C/m²) pode ocorrer em dependência do equilíbrio químico dos sítios das superfícies, e é dada pela equação 1.7.

$$\sigma_0 = q([AOH_2^+] - [AO^-]) = -qB \quad (1.7)$$

“q” é a carga elementar e o termo “B” representa a diferença entre o número de grupos carregados negativamente e o número de grupos carregados positivamente em mol por unidade de área. Já na superfície óxida, o número total de sítios por unidade de área, que serão o número total de sítios de ligação com os íons desejados, é um número fixo e é dado pela equação 1.8.

$$N_s = [AOH] + [AOH_2^+] + [AO^-] \quad (1.8)$$

A resposta do sensor depende de N_s , pois quanto maior seu valor, maior a sensibilidade do pH e mais linear a resposta [32, 75, 76].

O efeito das pequenas alterações na atividade do próton da superfície na densidade de carga superficial pode ser calculado a partir da equação 1.7 e é expresso

pela equação 1.9.

$$\frac{\partial \sigma_0}{\partial pH_S} = -q \frac{\partial B}{\partial pH_S} = -q\beta_{int} \quad (1.9)$$

Onde uma alteração na atividade do próton da superfície é expressa pela correlação com os pHs, e a alteração da densidade de carga superficial resultando na alteração de B para os grupos básicos. Por definição [6], $\frac{\partial B}{\partial pH_S}$ representa a capacidade β_{int} de acumular informações de cargas na superfície do óxido. A mudança na alteração da atividade da carga é expressa em seu pH correspondente e então, a mudança resultante em σ_0 é expressa no número de grupos β_{int} . Esse caso é chamado de intrínseco, pois sob condições normais possui a capacidade de perceber pequenas alterações na superfície, e não no bulk da solução.

A carga superficial (σ_0) está balanceada por uma carga equivalente oposta no eletrólito (σ_{dl}) devido a neutralidade de cargas. Essa densidade se encontra na dupla camada. Essas densidades de cargas paralelas formam a capacitância de dupla camada C_{dl} . A diferença de potencial sobre essa capacitância é igual à diferença entre o potencial da superfície do óxido e da solução e a relação entre essas densidades de carga é dada pela equação 1.10.

$$\sigma_{dl} = -\sigma_0 = -\psi_0 C_{dl} \quad (1.10)$$

O subíndice dl provém da dupla camada (double layer).

Essa capacitância pode ser calculada pelo modelo de Gouy-Chapman-Stern. Neste modelo, a capacitância consiste em uma rede de uma série de capacitâncias da camada de Helmholtz (capacitância de Stern) e da capacitância da camada difusa. O modelo da camada de Helmholtz define que os íons da solução possuem um tamanho finito e que seus centros não podem se aproximar da superfície mais do que o seu raio iônico incluindo uma possível camada de água. A camada difusa começa a partir dessa distância e contém a mesma quantidade de cargas, mas com sinais opostos às cargas da superfície do óxido.

A primeira camada, chamada de plano de Helmholtz, possui duas composições. A primeira é pelos íons que se ligam na superfície do filme. Essa camada possui uma quantidade limitada de íons que perdem a mobilidade ao se ligarem à superfície, onde essa quantidade é determinada pelo número de sítios de

ligação presentes na superfície. Como esta é a primeira camada que se forma, ela é chamada de IHP (Inner Helmholtz Plane - camada de Helmholtz interna). A segunda composição do plano de Helmholtz é formado pela OHP (Outer Helmholtz Plane - camada externa de Helmholtz) e é formada pelos íons que se aproximam da superfície por interação química (íons de diferentes polarizações que se atraem). Nessa camada a interação entre esses íons da solução e os íons da superfície do filme ainda é muito forte, e por isso os íons do plano de Helmholtz não possuem mobilidade. Essa teoria de Helmholtz foi chamada de dupla camada ou double layer [74, 77].

O plano de Helmholtz funciona basicamente como um capacitor. Na próxima camada, chamada de camada difusa, os íons se distribuem em função da distância da superfície do filme, diminuindo a densidade de íons com o aumento da distância. O potencial elétrico decresce exponencialmente da superfície do filme até o bulk da solução. Esse modelo é chamado de Gouy-Chapman.

A junção dos modelos de Helmholtz e Gouy-Chapman foi feito por Otto Stern que ainda adicionou que a camada difusa possui um limite de formação, chamada então de Gouy-Chapman-Stern e é o modelo vigente.

A figura 1.14 mostra como o potencial é alterado em função da distância.

Figura 1.14: Desenho esquemático do modelo de Gouy-Chapman-Stern [7].

A capacitância diferencial da dupla camada, que é a capacidade da dupla camada armazenar carga em resposta a uma pequena carga de superfície, é dada

pela equação 1.11.

$$C_{dif} = -\frac{\partial \sigma_{dl}}{\partial \psi_0} = \frac{\partial \sigma_0}{\partial \psi_0} \quad (1.11)$$

Combinando a equação 1.9, onde aparece a densidade superficial de cargas, com a equação 1.11, e adicionando a relação de Boltzmann para atividade iônica, obtêm-se a atividade do próton na superfície e a diferença entre o valor do pH na superfície e na solução, formando a expressão geral para a sensibilidade ao pH para o ISFET, como mostra a equação 1.12, onde pH_B é o pH da solução.

$$\frac{\partial \psi_0}{\partial pH_B} = -2,3 \frac{KT}{q} \alpha \quad (1.12)$$

O parâmetro α representa a sensibilidade que varia entre 0 e 1, dependendo da capacidade de acumular informações de cargas na superfície β_{int} do óxido e da capacidade diferencial da dupla camada (C_{dl}). Se $\alpha = 1$, o ISFET apresenta sensibilidade Nernstiana de 59,1 mV/pH.

1.2.5 Ureia e Glicose

Quando o material biológico ligado à superfície de um bioreceptor é uma enzima, os sensores são denominados biossensores enzimáticos. Basicamente, fazem uso da atividade enzimática como sinal analítico a ser monitorado [78]. Como vantagens podemos destacar a sensibilidade, respostas rápidas e baixo custo, alta especificidade, detecção de baixas concentrações do analito além do alto número de enzimas disponíveis comercialmente [79]. Atualmente, a construção de transdutores eletroquímicos somada aos diversos métodos analíticos descritos na literatura fortaleceu a área de biossensores para serem aplicados na área médica, farmacológica, industrial, entre outras [79]. A imobilização de enzimas é poderosa ferramenta para melhorar quase todas as propriedades enzimáticas, como a alta atividade e seletividade [80].

Para construção dos biossensores enzimáticos, a técnica mais utilizada é a de imobilização das enzimas, sendo classificadas como imobilização por adsorção, encapsulamento, ligação covalente e crosslinking (ou ligação covalente cruzada), como mostra a figura 1.15.

Figura 1.15: *Desenho esquemático dos tipos de imobilizações enzimáticas, sendo: a) adsorção, b) encapsulamento, c) ligação covalente e d) ligação covalente cruzada [8]*

Na imobilização por adsorção (figura 1.15(a)), dois tipos podem ocorrer, sendo a adsorção física e a adsorção iônica. Na adsorção física, a enzima fica retida na superfície do suporte por interações físicas (Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas) entre a enzima e a superfície da matriz [80]. Este é o modo mais simples e rápido de imobilização e possui como vantagem pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima. No entanto, a dessorção da enzima durante sua utilização é facilitada devido à falta de controle das forças de ligação envolvidas resultantes da variação de temperatura, pH e força iônica [79, 80]. Já a adsorção iônica, a adsorção entre a enzima e a superfície do suporte ocorre devido as atrações eletrostáticas entre as cargas opostas de ambos.

Na imobilização por encapsulamento (figura 1.15(b)), a enzima é confinada na membrana localizada na superfície do eletrodo. A membrana apresenta porosidade controlada, que retém a enzima de forma a permitir a livre difusão do substrato e dos produtos da reação através da mesma. No entanto, não há o controle de transferência de massa do substrato e pode ocorrer crescimento de microorganismos na superfície da membrana [79].

A imobilização por ligação covalente (figura 1.15(c)) retém a enzima na superfície do suporte por ligações covalentes entre os grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos das enzimas e os grupos funcionais presentes na superfície do suporte. Por essa ligação ser mais forte, essa técnica tem sido comumente muito utilizada. Como principais vantagens dessa técnica, podemos citar a não dessorção das enzimas, diminuição da velocidade de desativação espontânea e aumento do tempo de vida útil do sensor. No entanto, essa técnica de imobilização também possui desvantagens, como perda de parte da atividade enzimática por conta das

alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima (facilidade em alterar a estrutura terciária nativa da enzima) [79, 80].

Por fim, a ligação por crosslinking (figura 1.15(d)) é uma extensão da ligação covalente, e é formada por uma rede rígida, devido ao sistema reticulado das moléculas da enzimas. Com isso, as ligações são mais sólidas, no entanto, podem induzir a formação de barreiras de difusão, tendo como consequência um aumento no tempo de resposta do biossensor [79]. Neste tipo de imobilização os grupos funcionais do suporte são ativados por reagentes específicos, como o glutaraldeído, que introduz um grupo carbonila tornando possível reações com os grupos nucleofílicos da enzima [80]

Portanto, o processo de imobilização pode influenciar ou até modificar as respostas dos biossensores, pois cada metodologia apresenta suas vantagens e suas desvantagens. A técnica que será empregada deve ser cuidadosamente estudada e otimizada para resultar na construção de biossensores com sinal expressivo do processo analítico, reprodutibilidade e repetibilidade adequadas [79].

Uma enzima muito estudada para construção de biossensor é a urease, pois possui como principal vantagem a fácil imobilização. A urease foi a primeira metaloenzima a ser isolada na forma cristalina. Ela atua como um excelente catalisador da hidrólise da ureia, com alta eficiência. Mesmo sendo extraída de diferentes fontes, como leguminosas, fungos ou bactérias, possui uma estrutura comum e ativa que atua sobre o mesmo mecanismo de catálise durante a hidrólise da ureia, com diferenciação somente de uma a três cadeias de peptídeos [9]. As ureases de plantas e de fungos são trímeros ou hexâmeros com subunidade em torno 90 kDa e com cerca de 840 aminoácidos, enquanto que as ureases bacterianas são multímeros de duas ou três subunidades correspondente a fragmentos da cadeia única de ureases vegetais e fúngicas [81].

As ureases apresentam um enovelamento típico das amidohidrolases, com sítio ativo com dois átomos de níquel, seguido por um conjunto de fitas β , ambos formando a subunidade α (ou domínio α , no caso de ureases de plantas e fungos). A subunidade β apresenta predominantemente estruturas em folhas β , enquanto a subunidade γ é formada por estruturas $\alpha\beta$ [81]. Os íons de níquel ativo são essenciais para a catálise. A figura 1.16 mostra a molécula de urease.

Figura 1.16: Molécula de urease [9]

A molécula de urease é composta por histidinas e dois átomos de níquel. A especificidade da enzima é relacionada à forma do seu centro ativo, onde na urease contém duas moléculas de água e é coordenada a um grupo OH^- . A figura 1.16 mostra que o primeiro centro metálico de níquel é coordenado por dois átomos de nitrogênio histidínicos e um átomo de oxigênio proveniente do aminoácido lisina. Já o segundo centro metálico de níquel é composto por dois átomos de nitrogênio histidínicos e três átomos de oxigênio provenientes dos aminoácidos lisina e aspartato e da molécula de água. Durante a catálise, a ureia ocupa a posição antes ocupada por uma molécula de água.

A figura 1.17 mostra um dos mecanismos propostos para a catálise da ureia pela urease pela eliminação de duas moléculas de água, seguido da polarização do grupo carbonila da ureia pelo átomo de níquel (Ni_1), ativando assim um carbono para um ataque nucleofílico [9].

O segundo átomo de níquel (Ni_2) se liga a um grupo OH^- devido ao carbono parcialmente positivo da carbonila da molécula de ureia. O grupo amina da ureia (NH_2) é protonado pela histidina e eliminado formando assim o ácido carbâmico, formando então amônia (NH_3) e gás carbônico (CO_2) [9].

Os valores normais de ureia no sangue humano de um adulto ocorrem em torno de 10 a 40 mg/dL, e na urina em torno de 9 a 24 mg/dL. Valores acima significam falha renal, desidratação severa, falha do coração, dieta com altos níveis de proteína, doença de fígado, entre outras [25]. Entre 180 a 400 mg/dL de ureia no sangue o paciente necessita urgente de hemodiálise.

Pensando em rápida detecção, é de grande interesse a construção de biossensores de ureia para uso médico.

Figura 1.17: Mecanismo de catálise da ureia pela enzima urease [9]

A glicose oxidase é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em gluconolactona e peróxido de hidrogênio. Essa enzima apresenta boa estabilidade, alto grau de pureza e preço acessível, além de alta seletividade ao substrato β -D-glicose [1]. Faz parte da classe das oxiredutases, que são enzimas que catalisam reações por troca de cargas ou de oxirredução pela utilização do oxigênio molecular como aceitador de elétrons, gerando assim o peróxido de hidrogênio [8].

Durante o processo de oxidação da glicose, o cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) é reduzido a FADH_2 , seguida pela oxidação do cofator enzimático pelo oxigênio molecular formando então o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como mostra a figura 1.18. Os FADs são cofatores hidrossolúveis que sofrem oxidações e reduções reversíveis em reações de transferência de elétrons no metabolismo [1].

Essa enzima é uma enzima globular dimérica com forma nativa contendo duas moléculas do cofator FAD que são responsáveis pelas propriedades redox da enzima.

A glicose oxidase além de apresentar muitas vantagens industriais, tem sido amplamente utilizadas para confecção de biossensores devido a sua alta

Figura 1.18: Mecanismo de catálise da glicose pela enzima *glucose oxidase*.

especificidade e alta estabilidade [8].

Para seres humanos saudáveis os níveis de glicose no sangue devem estar entre 82 a 110 mg/dL, chegando até 140 mg/dL após a refeição [82]. Abaixo de 70 mg/dL é considerado hipoglicemia, quando o sangue está com taxa de açúcar abaixo dos valores saudáveis, enquanto que, no indivíduo em jejum, valores acima de 126 mg/dL já são considerados como acima do limite saudável e o indivíduo é considerado como diabético [83]. Existe hoje no mercado biossensores de glicose, no entanto o uso continuado necessário para o diabético acaba por sair por um alto custo, sendo então o desenvolvimento de biossensores de glicose necessário com custos mais acessíveis.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivos Gerais

Baseado em trabalhos anteriores onde foram obtidos resultados de interesse, este trabalho apresenta a produção e caracterização de filmes finos de AZO e TiO₂ para a construção de sensores de pH, visando a otimização na produção dos materiais propostos. Os filmes finos foram depositados por técnicas como dip-coating, spin-coating, spray-pyrolysis e casting, em substratos de vidro, FTO e ITO. A partir deste ponto, a palavra substrato será utilizada pela definição utilizada na área de materiais, e não mais pela definição química, usada até então. Na definição química, os substratos são as moléculas nas quais as enzimas irão interagir especificamente. Já na definição da área de materiais, substrato é o material no qual os filmes serão depositados sobre suas superfícies. Essa deposição pode ocorrer por

adsorção física, por interações entre as moléculas do substrato com as moléculas do filme depositado, sendo assim uma interação química, entre outros.

1.3.2 Objetivos Específicos

A funcionalização dos filmes com enzimas torna possível a construção de biossensores. Assim, as enzimas urease e glicose oxidase foram funcionalizadas na superfície dos filmes, para construção de biossensores de ureia e de glicose, respectivamente. Os filmes devem ser testados em diferentes concentrações de ureia e glicose, e testados com dispositivo EGFET e por voltametria cíclica.

Figura 1.19: *Resumo esquemático deste trabalho.*

Este trabalho tem como interesse a produção de sensores de pH, de ureia e de glicose, para serem utilizados na área médica. A figura 1.19 mostra resumidamente o desenho esquemático deste trabalho.

Com isso, o capítulo 1 mostra uma abrangente introdução sobre o tema, com detalhamento das técnicas utilizadas e do funcionamento químico dos íons de interesse, seguido do capítulo 2 com apresentação dos materiais e dos métodos utilizados. O capítulo 3 mostra toda a sequência de produção para os filmes finos de AZO, com as caracterizações morfológicas dos filmes considerados como melhores sensores de pH e dos substratos utilizados para comparação. No capítulo 4 toda a parte de funcionalização dos substratos e dos filmes de AZO foram demonstradas. Os capítulos 5 e 6 apresentam a mesma estrutura dos capítulos 3 e 4, mas para os filmes de TiO_2 , seguidos por fim, do capítulo 7 que abrange as conclusões gerais de

todo o trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

NESTE capítulo serão descritos todos os procedimentos utilizados para preparação e caracterização dos filmes.

2.1 Tratamento dos substratos

Como substratos foram utilizadas lâminas para microscópio (Precision), óxido de estanho dopado com flúor (FTO - $8\Omega/\text{sqr}$, Sigma-Aldrich) e óxido de estanho dopado com índio (ITO, $8\text{-}12\Omega/\text{sqr}$, Sigma-Aldrich), ambos os óxidos depositados sobre lâminas de microscópio.

Os substratos foram cortados em tamanhos iguais ($10\times 10\text{ mm}^2$). Antes da utilização dos substratos, os mesmos foram previamente lavados por 30 minutos no ultrassom (Limp Sonic), sendo 10 minutos em água deionizada (Milli-DI - Millipore), 10 minutos em etanol 95% (Fmaia) e 10 minutos em acetona P.A (Cinética). Após, eram secos à temperatura ambiente [84].

Além do mais, em alguns casos, os substratos de vidro também passaram por um processo de hidrofilição da superfície. O processo de hidrofilição foi feito imergindo os substratos em uma solução 5 H_2O : 1 NaOH (29% m/m): 1 H_2O_2 (30 %m/m) por 30 minutos à 75°C (hidróxido de sódio P.A - Panreac; peróxido de hidrogênio P.A - Synth). Por último, os substratos foram secos na estufa (Marconi MA 033) por 5 minutos à 100°C [85].

2.2 Rotas utilizadas para deposição dos filmes finos

- AZO

Para produção dos filmes de AZO, uma solução etanólica (etanol absoluto – Carloerba) com 0,44 mol/L de acetato de zinco dihidratado P.A (Cinética) foi produzida e adicionada diferentes porcentagens de dopagem de alumínio (3%, 7%, 8% ou 10%) pela adição de nitrato de alumínio nanohidratado P.A A.C.S (Dinâmica). A solução foi colocada sob agitação e refluxo por 3 horas à 75 °C. Durante essas três horas, 1400 μ L de ácido l-láctico P.A A.C.S (Synth) fracionado em quatro porções foram adicionados à esta solução, em intervalos iguais de 45 minutos [85].

- TiO_2

Já para a produção dos filmes de TiO_2 , 5 mg de oxyacetilacetato de titânio (IV) (Sigma-Aldrich) foi diluído em 5 mL de etanol absoluto e 0,55 mL de Náfon[®] 117 (Sigma-Aldrich). Essa solução foi colocada no ultrassom por 20 minutos. Após, 1 mL dessa solução foi misturada em 0,5 mL de etanol absoluto e 0,25 mL de Náfon[®] resultando em uma solução final 0,1 mol/L e 1% de Náfon[®] [86].

Para se chegar nas rotas finais para ambos os óxidos, diversas outras rotas foram testadas. Os detalhes estão descritos no apêndice A.

2.3 Métodos de deposição

Os métodos de deposição utilizados durante todo o trabalho foram dip-coat, spin-coat, spray-pyrolysis e casting.

O método de deposição por dip-coat consiste em imergir o substrato dentro da solução precursora. A retirada do substrato é feita de forma mecânica, com uma velocidade de retirada fixa, como demonstrado na figura 2.1 [10]. Durante a retirada do substrato, o solvente tende a evaporar. Esse processo é repetido até que se atinja a quantidade de camadas requeridas [87].

No processo de deposição por spin-coating, goteja-se uma quantidade da solução precursora no substrato (figura 2.2(a)). A base com o substrato fixado rotaciona com velocidades e frequências controladas (figura 2.2(b)), forçando o espalhamento da solução por toda a superfície do substrato e consequente evaporação do solvente (figura 2.2(c)). A evaporação dos solventes mais voláteis no momento

Figura 2.1: Processo de deposição pelo método de dip-coat [10].

da deposição permite acelerar os processos de hidrólise e condensação iniciados com o contato com a umidade do ar ambiente [87]. Com isso, a solução é depositada de forma homogênea sobre a superfície do substrato, formando um filme fino (figura 2.2(d)).

Figura 2.2: Processo de deposição pelo método de spin-coat, (a) gotejamento da solução no substrato, (b) rotação da base com substrato, (c) evaporação do solvente e (d) formação do filme fino.

Spray-pyrolysis é uma técnica mais barata baseada na CVD (chemical vapour deposition – deposição química por vapor), onde a solução precursora é levada a um substrato aquecido impulsionada pelo spray [88]. Essa técnica consiste no estabelecimento de vácuo dentro de uma câmara para a retirada do ar atmosférico, evitando adsorção de impurezas na superfície do substrato, com posterior aquecimento da base, como mostra a figura 2.3 [11]. A alta temperatura do substrato é fundamental para que ocorra a ruptura da estrutura molecular original do material precursor presente na solução, em um determinado composto pela ação do calor no ambiente com pouco ou nenhum oxigênio [89]. Para isso, após a temperatura estabilizada, passa-se um fluxo contínuo de gás inerte, sendo neste

caso o nitrogênio (N_2). Após, a solução de interesse é borrifada através de um spray fixado a uma distância fixa da base, formando uma superfície homogênea da solução nos substratos.

Figura 2.3: Processo de deposição pelo método de *spray-pyrolysis* [11].

Por fim, a técnica de casting é a mais simples (conhecida também como drop casting), onde consiste somente no gotejamento da solução por toda a superfície do substrato, com posterior evaporação do solvente, como mostra a figura 2.4.

Figura 2.4: Processo de deposição pelo método de *casting*.

2.3.1 Parâmetros utilizados na deposição dos filmes de AZO

Os parâmetros básicos de cada técnica utilizada para deposição dos filmes de AZO estão descritos abaixo. No entanto, o número de camadas, pré- e pós-aquecimentos e tempo de secagem entre cada camada variou para cada rota,

descritos no apêndice A. Quando houveram alterações nos parâmetros estas foram descritas no decorrer do texto.

- Dip-coat (Construmaq) - Os filmes foram depositados utilizando equipamento dip-coat Construmaq cuja velocidade de retirada do substrato foi de 1 cm/min.
- Spin-coat (Produzido no próprio laboratório) - Os parâmetros utilizados no spin-coat foram tempos de “subida” e “descida” (tempo em que o equipamento leva do repouso até sua rotação máxima e da rotação máxima ao repouso) de 8,3 segundos cada, e frequência de 3200 rpm durante 28 segundos.
- Spray-Pyrolysis (Produzido no próprio laboratório) - Os substratos foram mantidos à 360 °C durante a deposição e a uma distância fixa de 18 cm do spray. O fluxo de nitrogênio foi mantido em 1 L/min e a média de solução depositada foi de 10 mL.

Os filmes de AZO depositados por todas as técnicas acima tiveram pós-tratamento a 450 °C por 1 hora no forno (Lindberg/Blue M).

2.3.2 Parâmetros utilizados na deposição dos filmes de TiO₂

- Dip-coat - A velocidade de retirada do substrato foi de 1 cm/min.
- Spin-coat - Tempos de “subida” e “descida” de 17 segundos cada, e frequência de 3000 rpm durante 34 segundos.
- Casting - 100 µL foram gotejados por camada sobre a superfície dos filmes.

Após a deposição, os filmes de TiO₂ foram ao forno por uma hora a 200 °C.

Os contatos elétricos de todos os filmes foram feitos utilizando cola condutora à base de partículas de prata (MG Chemicals) e um fio de cobre. Os contatos elétricos foram isolados com adesivo epóxi (Brascola) para evitar que entrassem em contato com as soluções.

2.4 Soluções

2.4.1 pH

As soluções tampão com diferentes valores de pHs foram feitas utilizando fosfato de sódio bibásico anidro P.A (Cinética) e ácido cítrico anidro P.A (Cinética), segundo proporções de solução tampão de McIlvaine [90]. As soluções tampões fosfato/citrato a 0,1 mol/L com 0,1 mol/L de cloreto de sódio P.A-ACS (NaCl - Synth) foram feitas utilizando a faixa alcançada pelos reagentes, sendo do pH 02 até o pH 08, com determinação dos pHs com utilização do medidor de pH de bancada (Metrohm - modelo 827) com eletrodo primatrode (Metrohm). Para outros valores de pHs os sais deveriam ser trocados, e para evitar novos interferentes optou-se por manter somente essa faixa de pH [90, p. 300]. Essas soluções foram utilizadas nas medições de voltametria cíclica e com o dispositivo EGFET.

2.4.2 Uréia

As soluções de uréia foram feitas utilizando diferentes concentrações de uréia P.A-ACS (Vetec) diluída em solução tampão fosfato (PBS) 10 $\mu\text{mol/L}$ - pH 06, feitos a partir de fosfato de sódio monobásico anidro P.A (Cinética) e fosfato de sódio bibásico e 0,1 mol/L de NaCl. As concentrações variaram entre 5 mg/dL e 200 mg/dL.

2.4.3 Glicose

As soluções de glicose foram feitas utilizando a mesma faixa de concentração da uréia, pela adição de D-glicose anidra (Dextrose) P.A-ACS (Synth) em solução tampão fosfato (PBS) 10 μM - pH 06 com 0,1 mol/L de NaCl.

2.5 Imobilização de proteínas

O processo de imobilização das proteínas nas superfícies dos filmes foi feito adicionando duas porções de 100 μL de glutaraldeído P.S 2,5% (Vetec) com intervalo de 1,5 h entre elas, e após mais 1,5 h 100 μL de solução tampão PBS 5 mmol/L (pH 06) com 10 mg de urease (urease de *Canavalia ensiformis* - Jack bean, 100 KU –

31660 unidades/G sólido – Sigma-Aldrich) foi gotejada na superfície como mostra a figura 2.5 [91, 92]. Deixava-se as amostras em temperatura ambiente por 12 horas.

Figura 2.5: Processo de imobilização de proteínas.

Antes da utilização, as amostras foram lavadas na mesma solução tampão utilizada para imobilização sob vigorosa agitação por 40 minutos. Antes de cada medição, as amostras descansavam em solução tampão PBS 10 mmol/L (pH 06) por 10 minutos [91, 92, 93].

O mesmo procedimento foi adotado para imobilização da glicose oxidase (glicose oxidase de *Aspergillus niger*, tipo X-S pó liofilizada, 50 KU – 100.000-250.000 unidades/G sólido, sem adição de oxigênio – Sigma-Aldrich), mas com 6 mg de glicose oxidase em 100 µL de solução tampão PBS 5 mM [7, 94, 95].

O glutaraldeído é um componente muito importante no processo de imobilização de enzimas devido à ligação tipo crosslink (ligação covalente cruzada) com os grupos amina das enzimas, formando ligações covalentes com os grupos aminas residuais livres presentes nas enzimas, como mostra a figura 2.6 [12], mantendo as propriedades conformacionais das enzimas [96]. Essa ligação é muito estável no ponto de vista mecânico [12].

2.6 Nomenclatura dos filmes

Os filmes foram depositados sobre diferentes substratos por diferentes técnicas. Após, os filmes foram funcionalizados com enzimas para produção de biossensores. Com isso, para facilitar a correlação de todos os parâmetros necessários

Figura 2.6: Formação da ligação crosslink entre o glutaraldeído e os grupos aminas residuais livres presentes nas enzimas [12, p. 48].

com os filmes, para nomenclatura dos filmes, foram utilizadas siglas que pudessem ser correlacionadas diretamente com todos os dados necessários.

A primeira sigla adotada foi o óxido utilizado, seguido do substrato. Assim, basicamente, filmes de AZO depositados sobre substratos de FTO foram chamados de AZO/FTO, por exemplo. Já os filmes de TiO_2 em substratos de FTO foram chamados de TiO_2 /FTO. No entanto, a técnica de deposição utilizada também deve ser diferenciada para cada filme, sendo então utilizado as siglas das técnicas logo após o óxido utilizado, como por exemplo, TiO_2 /DC/FTO. Essa sigla significa que o filme é um filme de TiO_2 produzido por dip-coat em substrato de FTO. As siglas para cada técnica estão descritas na Tabela 2.1.

Técnica de deposição	Sigla
Dip-Coat	DC
Spin-Coat	SC
Spray-Pyrolysis	SP
Casting	CA

Tabela 2.1: Siglas utilizadas na nomeação dos filmes referentes as técnicas de deposição utilizadas.

Além do mais, no caso dos filmes de TiO_2 , ainda é necessário a diferenciação do número de camadas. Esta, será descrita como sobescrito após a sigla da técnica de deposição. Logo, o filme de TiO_2 citado anteriormente depositado por dip-coat com uma camada receberá o nome de TiO_2 /DC₁/FTO

A partir dessas siglas, foram adicionados as siglas U e G, indicando que os filmes possuem suas superfícies com enzimas urease ou glicose oxidase imobilizadas, respectivamente. Portanto, um filme de TiO_2 depositado por dip-coat com 1 camada

e funcionalizado com urease, para ser testado como biossensor de ureia, será descrito pela sigla U/TiO₂/DC₁/FTO.

Basicamente, todos os filmes foram nomeados seguindo o padrão:

Enzima/ÓXIdo/**T**écnica de deposição(**N**)úmero de camadas/**SUB**strato

A Tabela 2.2 mostra todas as combinações utilizadas neste trabalho.

Funcionalização	Óxido	Técnica de deposição	Número de Camadas	Substrato	Sigla
–	AZO	Spray-Pyrolysis	–	FTO	AZO/SP/FTO
Urease	AZO	Spray-Pyrolysis	–	FTO	U/AZO/SP/FTO
Glicose-oxidase	AZO	Spray-Pyrolysis	–	FTO	G/AZO/SP/FTO
–	AZO	Spray-Pyrolysis	–	ITO	AZO/SP/ITO
Urease	AZO	Spray-Pyrolysis	–	ITO	U/AZO/SP/ITO
Glicose-oxidase	AZO	Spray-Pyrolysis	–	ITO	G/AZO/SP/ITO
–	TiO ₂	Spin-Coat	1	FTO	TiO ₂ /SC ₁ /FTO
Urease	TiO ₂	Spin-Coat	1	FTO	U/TiO ₂ /SC ₁ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Spin-Coat	1	FTO	G/TiO ₂ /SC ₁ /FTO
–	TiO ₂	Spin-Coat	5	FTO	TiO ₂ /SC ₅ /FTO
Urease	TiO ₂	Spin-Coat	5	FTO	U/TiO ₂ /SC ₅ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Spin-Coat	5	FTO	G/TiO ₂ /SC ₅ /FTO
–	TiO ₂	Dip-Coat	1	FTO	TiO ₂ /DC ₁ /FTO
Urease	TiO ₂	Dip-Coat	1	FTO	U/TiO ₂ /DC ₁ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Dip-Coat	1	FTO	G/TiO ₂ /DC ₁ /FTO
–	TiO ₂	Dip-Coat	5	FTO	TiO ₂ /DC ₅ /FTO
Urease	TiO ₂	Dip-Coat	5	FTO	U/TiO ₂ /DC ₅ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Dip-Coat	5	FTO	G/TiO ₂ /DC ₅ /FTO
–	TiO ₂	Casting	1	FTO	TiO ₂ /CA ₁ /FTO
Urease	TiO ₂	Casting	1	FTO	U/TiO ₂ /CA ₁ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Casting	1	FTO	G/TiO ₂ /CA ₁ /FTO
–	TiO ₂	Casting	4	FTO	TiO ₂ /CA ₄ /FTO
Urease	TiO ₂	Casting	4	FTO	U/TiO ₂ /CA ₄ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Casting	4	FTO	G/TiO ₂ /CA ₄ /FTO
–	TiO ₂	Casting	8	FTO	TiO ₂ /CA ₈ /FTO
Urease	TiO ₂	Casting	8	FTO	U/TiO ₂ /CA ₈ /FTO
Glicose-oxidase	TiO ₂	Casting	8	FTO	G/TiO ₂ /CA ₈ /FTO

Tabela 2.2: Nomenclatura dos filmes finos estudados neste trabalho.

Além do mais, nos capítulos que descrevem os estudos com as funcionalizações das superfícies dos filmes com proteínas, serão utilizadas nomenclaturas para as medições utilizadas. O primeiro tipo de medição foi realizado utilizando-se somente um filme para todo o conjunto de medidas, isto é, um único filme foi utilizado na medição com a solução de 5 mg/dL de ureia ou glicose, sendo re-utilizado na medição com a solução 40 mg/dL, e assim por diante até se chegar a última medição de 200 mg/dL. Como um mesmo filme foi usado de forma sequencial por todo o conjunto de medições, esse tipo de medição será chamada de **Uso Sequencial**, onde será comumente referida pela sigla **US**.

Já o segundo tipo de medição foi realizado de forma individual, isto é, para cada medição utilizou-se um filme novo. Com isso, esse tipo de medição será chamada de **Uso Individual**, onde será comumente referida pela sigla **UI**.

2.7 Caracterização dos filmes

2.7.1 EGFET

Os filmes foram testados em um dispositivo EGFET. Esse dispositivo consiste em um MOSFET comercial (CD4007 - Texas Instrument) [97] com um fio de cobre conectando a porta do MOSFET com o filme a ser estudado, formando assim a chamada porta estendida.

O MOSFET CD4007 possui 6 MOSFETs internos, sendo três de canal n e três de canal p, sendo utilizado um MOSFET de canal n. O amperímetro utilizado para a coleta dos dados foi o Data Acquisition HP 34970A e a fonte de tensão variável utilizada foi a Agilent E3646A Dual Output DC Power Supply. Ambos os equipamentos foram interligados a um computador que recebia os dados obtidos pelos equipamentos, sendo estes dados tratados com o programa licenciado OriginPro 8.

Para os dados coletados somente em função do pH, os valores aplicados sempre foram para a medição VDS em uma faixa de potencial de 0 a 5 V com Vgs fixo em 5 V, e na medição VGS na faixa de potencial de 0 a 5 V com Vds fixo em 5 V. Para os dados coletados em função das proteínas as medições foram realizadas no tempo, isto é, com tensões Vds e Vgs fixos em 5 V, com aplicação

destes potenciais por um período de tempo de 15 minutos, com passo de 0,1 V a cada 1 segundo. Os valores escolhidos das tensões aplicadas em função da melhor relação sinal/ruído encontrada para este dispositivo [47, p. 38].

Na região de saturação das curvas do transistor (ver figura 1.6 na página 9) na medição VDS, o valor da corrente I_{ds} pode ser demonstrada segundo a equação 2.1.

$$\sqrt{I_{ds}} = \sqrt{\frac{\mu_0 C_{ox}}{2}} \sqrt{\frac{W}{L}} (V_{ref} - V_t) \sqrt{1 + \lambda V_{ds}} \quad (2.1)$$

Onde μ_0 é a mobilidade eletrônica do canal do transistor, C_{ox} é a capacitância devido a presença do óxido na porta por unidade de área, W/L é a razão espessura/comprimento do canal do transistor, V_{ref} é a tensão aplicada ao eletrodo de referência, V_t é a tensão devido a adsorção dos íons H^+ do sensor, λ é o fator de modulação do comprimento do canal do transistor e V_{ds} é a tensão aplicada entre o dreno e a fonte [98].

Pela equação 2.1 podemos ver que a raiz quadrada da corrente I_{ds} tem relação linear com V_{ref} . Com isso, ao plotarmos $\sqrt{I_{ds}}$ em função do pH, podemos verificar a linearidade da região de saturação e com isso determinar a sensibilidade do sensor que está diretamente associada com a inclinação da reta que une os pontos, como mostra a figura 2.7.

Figura 2.7: Sensibilidade retirada pela tangente da reta de ajuste linear dos pontos de correntes em função dos valores de pHs da medição VDS.

Neste caso, a sensibilidade é dada em função de $\text{mA}^{1/2}/\text{pH}$. Para

determinação da sensibilidade em mV/pH, a linearidade adquirida vem da medição VGS.

Figura 2.8: Sensibilidade retirada pela tangente da reta de ajuste linear dos pontos de potencial em função dos valores de pHs da medição VGS.

Para isso, basta fixar um valor de corrente (neste trabalho o valor utilizado foi de 4 mA) e com isso plotar o valor de Vref correspondente em função do pH. Da mesma forma, a sensibilidade é adquirida pela linearidade do fit linear (figura 2.8).

Os resultados demonstrados em função de I_{ds} se referem ao último valor de corrente medido, quando ambas as tensões estão em 5V. Quando demonstrados em ΔV significa que o valor de corrente foi comparado ao valor de corrente encontrado somente pelo transistor (MOSFET) e com isso, sabe-se o valor de V_{gs} . Como $V_{gs} = V_{ref} + \Delta V$ e o valor de Vref é sempre fixo, consegue-se calcular o ΔV referente somente aos íons da solução.

2.7.2 Voltametria Cíclica

As medições por voltametria cíclica foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab de baixo ruído (Metrohm - PPGSTAT 128N), com módulos FRA32M, ECD e SCAN250. Os eletrodos utilizados foram, eletrodo de referência de prata (Ag/AgCl), contra eletrodo de platina e como eletrodo de trabalho os sensores testados.

Para todas as medições realizadas no potenciostato foi adicionado par de

ferro Fe^{2+}/Fe^{3+} para análise de picos, já que os filmes testados não possuem reação de oxidação e nem de redução na superfície. Para isso, 1 mM de uma solução contendo $C_6FeK_4N_6$ (potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate – Sigma-Aldrich) e $C_6FeK_3N_6$ (potassium hexacyanoferrate (III) trihydrate – Sigma-Aldrich) foi adicionada às soluções utilizadas.

Todos os resultados serão apresentados em função da corrente normalizada, isto é, todos os pontos de correntes que formaram os voltamogramas foram divididos pela área total de cada filme testado. Isso foi feito para evitar comparação entre áreas diferentes e portanto com valores de correntes diferentes devido à maior quantidade de íons das soluções interagindo com as superfícies dos filmes. A tentativa de fazer todos os filmes do mesmo tamanho foi praticamente obtida com sucesso, no entanto, como os substratos foram todos cortados manualmente, com uma pequena parte da superfície isolada com cola epóxi, e a deposição dos filmes nem sempre recobrimo totalmente a superfície dos substratos, optou-se por sempre normalizar os voltamogramas obtidos pelas áreas efetivas de cada sensor. O mesmo foi feito no EGFET, no entanto, é um dispositivo menos sensível como a voltametria cíclica, os resultados praticamente não foram alterados com essas pequenas alterações de área.

Os valores de potenciais aplicados para cada sensor foram realizados em intervalos diferentes, com prévios estudos dos intervalos que funcionam para cada sensor.

2.7.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Uma das técnicas mais comumente utilizadas para caracterização de materiais é a chamada Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV, que permite o estudo das características morfológicas e topográficas dos materiais pela alta resolução alcançada sem perda de nitidez [99].

Os MEVs foram obtidos a partir de um equipamento da marca Carls Zeiss, modelo EVO 50, de origem em Cambridge - U.K. Os filmes foram pulverizados com ouro pelo equipamento de Sputtering, da marca Bal-Tec, modelo SCD 050 Sputter Coater - Fürstentum Liechtenstein.

2.7.4 Difração de Raios-X - DRX

A difração de raios X é uma técnica utilizada para determinação das fases cristalinas presentes nos materiais sólidos, onde os átomos se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. A difração de raios X ocorre segundo a Lei de Bragg (equação 2.2) que correlaciona o ângulo de difração e a distância entre os planos característicos para cada fase cristalina.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2.2)$$

onde, n é um número inteiro, λ é o comprimento de onda do feixe de raios-X incidente, d é a distância interplanar (distância entre as camadas atômicas em um cristal) e θ é o ângulo de difração [100].

A caracterização por raios-X foi realizada com equipamento Difrátômetro de Raios X, modelo D5005 – fabricado pela Bruker AXS (Siemens).

Os espectros foram obtidos utilizando a faixa de 10 a 70°, com passo de 0,05° a cada 1,5 segundos, com radiação $\text{CuK}\alpha 1$.

2.7.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

A espectroscopia de infravermelho é um tipo espectroscopia de absorção e é utilizada para caracterização por meio da análise dos grupos funcionais presentes nas amostras, além da possibilidade de análise quantitativa em função da intensidade das bandas de forma proporcional à concentração dos componentes. Seu mecanismo depende exclusivamente da interação de moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética [9], pois as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibrações específicas, correspondente aos níveis de energia da molécula [101]. A figura 2.9 mostra os tipos de vibrações moleculares impostas pelo infravermelho [13], onde podem ser classificadas como deformações axiais ou angulares.

As análises por FTIR foram realizadas utilizando o espectrômetro Nicolet 380, fabricado pela Thermo Nicolet – USA, acoplado ao acessório de reflexão totalmente atenuada (ATR) da marca Durascope, fabricado pela Smiths Detection

Figura 2.9: *Modos de vibração molecular. Os sinais X indicam que os movimentos vibracionais ocorrem para dentro do plano do desenho, enquanto que os sinais • indicam movimento para fora do plano [13].*

– USA. O ATR permite obter espectros de absorção entre $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$, devido à alta absorção na região espectral de $700\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, pois é equipado com um cristal de diamante [102].

Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1} sobre a região espectral de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. A área útil do equipamento apresenta $250\text{ }\mu\text{m}$ de diâmetro, onde a amostra é posicionada para medição.

ESTUDO DOS FILMES FINOS DE ÓXIDO DE ZINCO DOPADOS COM ALUMÍNIO - AZO

Os filmes de óxidos de zinco foram produzidos por diferentes rotas (Apêndice A). A rota final testada foi chamada de Rota 04, e foi retirada da referência [85], onde 9,856 g de acetato de zinco dihidratado e 0,842 g de nitrato de alumínio pentahidratado foram adicionados em 100 mL de etanol absoluto (0,44 M - com 3% de dopagem de alumínio). Essa solução foi colocada sob agitação e refluxo por 3 horas a 75 °C. Durante essas três horas, 1400 μ L de ácido láctico fracionado em quatro porções foram adicionados à esta solução, em intervalos iguais de 45 minutos. Utilizando as siglas da literatura vigente, filmes de ZnO dopados com alumínio são chamados de ZnO:Al ou AZO.

3.1 Caracterizações elétricas

Foram depositados filmes por dip-coat e spray-pyrolysis. O motivo para isso é que a referência literária utilizava somente a técnica de dip-coat, que foi reproduzida e adicionada os parâmetros utilizados com as outras rotas, e a técnica de spray-pyrolysis que foi a que apresentou as melhores respostas anteriormente (vide Apêndice A). A técnica de spin-coat não apresentou resposta para nenhuma outra rota testada, portanto, já foi descartada a partir desta rota. Acredita-se que a técnica de spin-coat não foi interessante para produção dos filmes pois as soluções preparadas por todas as rotas ficavam muito líquidas (com pouca viscosidade mesmo sendo feitas

por sol-gel), fazendo com que os filmes ficassem tão finos a ponto de não serem funcionais. Mesmo com o aumento do número de deposições, e/ou alterações dos parâmetros das velocidades e frequência utilizadas no spin-coat, não foram obtidas respostas de interesse em sensores para esta técnica, levando assim ao seu descarte.

Os dois primeiros filmes depositados por dip-coat foram depositados em substratos de vidro hidrofílicos com 5 deposições cada, pós-aquecimento de 450 °C por 10 minutos e resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos após cada deposição. Novamente, nenhuma resposta foi obtida. No entanto, quando foi mantido todos esses parâmetros mas com aumento do número de deposições para 10, conseguiu-se separação total dos pHs (de 2 a 8) e sensibilidade de 21,4 mV/pH. Ao refazer esse filme foi obtida uma sensibilidade de 30 mV/pH, com separação dos pHs, mas com a linearidade para pHs básicos muito pequena, tanto que o r^2 obtido foi de 0.95. Mais cinco filmes foram refeitos mantendo-se os mesmos parâmetros mas a reprodutibilidade não foi alcançada.

Com isso, dois novos filmes foram depositados mantendo-se os mesmos parâmetros mas agora em substratos de ITO e mais dois em substratos de FTO. A escolha do substrato de ITO foi feita seguindo diversas referências literárias. Até então haviam sido utilizados somente substratos de vidro para testes, com algumas aplicações em substratos de FTO visando a melhora das respostas.

Considerando primeiro somente os filmes depositados em substratos de ITO, conseguiu-se uma separação linear entre os pHs 3 ao 8, com sensibilidade 24,75 mV/pH, respectivamente, como pode ser verificado na figura 3.1.

Quando medimos somente o ITO no EGFET, o mesmo não responde de forma linear entre os pHs 3 e 8, como mostra a figura 3.2. As linearidades ocorreram entre os pHs 2-4 e 4-7, e apresentaram sensibilidades de 37 mV/pH (linha preta) e 6,4 mV/pH (linha vermelha), respectivamente para cada faixa linear de pHs.

Com isso, as respostas obtidas pelos filmes depositados sobre os substratos de ITO foram praticamente as mesmas para todos os valores de pHs, como mostra as barras de erros muito pequenas na figura 3.1, e essas respostas foram diferentes dos filmes de ITO, assim como a figura 3.3 mostra que os valores finais das correntes I_{ds} foram praticamente os mesmos para os filmes depositados sobre os substratos de ITO, e bem diferentes em comparação com os filmes de ITO. Apesar da sensibilidade

Figura 3.1: $V_{ref} \times pH$ da média dos filmes depositados com 10 deposições por dip-coat em substratos de ITO pela Rota 04, com pós-aquecimento após cada deposição de 450 °C por 10 minutos e resfriamento por 20 minutos a temperatura ambiente. Sensibilidade de 24,75 mV/pH entre os pHs 3 e 8, com r^2 de 0,99.

Figura 3.2: $V_{ref} \times pH$ dos filmes de ITO com sensibilidade de 37 mV/pH com $r^2 = 0,81$ entre os pHs 2 e 4 e 6,4 mV/pH com $r^2 = 0,98$ entre os pHs 4 a 7.

ainda baixa, os filmes apresentaram reprodutibilidade, além do mais, podemos concluir que as respostas obtidas pertenceram aos filmes e não aos substratos, como

estava ocorrendo com as rotas anteriores.

Figura 3.3: Valores finais das correntes I_{ds} em função dos valores de pHs para os filmes depositados em substratos de ITO por dip-coat com 10 deposições pela Rota 04 com pós-aquecimento de 450 °C por 10 minutos e resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos por camada (quadrados pretos e círculos vermelhos), e do filme de ITO (triângulos verdes).

Considerando agora os filmes depositados sobre os substratos de FTO, houve total separação dos valores de pH de forma linear entre os pHs 3 e 8, como pode ser verificado na figura 3.4. A sensibilidade alcançada foi de somente 25,62 mV/pH entre a faixa de pHs de 3 a 8, sendo muito parecido com o resultado encontrado pelos filmes depositados sobre os substratos de ITO. A diferença é que os filmes em substratos de ITO apresentaram barras de erros menores, com resultados individuais praticamente idênticos, enquanto que os filmes depositados sobre os substratos de FTO apresentaram barras de erros maiores.

Quando consideramos somente os filmes de FTO, os mesmos não respondem de forma linear para os pHs básicos, como verificado na figura 3.5, com sensibilidade de 37,8 mV/pH e r^2 relativamente baixo entre os pHs 2 a 6 (linha preta na figura 3.4) e 11,3 mV/pH com ajuste linear de 0,99 entre os pHs 6 a 8 (linha vermelha na figura 3.4).

Da mesma forma que foi feita a comparação entre as correntes finais dos

Figura 3.4: $V_{ref} \times pH$ da média dos filmes depositados com 10 deposições por dip-coat em substratos de FTO pela Rota 04, com pós-aquecimento após cada deposição de 450 °C por 10 minutos e resfriamento por 20 minutos a temperatura ambiente. Sensibilidade de 25,62 mV/pH entre os pHs 3 e 8, com r^2 de 0,99.

Figura 3.5: $V_{ref} \times pH$ dos filmes de FTO com sensibilidade 37,8 mV/pH com r^2 0,96 (linha preta) entre os pHs 2 e 6, e 11,3 mV/pH com r^2 0,99 (linha vermelha) entre os pHs 6 a 8.

filmes de AZO depositados sobre substratos de ITO com as correntes finais do filme de ITO, foi feito com os filmes depositados sobre o FTO com o próprio FTO, como mostra a figura 3.6.

Figura 3.6: Valores finais das correntes I_{ds} em função dos valores de pHs para os filmes depositados em substratos de FTO por dip-coat com 10 deposições pela Rota 04 com pós-aquecimento de 450 °C por 10 minutos e resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos por deposição (quadrados pretos e círculos vermelhos), e do filme de FTO (triângulos verdes).

Os filmes depositados sobre os substratos de FTO apresentaram valores lineares das correntes em função dos pHs 3 a 8, enquanto que o filme de FTO apresentou uma linearidade somente entre os valores de pHs do 2 ao 6 e do 6 ao 8. Portanto, os filmes depositados sobre os substratos de FTO apresentaram linearidade em uma faixa maior de pHs e diferente dos filmes de FTO, que apresentou pouca seletividade para pHs básicos.

Com isso, verificamos que a Rota 04 melhor se aplicou ao propósito de produção de filmes finos como sensores de pH utilizando o EGFET. Mesmo assim, quando utilizados substratos de vidro os resultados não foram satisfatórios, melhorando quando utilizado substratos de óxidos como FTO e ITO. As respostas foram diferentes entre os filmes depositados em comparação com os substratos, o que não ocorreu com as rotas testadas anteriormente. Aproveitando os resultados

anteriores, a Rota 04 foi utilizada para deposição de filmes por spray-pyrolysis visando alcançar melhores resultados.

A partir deste ponto, os resultados serão apresentados em função do substrato utilizado, para facilitar o entendimento. Até então a Rota 04 foi produzida sempre com 3% de dopagem de alumínio. Agora serão apresentados resultados utilizando 3, 7, 8 e 10% de dopagem, para cada substrato. Com isso, a nomenclatura utilizada será AZO com a porcentagem de dopagem entre parênteses (AZO(3%), etc).

3.1.1 Substratos de vidro

- AZO(3%) - Cinco filmes foram depositados em substratos de vidro, mas nenhum apresentou resposta.
- AZO(7%) - Ao aumentarmos a dopagem de 3 para 7%, as respostas dos filmes não apresentaram padrão. Foram depositados 4 filmes, sendo que dois não responderam, um respondeu linearmente (quadrados pretos – #1 da figura 3.7) e outro com separação dos pHs mas com menor linearidade entre os pontos (círculos vermelhos – #2 da figura 3.7), com sensibilidades de 40 mV/pH e 19,36 mV/pH, respectivamente. Portanto, os filmes não foram reprodutíveis, mas ao menos começaram a responder em função dos pHs, quando depositados em substratos de vidro.
- AZO(8%) - Nenhum filme apresentou resposta.
- AZO(10%) - Foram depositados dois filmes e ambos apresentaram o mesmo padrão de resposta, onde os valores de correntes para os diferentes pHs se intercalaram durante as medições.

3.1.2 Substratos de FTO

- AZO(3%) - 5 filmes foram depositados sobre os substratos de FTO. Os resultados estão demonstrados na figura 3.8. Assim como nos filmes depositados por dip-coat, conseguiu-se alcançar resultados de interesse, mas a sensibilidade ainda foi abaixo do teórico de Nernst. Este foi o real motivo para o aumento da dopagem do alumínio na Rota 04, pois percebeu-se que esta

Figura 3.7: $V_{ref} \times pH$ dos filmes depositados por spray-pyrolysis pela Rota 04 (AZO(7%)) em substratos de vidro com valores de sensibilidade de 40 mV/pH e r^2 de 0,99 (#1 – quadrados pretos) e 19,36 mV/pH com r^2 de 0,96 (#2 – círculos vermelhos).

rota adicionada a técnica spray-pyrolysis conseguia-se chegar em um padrão de respostas mais aceitáveis para o proposto de produção de filmes como sensores de pH. No entanto, em uma tentativa de aumentar a sensibilidade, a solução foi dopada com uma porcentagem maior para deixar os filmes mais condutores.

- AZO(7%) - 9 filmes foram produzidos. O resultado da média de todos os filmes se encontra na figura 3.9. Os filmes AZO(7%) apresentaram uma sensibilidade em torno de 27,3 mV/pH.

Como resultados individuais, o filme com melhor resposta apresentou sensibilidade de 31,7 mV/pH (ver figura 3.10(a)), enquanto que o pior apresentou sensibilidade de 31,3 mV/pH, mas somente entre os pHs 3-8 (figura 3.10(b)).

Os resultados são considerados como melhores ou piores em função do valor da sensibilidade associado ao ajuste linear. Como a sensibilidade é tirada pela tangente encontrada quando plotado um fit linear podemos ter um valor de sensibilidade alto, perto do valor de Nernst, mas com um r^2 baixo, demonstrando que os pontos estão fora da reta, isto é, os valores não são realmente lineares, não tendo aplicabilidade a teoria. Por isso, o maior valor de sensibilidade nem sempre é considerado o melhor filme. A maior sensibilidade alcançada dentre os nove filmes

Figura 3.8: $V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis pela Rota 04 com 3% de alumínio em substrato de FTO, com sensibilidade de 29,44 mV/pH e ajuste linear de 0,99

Figura 3.9: $V_{ref} \times pH$ dos filmes depositados por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio em substrato de FTO, com sensibilidade de 27,28 mV/pH e r^2 de 0,92.

foi em torno de 40 mV/pH, mas com ajuste linear de somente 0,92.

Figura 3.10: Resultados individuais dos filmes com o melhor (a) e o pior (b) resultado como sensores de pH depositados por spray-pyrolysis em substrato de FTO utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio, com sensibilidades de 31,7 mV/pH com r^2 de 0,99 entre os pHs 2 a 8 e 31,3 mV/pH com r^2 de 0,98 entre os pHs de 3 a 8, respectivamente.

- AZO(8%) - Os filmes produzidos com AZO(8%) apresentaram separação de todos os pHs, como pode ser visto na figura 3.11. A sensibilidade foi em torno de 31 mV/pH.
- AZO(10%) - Os filmes com 10% de dopagem não apresentaram separação dos valores dos pHs.

Com o aumento da dopagem, os filmes depositados sobre substratos de FTO tenderam a piorar. Filmes depositados com 3% não apresentaram o maior valor de sensibilidade encontrado no entanto apresentaram as menores barras de erros associados a maior linearidade. Ao aumentarmos a dopagem de alumínio para 7% aumentou-se o valor das sensibilidades encontradas, mas aumentou-se também as barras de erros, assim como para 8%, onde as barras de erros são ainda maiores. A única alteração foi a quantidade de íons de alumínio, que possuem três elétrons na camada de valência, isto é, possui a capacidade de doar três elétrons (Al^{3+}).

Os substratos de FTO possuem como dopantes os íons flúor, que tem a capacidade de receber um elétron (F^-). Portanto, são necessários três íons flúor para

Figura 3.11: $V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 8% de dopagem de alumínio, com sensibilidade de 30,9 mV/pH e r^2 de 0,99.

estabilizar somente um íon alumínio. Ao aumentar significativamente a quantidade de íons alumínio interagindo com a mesma quantidade de íons flúor, as superfícies dos filmes tendem a ficar cada vez mais positivas. Com a superfície mais positiva a interação entre os íons da superfície na dupla camada será de atração com os íons hidroxilas e repulsão com os íons de hidrogênio provenientes da solução tampão.

Filmes finos de óxidos são altamente utilizados como sensores de pH justamente pela seletividade por íons hidrogênicos, sendo este o principal motivo do aumento dos valores de correntes quando medidos pelo dispositivo EGFET, para valores de pHs mais baixos, como discutido na seção 1.2.2 . Por isso, aumentando-se a quantidade de íons alumínio piora-se a qualidade dos filmes, principalmente para pHs mais ácidos, onde as barras de erros tenderam a aumentar mais significativamente do que as barras de erros para pHs mais básicos.

3.1.3 Substratos de ITO

- AZO(3%) - Foram produzidos 4 filmes em substratos de ITO. As respostas variaram muito de filme para filme, como mostram as barras de erros da figura 3.12.

Figura 3.12: $V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis pela Rota 04 com 3% de alumínio em substratos de ITO. Sensibilidade em torno de 50,16 mV/pH (linha preta) entre os pHs 2 e 4, e de 14 mV/pH (linha vermelha) entre a faixa de pHs de 4 a 8, com ajustes lineares de 0,99 para ambas.

Com isso podemos perceber que os filmes não foram reproduzíveis, além de não haver linearidade entre os pHs de 2 a 8, respondendo para faixas de pHs diferentes.

Quando comparamos com o filme de ITO, o mesmo apresentou o mesmo comportamento linear em diferentes faixas de pHs, como pode ser verificado na figura 3.2.

- AZO(7%) - 4 filmes foram depositados utilizando esta rota. O resultado da média pode ser verificado na figura 3.13. A sensibilidade encontrada foi de 24,2 mV/pH (r^2 0,99) na faixa de pHs entre 3 e 8.

Da mesma forma que feito para o FTO, o melhor e o pior resultados estão demonstrados separadamente, como mostra a figura 3.14.

Com o aumento da porcentagem de dopagem a linearidade entre a faixa de pHs aumentou. Pela Figura 3.13 podemos perceber que há uma faixa de linearidade muito maior entre os pHs 3 ao 8, o que não ocorria com a porcentagem menor.

- AZO(8%) - Os filmes produzidos com 8% de dopagem apresentaram

Figura 3.13: $V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio em substratos de ITO, com sensibilidade de 24,2 mV/pH e r^2 de 0,99 na faixa de pHs entre 3-8.

Figura 3.14: Resultados individuais dos filmes com o melhor (a) e o pior (b) resultado como sensores de pH depositados por spray-pyrolysis em substrato de ITO utilizando a Rota 04 com 7% de dopagem de alumínio, com sensibilidades de 26 mV/pH e r^2 de 0,99 entre os pHs 2 a 8, e 26 mV/pH com r^2 de 0,99 entre os pHs de 3 a 8, respectivamente.

linearidade parecida com os filmes com 3%, como pode ser visto na figura 3.15. Os filmes responderam de forma linear entre os pHs 2 ao 4, com sensibilidade de 77,7 mV/pH, e entre os pHs 4 e 8, com sensibilidade em torno de 21,4 mV/pH.

Figura 3.15: $V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 8% de dopagem de alumínio em substratos de ITO. Entre a faixa de pHs de 2 a 4 a sensibilidade possui valor de 77,7 mV/pH com r^2 de 0,99, e na faixa de pHs entre 4 e 8 a sensibilidade foi de 21,4 mV/pH com r^2 de 0,99.

- AZO(10%) - Os filmes produzidos com 10% apresentaram resultados parecidos com os filmes com 7%, como mostra a figura 3.16.

Ao contrário do comportamento dos filmes depositados em substratos de FTO, quando depositados sobre substratos de ITO, os resultados tenderam a melhorar com o aumento da porcentagem de dopagem. As linearidades entre a faixa total de pHs aumentaram consideravelmente com o aumento da dopagem, assim como os valores das sensibilidades, adicionados a diminuição das barras de erros.

Os substratos de ITO possuem como dopantes os íons índio, que apesar de pertencem a mesma família do alumínio, devido a sua propriedade de par inerte doa somente um elétron (In^+). Com isso, a superfície do filme fica lotada de íons positivos. Com o aumento da dopagem de íons alumínio a superfície se comporta da

Figura 3.16: $V_{ref} \times pH$ dos filmes produzidos por spray-pyrolysis utilizando a Rota 04 com 10% de dopagem de alumínio em substratos de ITO, com sensibilidade de 30 mV/pH e ajuste linear de 0,99.

mesma forma como discutido para o FTO em relação a dupla camada, no entanto o número de carreadores na superfície aumenta consideravelmente, aumentando assim a qualidade do filme como condutor. O fato dos íons alumínio e índio pertencerem a mesma família faz com que eles possuam o mesmo valor de raio atômico e de eletronegatividade (ou para o caso deles como metais representativos, eletropositividade), fazendo com que a interação entre eles não ocorra de forma muito significativa, como ocorre entre o flúor (que possui alta eletronegatividade) e o alumínio.

Considerando todos os resultados, obviamente os filmes produzidos pela Rota 04 foram os que apresentaram resultados mais coerentes para aplicabilidade como sensores de pHs. Além do mais, como técnica de deposição, a técnica de spray-pyrolysis sempre apresentou melhores resultados, independente da rota utilizada. A escolha do substrato também é de extrema importância. Os filmes produzidos em substratos de vidro (limpos ou também hidrofílicos) não apresentaram resultados de interesse. Já os substratos de FTO e ITO apresentaram resultados mais satisfatórios.

No geral, ao comparar pela porcentagem de dopagem, para filmes depositados

em substratos de FTO os filmes com 3% de dopagem foram os que responderam melhores, mas com sensibilidade ainda baixa. Considerando os filmes em substratos de ITO, os filmes com melhores respostas foram os filmes com 10% de dopagem. Mas ao comparar os filmes individualmente, os filmes considerados como de maior interesse para o propósito de sensores de pHs para uso na área médica foram os filmes AZO(7%) para ambos os substratos. Isso porque se olharmos os resultados individuais, os filmes em substratos de FTO com 7% de dopagem de alumínio apresentaram resultados extremamente satisfatórios em relação a sensibilidade com valores mais altos associado a linearidade. E quando consideramos em substratos de ITO, os filmes com 7% se comportaram muito parecidos com os filmes com 10% de dopagem, tendo alguns resultados com exatamente mesmas respostas de correntes em função do pH e mesma sensibilidades. Para fins comerciais, os filmes com menor utilização de material que respondem da mesma forma que os filmes com maior utilização de materiais se torna economicamente mais interessante. Com certeza, o resultado médio para fins comerciais é de maior importância, mas olhando os resultados individuais os filmes com 7% foram os escolhidos para a próxima etapa de funcionalização das superfícies com proteínas.

Com essa escolha, a caracterização elétrica por voltametria cíclica e as caracterizações morfológicas foram realizadas somente para os filmes estes filmes. A partir desse ponto, os filmes AZO(7%) depositados sobre FTO receberão a nomenclatura de AZO/SP/FTO, como descrito na seção 2.2, onde AZO é referente ao óxido, SP referente à técnica de deposição utilizada (spray-pyrolysis) e FTO o substrato, e os filmes AZO(7%) depositados sobre ITO receberão a nomenclatura de AZO/SP/ITO. Quando citados somente FTO ou ITO, serão referentes aos filmes de somente FTO ou ITO, sem a deposição do AZO.

3.1.4 Voltametria Cíclica

Os filmes de FTO e ITO não apresentaram picos de oxidação e nem de redução, e por isso optou-se por adicionar um par redox na solução (neste caso o par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$), e portanto pode-se usar a voltametria cíclica como ferramenta de estudos destes filmes. A figura 3.17 mostra os voltamogramas do filme FTO em função dos valores de pH.

Figura 3.17: Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme de FTO.

Os picos apresentados na figura 3.17 ocorreram devido ao par redox de ferro, e não devido ao FTO. O deslocamento dos picos pode ocorrer principalmente por dois motivos, sendo o primeiro pela sensibilidade do FTO em função do pH, como já demonstrado no EGFET, e o segundo pelo deslocamento da reação em função do pH. Para separar esses fatores, foi realizado um experimento com as mesmas soluções tampão, mantendo o par redox, mas ao invés do FTO como eletrodo de trabalho foi utilizado um eletrodo de trabalho de ouro, que não possui nenhuma seletividade para diferentes valores de pHs. A comparação dos picos está demonstrada na tabela 3.1.

A partir dos dados da tabela 3.1, foi feita a figura 3.18, onde podemos comparar os ΔE s em função dos pHs entre os filmes de ouro e de FTO.

Como esperado, as respostas do ouro seguem o padrão de cinética de oxidação do par de ferro, onde para pHs muito ácidos, até o pH 04, a variação de potencial entre os picos de oxidação e redução praticamente não variam, mesmo havendo deslocamento dos voltamogramas em função do pH. A partir do pH 04 essa variação aumentou consideravelmente em função do pH. O aumento do ΔE indica que a taxa de reação está sendo dificultada, quanto maior esse Δ mais difícil a reação ocorrer, pois a separação dos picos indicam o número de elétrons transferidos [5],

pH	FTO			ouro		
	E _{ox} (V)	E _{red} (V)	ΔE (V)	E _{ox} (V)	E _{red} (V)	ΔE (V)
2	0,40	0,19	0,21	0,33	0,25	0,08
3	0,32	0,16	0,16	0,27	0,20	0,07
4	0,31	0,14	0,17	0,25	0,18	0,07
5	0,30	0,15	0,15	0,26	0,17	0,09
6	0,31	0,15	0,16	0,27	0,15	0,12
7	0,34	0,14	0,20	0,30	0,13	0,17
8	0,36	0,11	0,25	0,33	0,10	0,23

Tabela 3.1: Valores dos potenciais onde ocorrem as reações de oxidação (E_{ox}) e redução (E_{red}) e do ΔE ($\Delta E = E_{ox} - E_{red}$) em função dos diferentes valores de pHs, para os filmes de FTO e de ouro.

Figura 3.18: ΔE em função dos pHs para os filmes de FTO (quadrados pretos) e ouro (círculos amarelos).

como mostrada na equação 1.2, na seção 1.2.3. Isso ocorre pois a taxa de oxidação é favorecida em pHs mais ácidos pela formação de complexos $Fe^{2+}-OH^-$, onde para pHs maiores os processos de oxidação e redução são comprometidos. Logo, a diferença entre o potencial em que ocorre a oxidação, e o potencial em que ocorre a redução, cresce com o aumento do valor do pH [103]. A resposta do ouro condiz exclusivamente com a cinética da reação em função do pH da solução, cinética na qual vai sempre ocorrer quando utilizadas estas soluções.

O filme FTO se comportou de maneira diferente para os pHs mais ácidos e de maneira análoga para os pHs mais básicos. Essa diferença se deve a seletividade do filme ao pH (interação que ocorre na superfície do filme com os íons da solução) somados à cinética natural da solução demonstrada com o filme de ouro. Como verificado no EGFET (ver figura 3.5), os filmes FTO não possuem seletividade para pHs básicos, respondendo de forma linear na faixa de pHs entre 2-6 e com menor sensibilidade entre os pHs 6-8. O mesmo pode ser verificado na figura 3.18, onde o filme FTO possui um padrão de resposta diferente do ouro entre os pHs 2-5 e análogo ao ouro entre os pHs 6-8, indicando que a resposta obtida entre os pHs 6-8 são referentes somente a cinética da reação entre o par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e entre os pHs 2-5 temos os dois fatores somados, isto é, tanto a cinética da reação quanto a sensibilidade do filme aos íons da solução.

A figura 3.19(a) mostra os voltamogramas do filme de ITO em função dos valores de pHs.

Figura 3.19: (a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme de ITO, e (b) comparação dos valores de ΔE em função do pHs para os filmes de ITO (quadrados vermelhos), FTO (quadrados sólidos pretos) e ouro (círculos amarelos).

O ITO se comporta praticamente igual ao FTO, sendo que os valores de ΔE são muito parecidos para todos os valores de pHs (ver figura 3.19(b)). Isso mostra que quando utilizada a técnica de voltametria cíclica a influência da dopagem

é quase nula, sendo que as alterações nas superfícies que estão ocorrendo foram exclusivamente devidas ao óxido de estanho. Ambos ITO e FTO sozinhos não são bom indicadores de pH quando testados em voltametria cíclica. No entanto, com a deposição dos filmes em cima dos substratos, podemos separar qual efeito pertence somente a cinética que ocorre na solução, os efeitos provenientes dos substratos e os efeitos dos filmes depositados.

A figura 3.20(a) mostra os voltamogramas para o filme AZO/SP/FTO.

Figura 3.20: (a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme AZO/SP/FTO, e (b) comparação entre voltamogramas medidos no pH 02 dos filmes FTO (linha preta) e AZO/SP/FTO (linha azul).

A única corrente existente no ponto de vista da interface eletrodo de trabalho/solução eletrolítica é a corrente capacitiva, visto que a faradáica só existe devido ao par redox de ferro e não devido às espécies provenientes da superfície do eletrodo de trabalho. Com isso, não podemos correlacionar os valores dos picos das correntes com a quantidade de analito ativo. Os valores dos potenciais onde ocorrem as reações de oxidação e redução também foram alterados, indicando que o filme de óxido de zinco é mais resistivo que o filme de FTO (ver figura 3.20(b)).

A figura 3.21(a) mostra o comportamento do ΔE em função dos pHs. Diferente do FTO, o filme de óxido de zinco apresentou um aumento quase que linear no ΔE . A figura 3.21(b) mostra o comportamento do número de elétrons

transferido na superfície dos filmes de FTO e de AZO/SP/FTO. Lembrando que n depende diretamente do ΔE , como mostrado na equação 1.2.

Figura 3.21: (a) ΔE em função dos valores de pHs para os filmes AZO/SP/FTO (triângulos azuis) e FTO (quadrados pretos), e (b) n em função dos valores de pHs para os filmes AZO/SP/FTO (triângulos azuis) e FTO (quadrados pretos).

O aumento do ΔE significa que está ocorrendo um aumento na dificuldade da reação ocorrer. Ao olharmos em função de n , podemos perceber mais claramente o comportamento dos elétrons na superfície dos filmes. No caso do FTO, a superfície do filme interage muito mais que no caso do filme AZO/SP/FTO. Isso pode ser verificado pelos valores de n serem muito mais altos para o FTO, indicando um número maior de elétrons envolvidos na reação da superfície dos filmes que no caso do filme de óxido de zinco. No entanto, mesmo havendo uma transferência de elétrons muito menor, o filme AZO/SP/FTO apresenta diminuição dos valores de n quase linear em função do aumento do pH. Isso mostra que o filme possui seletividade em função do pH, para toda a faixa de pH testada, como já mostrado nas medições realizadas com o EGFET.

A corrente capacitiva não é proporcional à concentração de analito (pois não obedece a lei de Faraday, mas sim da dupla camada) e é gerada apenas pelo acúmulo de cargas na superfície do filme. No entanto, a concentração de analito na camada difusa (camada externa do plano de Helmholtz) é proporcional à concentração de

analito na solução e, portanto, quanto maior essa camada difusa (onde os íons possuem mobilidade, diferente da camada interna do plano de Helmholtz), mais facilitadas ficam as reações. Com isso, o aumento do ΔE e consequente diminuição de n de forma quase linear ocorre devido à diminuição dos íons H^+ com o aumento do pH na superfície do filme. Isso indica que a reação na superfície está mais dificultada devido à pouca quantidade de íons. Esse resultado corrobora a discussão dos resultados quando medidos no EGFET.

A figura 3.22 mostra os resultados para o filme AZO/SP/ITO. Os perfis voltamétricos são extremamente diferentes dos anteriores, mesmo com o par Fe^{2+}/Fe^{3+} . Podemos verificar no pH 02 que existem dois processos de oxidação e um de redução (indicados pelas setas na figura 3.22). Com o aumento do pH esses processos vão desaparecendo rapidamente já a partir do pH 04. Como não ocorre processo de redução, não foi possível calcular o ΔE , e consequentemente o n . Esses perfis voltamétricos comumente são correlacionados com alta resistividade na superfície dos filmes quanto ao processo de transferência de elétrons.

Figura 3.22: Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme AZO/SP/ITO. As setas indicam os valores de potenciais onde ocorrem dois processos de oxidação e um de redução no pH 02.

O mesmo perfil foi obtido na referência [104] em filmes de AZO testados por voltametria cíclica, mas com somente um pico de oxidação. Nesta referência,

o intervalo de potenciais aplicados é diferente pois a solução testada foi outra. O intervalo de potencial aplicado depende da solução utilizada pois depende do íons presente na solução. No entanto, o comportamento do voltamograma ocorre de forma parecida com o encontrado na figura 3.22. Nesta mesma referência, o autor testou filmes de FTO, ITO e GZO (óxido de zinco dopado com gálio), onde para o ITO também foi encontrado o mesmo perfil, com dois picos de oxidação e somente um de redução.

Com o aumento do pH, o ITO se torna mais instável, respondendo de forma pior que em pHs ácidos (como mostrado nas medições com EGFET e na voltametria, com as figuras 3.2 e 3.19, respectivamente). A referência [105] mostra os perfis voltamétricos de filmes de ITO com o mesmo tampão fosfato utilizado neste trabalho, e mostra que, com o aumento de pH, os picos de oxidação diminuem expressivamente, na mesma faixa de potencial mostrada na figura 3.22. Já a referência [106] mostra que filmes de óxido de zinco apresentam somente um pico de oxidação em torno de -0,4 V, isto é, no mesmo potencial encontrado na figura 3.22. Com isso, um pico de oxidação pode ser referente ao óxido de zinco, enquanto que o outro pico de oxidação e o de redução podem ser referentes ao substrato de ITO, com grande deslocamento de potenciais em relação somente ao filme de ITO.

3.2 Caracterizações Morfológicas e Estruturais

3.2.1 Microscopia Eletrônica por Varredura - MEV

As imagens dos filmes selecionados foram realizados. A figura 3.23 mostra as espessuras dos filmes de FTO (a) e AZO/SP/FTO (b).

Os filmes em substratos de FTO possuem uma espessura de 1.767 nm, enquanto que somente o FTO possui uma espessura de 799 nm. Essa diferença de espessura justifica a maior resistividade apresentada nas medições por voltametria cíclica dos filmes AZO/SP/FTO em comparação com os filmes de FTO. Com isso, a interação ente os íons da solução provavelmente ocorrerá somente com os íons alumínio da superfície dos filmes, não interagindo com o íons flúor do substrato.

Já para o ITO e AZO/SP/ITO, as espessuras são muito menores, como mostra a figura 3.24.

Figura 3.23: *Imagens das espessuras dos filmes de: (a) FTO e (b) AZO/SP/FTO.*

Figura 3.24: *Imagens das espessuras dos filmes de: (a) ITO e (b) AZO/SP/ITO.*

Os filmes de ITO possuem espessura em torno de somente 68 nm, enquanto que os filmes AZO/SP/ITO possuem espessura em torno de 313 nm. Apesar da espessura ser bem menor que no caso anterior, a razão entre as espessuras dos filmes AZO em relação aos respectivos substratos é maior para o caso do ITO, comparado com o FTO. Com isso, apesar dos filmes AZO/SP/ITO serem muito mais finos que os filmes AZO/SP/FTO, em relação ao próprio substrato, o filme AZO/SP/ITO possui um aumento de espessura muito maior. Este pode ser o motivo no qual o filme AZO/SP/ITO apresentou voltamogramas com perfis tão resistivos.

A figura 3.25 mostra a superfície dos filme FTO (a) e AZO/SP/FTO (b), enquanto que a figura 3.26 mostra a superfície dos filmes de ITO (a) e AZO/SP/ITO (b).

O FTO possui uma superfície naturalmente granulosa, enquanto que o ITO apresenta uma superfície mais homogênea. Ambos AZO/SP/FTO e AZO/SP/ITO

Figura 3.25: *Imagens das superfícies dos filmes de: (a) FTO e (b) AZO/SP/FTO.*

Figura 3.26: *Imagens das superfícies dos filmes de: (a) ITO e (b) AZO/SP/ITO.*

apresentaram superfícies com bastante granulosidade, com grânulos em torno de 98 e 130 nm, respectivamente.

3.2.2 Difratometria de Raios-X - DRX

A figura 3.27 mostra o difratograma feito para o filme de FTO e o filme de AZO/SP/FTO. Os picos se formam em regiões totalmente diferentes como esperado, mostrando que são duas superfícies cristalinas sobrepostas, cada uma mantendo suas próprias características. Os valores dos picos no substrato de FTO são extremamente coerentes com os valores encontrados na literatura [107, 108] (ver anexos).

A figura 3.27 indica que os picos do filme AZO/SP/FTO seguiram quase que totalmente fiel ao padrão de difração do pó de ZnO vigente na literatura (PDF-2, referência: 01-079-2205) [109], conforme JCPDS-ICDD (Joint Committee on Powder

Figura 3.27: Difratoograma dos filmes: AZO/SP/FTO (linha preta) e FTO (linha vermelha).

Diffraction Standards - International Centre for Diffraction Data), cód. 36-1451 [110, 111], cuja comparação pode ser visualizada na tabela 3.2. Os filmes não possuem uma orientação preferencial de crescimento dos cristais, indicando que os filmes são policristalinos [112], e com planos de difração de estrutura hexagonal wurtzite [113, 114].

Já a figura 3.28 mostra os difratogramas dos filmes AZO/SP/ITO e o filme de ITO (figura 3.28).

O padrão do filme de ITO foi muito parecido com o padrão literário vigente para In_2O_3 , segundo JCPDS-ICCD, cód-6-416 [115, 116]. Já o filme de AZO/SP/ITO apresentou os mesmos picos do ITO, com intensidades menores, além de alguns picos presentes no filme de AZO/SP/FTO, referentes ao óxido de zinco, como discutido acima. A figura 3.29 mostra bem a sobreposição dos picos referentes ao ZnO.

Com isso, para ambos os filmes podemos verificar picos referentes ao óxido de zinco. Além do mais, para os filmes depositados sobre o substrato de FTO quase não há bandas referentes ao FTO, diferente dos filmes depositados sobre o substrato de

AZO(7%) em substrato de FTO		ZnO - JCPDS/36-1451	
hkl	2θ	hkl	2θ
100	31,78	100	31,76
002	34,43	002	34,42
101	36,27	101	36,25
102	47,55	102	47,53
110	56,62	110	56,60
103	62,88	103	62,86
200	66,24	200	66,37
112	67,97	112	67,96
201	69,24	201	69,09

Tabela 3.2: Comparação entre os valores obtidos por XRD para o filme AZO/SP/FTO e os valores da literatura para ZnO.

Figura 3.28: Difractogramas dos filmes AZO/SP/ITO (linha preta) e ITO (linha azul).

ITO, onde podemos verificar as bandas dos substratos, mas com menor intensidade. Isso provavelmente ocorre devido à espessura dos filmes AZO/SP/FTO ser bem maior que dos filmes AZO/SP/ITO, fazendo com que as radiações ainda consigam penetrar até os cristais dos substratos, o que não ocorre no caso do AZO/SP/FTO.

Figura 3.29: Comparação dos difratogramas dos filmes de AZO/SP/FTO (linha marrom) e AZO/SP/ITO (linha verde). As linhas verticais tracejadas indicam os picos referentes ao ZnO presentes em ambos os filmes.

3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

A figura 3.30 mostra o espectro de absorbância de infravermelho por Transformada de Fourier obtido pelo filme de FTO.

As bandas de absorção referentes às vibrações Sn-O e Sn-O-Sn ocorrem entre 400 e 800 cm^{-1} [117, 107]. Pequenas bandas entre 1600 e 1900 cm^{-1} são atribuídos ao modo vibracional Sn-OH, enquanto que a banda mais larga entre 3000 e 3500 cm^{-1} ocorre devido às vibrações O-H. Em torno de 1132 cm^{-1} ocorre as bandas referentes as ligações Si-O [118].

A figura 3.31 mostra a comparação entre os espectros de infravermelho entre os filmes de FTO (linha preta) e AZO/SP/FTO (linha vermelha).

Podemos perceber que os leves bandas referentes às vibrações Si-O desaparecem para o filme de AZO(7%). Isso porque o filme fica mais espesso e o infravermelho não consegue mais alcançar as vibrações do vidro.

Em torno de 670 cm^{-1} , podemos observar uma banda que pode ser

Figura 3.30: FTIR do filme de FTO.

Figura 3.31: Comparação entre os espectros de absorvância de infravermelho dos FTO (linha preta) e AZO/SP/ FTO (linha vermelha).

relacionado às vibrações Zn-O, como mostra a figura 3.31, pois essas vibrações se encontram entre 400 e 750 cm⁻¹ [119, 120]. As bandas mais evidentes das

vibrações Zn-O aparecem em torno de 300 e 500 cm^{-1} [119, 120, 121, 122, 123], mas infelizmente não foi possível captar os dados nesses comprimentos de onda. Além do mais, uma banda em torno de 750 cm^{-1} aparece quando medido o filme de AZO/SP/FTO. Esta mesma banda aparece em outras referências da literatura para filmes de ZnO, mas sem detalhes sobre qual vibração pertence [123].

Para o ITO, o espectro de absorvância é demonstrado na figura 3.32, juntamente com o AZO/SP/ITO.

Figura 3.32: Comparação entre os espectros de absorvância de infravermelho dos ITO (linha preta) e AZO/SP/ITO (linha vermelha).

Para o ITO, uma banda mais expressiva aparece em torno de 835 cm^{-1} e outro menor em torno de 900 cm^{-1} . Geralmente, bandas abaixo de 900 cm^{-1} são referentes às vibrações de estiramento In-O e Sn-O [124, 125]. Mais uma vez, a vibração referente à Si-O apareceu, como ocorreu com o filme de FTO. As bandas referentes ao ITO também apareceram para o filme AZO/SP/ITO, mas com diminuição de intensidade. Uma banda referente ao ZnO apareceu em torno de 670 cm^{-1} , mas com intensidade bem menor quando comparado com o mesmo filme depositado em substrato de FTO, provavelmente devido as espessuras de cada filme, como discutido na seção 3.2.1.

Com isso, os filmes AZO/SP/ FTO e AZO/SP/ ITO responderam de forma satisfatória quanto as caracterizações morfológicas. Ambos os filmes apresentaram respostas de interesse quando medidos no EGFET, mas AZO/SP/ ITO apresentou perfis voltamétricos com alta resistividade. Com isso, AZO/SP/ FTO possui grande potencial para ser utilizado futuramente como sensor de pH, ainda necessitando de estudos mais aprofundados. AZO/SP/ ITO não deve ser descartado para estudos futuros, no entanto, para técnica de voltametria cíclica ainda demanda estudos de base mais rigorosos.

Devido as respostas de interesse, o próximo capítulo visa o estudo desses filmes como biossensores de ureia e glicose.

BIOSSENSORES DE UREIA E GLICOSE UTILIZANDO FILMES AZO

As superfícies dos filmes FTO, ITO, AZO/SP/FTO e AZO/SP/ITO foram funcionalizadas tanto com urease quanto com glicose oxidase, como descritos na seção 2.5, para detecção da ureia e glicose, respectivamente. A seguir, serão apresentados cada caso.

4.1 Biossensor de ureia

As superfícies dos filmes foram imobilizadas com urease e medidos em diferentes concentrações de ureia, entre 5 e 200 mg/dL.

4.1.1 EGFET

4.1.1.1 Interações dos íons amônio com a superfície dos filmes

Alguns testes foram realizados para estudo da interação das superfícies com íons amônio. Todos os testes foram feitos com soluções diferentes contendo íons amônio (NH_4^+), para saber se os filmes interagem somente como os íons H^+ , como esperado, ou também com os íons amônio liberados na reação. Somente os resultados das medições feitas com os filmes FTO serão apresentados, pois as respostas foram as mesmas para todos os filmes.

O primeiro teste de interação foi realizado com hidróxido de amônio (equação 4.1). A reação que ocorre nesta solução libera amônia (gasoso), íons hidrônios e

hidroxilas (aquosos), como mostra a equação 4.1.

A base $NH_4OH_{(aq)}$ é muito fraca e dissocia-se facilmente em íons amônio e hidroxila. Com isso, a figura 4.1 foi construída, onde as concentrações de íons amônio foram variadas entre 5 e 200 mg/dL.

Figura 4.1: Corrente em função do tempo para os filmes FTO para diferentes concentrações de hidróxido de amônio.

A figura 4.1 mostra que com o aumento da concentração de íons amônio, os valores de correntes diminuem. Essa resposta condiz com o esperado, onde o aumento da concentração libera mais íons OH^- , deixando o pH da solução mais básico, e com isso diminuindo o valor da corrente, como descrito na seção 2.7.1. No entanto, somente essa medição não exclui a possibilidade dos filmes reagirem com os íons amônio. Por isso, a segunda solução testada foi feita com fluoreto de amônio.

As soluções com fluoreto de amônio também foram preparadas com diferentes concentrações de íons amônio, como na solução anterior de hidróxido de amônio. No entanto, agora a reação possui íons de fluor, como mostra a equação 4.3.

onde,

Com isso, a reação de fluoreto de amônio libera íons hidroxila deixando a solução mais básica, como no caso do hidróxido de amônio, e por isso os valores de correntes devem diminuir em função do aumento da concentração. A figura 4.2 mostra as respostas das correntes em função do tempo para cada concentração nas soluções de fluoreto de amônio.

Figura 4.2: Corrente em função do tempo para os filmes FTO para diferentes concentrações de fluoreto de amônio.

Novamente, os filmes demonstram resposta em função da variação do pH, com o aumento de íons hidroxila na solução, sem interferência direta com os íons amônio. Lembrando que a reação leva a uma liberação de íons amônio mais ácido fluorídrico (que é um ácido forte) e íons hidroxilas.

Para certificar que os filmes realmente só sentem a variação de pH devido aos íons hidroxilas e não possuem interferência com os íons amônio, uma terceira e última medição foi realizada, agora com persulfato de amônio, cuja reação **não** libera íons hidroxilas, somente íons amônio.

A equação 4.5 mostra a dissociação dos íons presentes na solução utilizada.

onde,

Com isso, os íons que ficam na solução são os íons hidrônio (que aumentam o pH da solução da mesma forma que os íons H^+) e íons peroxidissulfato. A figura 4.3 mostra os resultados das correntes em função das concentrações testadas.

Figura 4.3: Corrente em função do tempo para os filmes FTO para diferentes concentrações de persulfato de amônio.

Quando medimos os filmes em uma solução que não contém íons hidroxilas mas ainda contém íons amônio, os filmes não apresentam seletividade alguma pela concentração. Com isso, podemos dizer que os filmes não interagem com os íons amônio, sendo que as respostas obtidas serão em função da alteração de pH em função dos íons hidroxilas liberados na hidrólise da ureia.

A reação de hidrólise da uréia tem como produto final os íons OH^- e NH_4^+ , proporcionando um caráter final básico à solução, como mostra a equação 4.7. Com isso, espera-se que a corrente diminua com o aumento da concentração de ureia na

solução.

onde,

4.1.1.2 U/FTO

Primeiro, as imobilizações foram feitas sobre as superfícies dos filmes de FTO e de ITO. Para isso, os filmes com as superfícies imobilizadas foram medidos em diferentes concentrações de ureia, entre 5 e 200 mg/dL utilizando dispositivo EGFET pela medição no tempo por 10 minutos (medição na qual as tensões V_{ds} e V_{gs} são aplicadas com um valor fixo durante um período de tempo e a corrente é mensurada, vide fig 1.9 na página 13).

Os resultados são obtidos em função dos valores de correntes, sendo as sensibilidades obtidas em função dos potenciais, como demonstrado na seção 2.7.1. No caso do EGFET, é de grande interesse a análise dos resultados em função do ΔV , pois assim podemos verificar exatamente como os sensores estão se comportando em função da variação do pH na interface entre filmes e as soluções. Lembrando que $V_{gs} = V_{ref} + \Delta V$, portanto, sabendo o V_{ref} e obtendo-se o V_{gs} pelas medições, conseguimos facilmente determinar o ΔV , e com isso analisar melhor os resultados dos biossensores.

Como a hidrólise da ureia aumenta o valor do pH na solução, os valores de ΔV têm que aumentar no eixo negativo do gráfico com o aumento da concentração. Para facilitar o estudo e comparação com os biossensores de glicose, os resultados serão apresentados em módulo, sendo assim, os valores de ΔV devem *aumentar* com o aumento da concentração.

Os resultados serão todos apresentados pelo ΔV em função das concentrações. Para obtenção dessas figuras, pegou-se o último valor de corrente medido para cada concentração e este foi comparado com o valor de tensão do transistor. Com isso, foi obtido o valor de V_{gs} . O valor de V_{ref} foi medido para cada filme, pela medição em concentração zero. Inicialmente, o valor de V_{ref} deveria ser 5 V, pois é o valor aplicado no sistema. Mas, como o sistema possui somente dois eletrodos, esse valor

sofre uma variação inicial devido aos íons presentes na solução. Essa variação muda em função de cada filme. Finalmente, sabendo V_{gs} e V_{ref} , calcula-se ΔV para cada concentração.

Além do mais, dois tipos de medições foram realizadas, sendo a primeira chamada de US (Uso Sequencial, onde o mesmo filme foi usado em todas as diferentes concentrações) e UI (Uso Individual, onde um novo filme foi usado para cada concentração) (vide seção 2.2).

Considerando primeiro os filmes U/FTO (a partir desse ponto, filmes imobilizados com urease possuem a letra U para diferenciação dos filmes medidos em pHs), a figura 4.4(a) mostra a corrente final em função da concentração de ureia na medição US, enquanto a figura 4.4(b) mostra a corrente final em função da concentração de ureia pela medição UI.

Figura 4.4: I_{ds} em função das concentrações de ureia para os filmes U/FTO nas medições (a) US e (b) UI.

Para a medição US praticamente não há variação da corrente, com leve diminuição dos valores e barras de erros muito grandes. Esse comportamento é esperado pois com o uso continuado do mesmo filme para várias concentrações de ureia ocorre o consumo das enzimas, aumentando o efeito de “memória” para a próxima medição. Esse fator ocorre pois, apesar das medições serem realizadas sempre da menor para a maior concentração para diminuir um pouco

o efeito de consumo da urease, ainda assim a quantidade de urease imobilizada na primeira medição vai ser diferente da quantidade para a segunda medição, e assim sucessivamente, diminuindo o número de sítios ativos que irão interagir com a uréia da solução.

Para a medição UI, as barras de erros são bem menores, visto que o efeito memória foi descartado. Os filmes apresentaram um decaimento nos valores das correntes entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, com uma variação aleatória e barras de erros maiores para as concentrações mais altas. Para facilitar o estudo, a figura 4.5 mostra o comportamento do ΔV em função das concentrações para cada tipo de medição.

Figura 4.5: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,39 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 1,74 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de resposta útil dos biossensores.

Para ambas as medições os filmes responderam de forma linear entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, com sensibilidades em torno de 0,4 e 1,7 mV/(mg/dL), respectivamente para US e UI. No entanto, como demonstrado na figura 4.4(a), as barras de erros na medição US são muito grandes, levando a um grande erro de interpretação dos resultados. Os valores de ΔV apresentaram valores muito maiores na medição UI em comparação à medição US, no entanto, ao considerarmos as barras de erros, os valores quase se igualam. Para as concentrações

maiores, os filmes U/FTO não apresentaram respostas satisfatórias em nenhuma medição, apresentando uma saturação para as maiores concentrações na medição US, e valores bem aleatórios na medição UI.

Como já discutido anteriormente, o efeito “memória” dos filmes apresentam consequências irreversíveis na medição US, com aumento expressivo das barras de erros e consequente saturação dos valores de ΔV , enquanto que para a medição UI, os filmes apresentaram respostas de interesse na faixa de concentração até 80 mg/dL. Lembrando que a hidrólise da ureia leva a um pH mais básico na solução, e os filmes de FTO não apresentaram sensibilidade para pHs básicos, como visto no Capítulo 3. Com isso, o aumento da concentração leva a uma piora na qualidade dos sensores pelo aumento dos valores dos pHs.

Portanto, os biossensores de ureia com filmes de U/FTO apresentaram resultados satisfatórios entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL na medição UI. Lembrando que a concentração de ureia no sangue de um indivíduo normal varia entre 10 e 40 mg/dL, sendo que valores acima de 180 mg/dL indica um indivíduo com necessidade imediata de hemodiálise.

4.1.1.3 U/AZO/SP/FTO

Serão apresentados agora os resultados dos filmes U/AZO/SP/FTO (figura 4.6) para facilitar a comparação com os resultados obtidos pelos filmes U/FTO.

Os filmes U/AZO/SP/FTO apresentaram uma baixa qualidade das respostas quando medidos na forma US, com melhora para a medição UI, da mesma forma que ocorreu com os filmes U/FTO.

Para a medição US, U/AZO/SP/FTO respondeu de forma linear entre 40 e 120 mg/dL, com baixa sensibilidade. Parece que o filme responde linearmente entre 5 e 40 mg/dL, com posterior indício de saturação entre 40 e 120 mg/dL, seguido de um dano no filme para as maiores concentrações. Quando comparado com a medição UI, os filmes apresentaram sensibilidade entre 5 e 120 mg/dL, com posterior saturação das respostas, como mostra a figura ??(b). Com isso, o efeito memória prejudicou a qualidade do sensor, com valores de ΔV s bem menores.

O mesmo comportamento ocorreu entre os filmes FTO e AZO/FTO quando medidos como sensores de pHs, onde a deposição do óxido melhorou a resposta do

Figura 4.6: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/AZO/SP/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,14 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,9 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 0,08 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes.

sensor para pHs maiores. Neste caso, o aumento da concentração leva a um aumento do pH na solução U/AZO/SP/FTO na medição UI apresentaram respostas melhores para concentrações maiores em comparação com os filmes U/FTO.

Portanto, tanto como sensores de pHs quanto como biossensores de ureia, a deposição do óxido de zinco sobre o substrato de FTO apresentou uma melhora na qualidade das respostas, principalmente para pHs mais básicos.

4.1.1.4 U/ITO

A figura 4.7 mostra os resultados referentes aos filmes U/ITO.

Para a medição US, os filmes de U/ITO não apresentaram respostas satisfatórias, com aumento do ΔV entre as duas primeiras medições, e subsequente estrago dos filmes devido aos valores de ΔV aleatórios.

Na medição UI, os filmes de U/ITO responderam na faixa de concentração de 5 a 120 mg/dL, seguido de uma saturação, com diminuição inclusive das barras de erros. Provavelmente, a homogeneidade dos filmes de ITO devem imobilizar uma quantidade de urease muito menor do que nos filmes mais porosos. Com isso,

Figura 4.7: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/ITO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 0,22 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é somente um guia para os olhos.

o efeito memória na medição US provavelmente causa um dano irreversível muito mais rapidamente do que nos outros filmes. Isso porque na medição UI os filmes apresentaram um padrão de respostas mais satisfatório, indicando que quando o filme é usado pela primeira vez ele responde para diferentes concentrações. A partir de 120 mg/dL, provavelmente ocorreu uma saturação (vide linha vermelha), isto é, a quantidade de enzimas imobilizadas é o suficiente para reagir até em torno de 120 mg/dL, sendo que concentrações maiores já se tornam muito concentradas, e com isso o filme não “sente” esse aumento.

Em comparação, os biossensores de ureia apresentaram resultados melhores do que os sensores de pHs, quando produzidos com filmes de ITO, pois apresentaram respostas para concentrações maiores (consequentemente pHs maiores).

4.1.1.5 U/AZO/SP/ITO

Por fim, a figura 4.8 mostra o comportamento do ΔV em função do aumento da concentração e do tipo de medição utilizada para os filmes U/AZO/SP/ITO.

Os filmes U/AZO/SP/ITO apresentaram respostas muito diferentes em função das medições utilizadas. Para US, os filmes responderam quase que de forma

Figura 4.8: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/AZO/SP/ITO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,19 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 2,36 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade 1,33 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é somente um guia para os olhos.

saturada entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, com expressivo aumento dos valores dos ΔV s para as maiores concentrações, apresentando uma sensibilidade de 2,36 mV/(mg/dL) entre 120 e 200 mg/dL. Esse comportamento não é comum, indicando que algo aconteceu a partir da medição em 120 mg/dL. Por exemplo, como as primeiras concentrações apresentaram praticamente os mesmos valores de ΔV e todos muito perto do zero, com expressivo aumento dos valores para as concentrações maiores, isso pode indicar que algo provavelmente estava “travando” as reações, como por exemplo alguma camada de “sujeira”, que posteriormente foi retirada colocando novas enzimas em contato com a solução, justificando assim o aumento expressivo dos valores dos ΔV s. Essa camada não é necessariamente “sujeira”, podendo ser uma camada extra de óxido que foi depositada, mas devido à porosidade as enzimas conseguiram se ligar em camadas mais internas. Com o uso continuado do filme, essa camada pode ter se desprendido do filme, colocando outras enzimas mais internas em contato com a solução.

Já em relação à medição UI, os filmes apresentaram um aumento linear entre

as concentrações de 40 a 120 mg/dL, com sensibilidade de 1,33 mV/(mg/dL). Para as concentrações maiores, houve uma diminuição dos valores de ΔV . Com isso, para essa medição, os filmes apresentaram uma possível saturação para grandes concentrações, com aumento expressivo da barra de erros. Esse comportamento é diferente do esperado, pois os valores de ΔV para a medição US apresentaram aumento muito mais expressivo para as maiores concentrações do que na medição UI, sendo possivelmente justificado somente pelo desprendimento de camadas mais externas, o que não ocorre com os filmes na medição UI pois foram utilizados somente uma vez.

No geral, a deposição do óxido nos substratos de ITO alterou significadamente as respostas dos sensores, mas não necessariamente melhorando a qualidade dos biossensores, como ocorreu com os filmes depositados sobre o FTO.

4.1.2 Voltametria Cíclica

Outra caracterização elétrica feita para os filmes foi a voltametria cíclica. As soluções utilizadas foram descritas na seção 2.5, assim como os parâmetros utilizados. Os resultados serão demonstrados a seguir.

4.1.2.1 U/FTO

A figura 4.9 mostra os voltamogramas dos filmes de U/FTO em função das diferentes concentrações de ureia para as medições US e UI.

Podemos perceber que os picos de oxidação não são mais tão definidos quanto os picos produzidos pelos filmes de FTO somente em função do pH (ver figura 3.17, p. 62). Pelos próprios valores dos potenciais encontrados para cada pico, já podemos perceber que o filme de U/FTO com urease possui um caráter mais resistivo, fato que também pode ser verificado pelos valores de ΔE s mais altos. Para US, os ΔE s aumentaram enquanto que em UI os ΔE s diminuíram quase que de forma linear com o aumento da concentração, como mostra a linha vermelha na figura 4.9(d).

Esse decaimento significa que, como já discutido anteriormente, a reação na interface superfície/solução está sendo facilitada de ocorrer. Portanto, o aumento que ocorre na medição US se deve ao efeito de memória que ocorre na superfície do filme, justificando o aumento do ΔE . Isso porque com a menor quantidade disponível

Figura 4.9: Perfis voltamétricos para os filmes U/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos.

de urease na superfície do filme, menor a interação entre a superfície do filme e os íons da solução, tornando a reação de hidrólise mais difícil de ocorrer, mesmo com o aumento da concentração de ureia.

Além do mais, na medição US aparecem dois picos de redução, sendo o primeiro chamado de E_{red1} , que possui um aumento em sua intensidade de corrente em função do aumento da concentração, e o segundo, chamado de E_{red2} , que

apresenta uma diminuição na intensidade de corrente. Os potenciais E_{red1} aparecem em uma faixa de potencial muito perto dos valores de redução do par de ferro utilizado na solução, indicando que esses picos podem ter se formado em função do par redox do ferro. Lembrando que somente conseguimos ver os picos de oxidação e redução devido ao par de ferro presente na solução, portanto provavelmente é este o pico de interesse.

Para todos os filmes na forma UI aparece somente um pico de redução para cada concentração (figura 4.9(b)), indicando que dois picos de redução não deveriam ocorrer. Um fator que pode ter influenciado na formação deste segundo pico de redução pode ser oxidação da superfície do filme antes da medição, por alguma razão como armazenamento inadequado ou demora no uso. Isso porque não ocorrem dois picos de oxidação, e com o aumento da concentração os E_{red2} diminuem de intensidade de corrente.

Já na medição UI, como as proteínas não foram consumidas anteriormente, com o aumento da quantidade de ureia disponível na solução fica mais fácil a interação entre a ureia e a urease da superfície do filme. Com isso, espera-se que a reação seja facilitada. Para as concentrações mais altas (de 160 e 200 mg/dL) a variação do ΔE foi muito menor quando comparada entre as outras concentrações, indicando que 200 mg/dL já praticamente alcança o limite máximo de saturação. Lembrando que todas as medições feitas com imobilização possuem um valor fixo de pH em 6, tendo seu valor alterado somente em função da hidrólise da ureia. Com isso, os picos praticamente não são deslocados como ocorre em função dos valores de pHs e as variações dos ΔE s não possuem influência significativa do pH para a voltametria cíclica, como pode ser verificado na figura 3.18 onde o valor de ΔE para o pH 06 do filme de FTO é em torno de 0,16 V.

4.1.2.2 U/AZO/SP/FTO

Para os filmes U/AZO/SP/FTO. Os resultados dos voltamogramas serão demonstrados a seguir na Figura 4.10.

Tando na medição US quanto na medição UI a concentração de 5 mg/dL não apresentou nem picos de oxidação e nem de redução. Na medição US, o mesmo comportamento resistivo foi repetido para as próximas concentrações, demonstrando

Figura 4.10: Perfis voltamétricos para os filmes U/AZO/SP/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI.

um efeito de memória muito forte, onde todas as concentrações praticamente apresentaram o mesmo perfil, não havendo distinção alguma. Já na medição UI, os voltamogramas apresentaram perfis bem distintos em função da concentração. As concentrações de 5 a 80 mg/dL apresentaram os mesmos perfis da medição US, com comportamento bem resistivo mas com aumento gradativo das correntes. A partir da concentração de 120 mg/dL começaram a aparecer picos de oxidação e de redução, que foram deslocados para a direita com o aumento da concentração para 160 mg/dL e depois praticamente mantido para 200 mg/dL.

No perfil votamétrico referente à concentração de 160 mg/dL na medição UI aparecem dois picos de oxidação, sendo um maior, em um potencial de valor próximo ao pico de oxidação do voltamograma referente à concentração de 200 mg/dL, e outro pico menor, mais a direita, perto de 0,3 V. Este segundo pico menor, pode estar correlacionado ao pico de oxidação do par de ferro da solução, pois ocorrem no mesmo potencial (em torno de 0,3 V). No entanto, não é possível ver o pico de redução em torno de 0,2 V. Isso pode ocorrer devido ao intervalo de potencial testado e da velocidade da medição entre cada intervalo de potencial aplicado que pode fazer com que não seja possível que o equipamento leia essa reação de redução, lendo somente a reação de redução mais expressiva que ocorre em torno de -0,2

V. Com isso, podem estar ocorrendo mais processos do que o perfil voltamétrico consegue detectar. Além do mais, outra possibilidade para este segundo pico de oxidação ocorrer é que a superfície do filme apresente alguma “sujeira” ou algum processo de oxidação da própria superfície do filme.

4.1.2.3 U/ITO

Os filmes de U/ITO com urease imobilizadas em suas superfícies também apresentaram um perfil mais resistivo em comparação com os filmes sem a imobilização, mas menos resistivos quando comparados com o U/FTO, como pode ser verificado nas figuras 4.11(a) - (d). No entanto, os picos de oxidação e redução possuem uma definição menor na medição US (figura 4.11(a)) do que nos filmes de ITO em função dos valores de pHs (vide figura 3.19, p. 64), com melhor definição na medição UI (figura 4.11(b)).

Na medição US os valores de ΔE s diminuem com as concentrações mais baixas e a partir de 80 mg/dL começam a aumentar. Isso significa que para menores concentrações as reações nas superfícies dos filmes ainda ocorrem normalmente, enquanto que para maiores concentrações, essa reação começa a ser dificultada tanto pelo aumento da concentração quanto pela diminuição de urease na superfície do filme. O mesmo ocorreu quando medidos no EGFET. Já na medição UI, os ΔE s diminuíram em função das concentrações, como ocorre no U/FTO, mas de forma não tão linear, tendo seus valores para as concentrações entre 80-160 mg/dL praticamente constantes.

Na medição UI com dispositivo EGFET, os filmes de U/ITO apresentaram respostas com seletividade para as concentrações de 5 a 120 mg/dL, seguido de uma saturação. Na voltametria cíclica, essa saturação parece ocorrer entre as concentrações 120 e 160 mg/dL.

4.1.2.4 U/AZO/SP/ITO

Já para os filmes U/AZO/SP/ITO os resultados serão demonstrados pela figura 4.12.

Da mesma forma que ocorreu nas medições utilizando o dispositivo EGFET a medição US parece não ter sido afetada pelo efeito memória com o aumento da

Figura 4.11: Perfis voltamétricos para os filmes de U/ITO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é somente um guia para os olhos

concentração, pois as intensidades das correntes aumentaram com a concentração. A medição UI não apresentou respostas satisfatórias.

Quando calculamos os ΔE s referentes à medição US, há um grande aumento do seu valor absoluto em função do aumento da concentração, indicando que a reação está mais difícil de ocorrer. Uma possível resposta para este comportamento seria que o aumento das intensidades das correntes ocorrem com o aumento da

Figura 4.12: (a) Perfis voltamétricos e (b) ΔE em função da concentração de ureia para a medição US e (c) perfis voltamétricos para a medição UI, para os filmes U/AZO/SP/ITO. A linha vermelha é um guia para os olhos.

concentração pois a reação na superfície do filme está mais difícil de ocorrer (pelo aumento dos ΔE s) devido ao consumo da urease na superfície dos filmes em função dos aumentos das concentrações de ureia, facilitando então com que a interface superfície do filme/eletrolitos da solução consigam detectar o processo de oxiredução do ferro. Já na medição UI, o único voltamograma parecido com a medição US é o da concentração de 5 mg/dL, para as concentrações de 40, 80 e 200 mg/dL não

ocorrem picos nem de redução e nem de oxidação, apresentando voltamogramas muito parecidos com os voltamogramas somente dos filmes U/AZO/SP/ITO sem urease na superfície (ver figura 3.22, p. 67). As concentrações de 120 e 160 mg/dL apresentaram leves picos, sendo que para 160 mg/dL os picos ocorrem nos mesmo potenciais que os picos dos voltamogramas da medição UI, enquanto que para 120 mg/dL os picos ocorrem em potenciais muito diferentes.

Para as concentrações que apresentaram perfis muito parecidos com os perfis dos filmes de U/AZO/SP/ITO, que são de 40, 80 e 200 mg/dL, parece que não houve imobilização das enzimas na sua superfície. Nas concentrações de 120 e 160 mg/dL, já podem ser observados picos de redução e de oxidação, com pequeno deslocamento para a direita para a maior concentração (160 mg/dL), como ocorreu nos filmes U/AZO/SP/FTO também na medição UI.

Com isso, parece que para ambos os filmes U/AZO/SP/FTO e U/AZO/SP/ITO, a medição US leva a um comportamento igual ao dos perfis voltamétricos sem a imobilização, somente com alteração dos valores das correntes em função do aumento da concentração, mas quando há picos, eles aparecem sempre nos mesmo potenciais. Já na medição UI, para ambos os filmes, picos de oxidação e redução apareceram dependendo da concentração, com leve deslocamento para a direita entre as concentrações de 120 a 160 mg/dL para ambos. Para U/AZO/SP/ITO não foi obtido resultado nas concentrações de 40, 80 e 200 mg/dL, indicando que não houve imobilização das enzimas.

Os filmes FTO apresentaram, no geral, resultados de interesse entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL para ambas as medições realizadas no EGFET, e variação de ΔE de forma satisfatória na medição UI quando medidos na voltametria cíclica, na faixa de concentração de 40 a 200 mg/dL. Já AZO/SP/FTO apresentou resultados melhores no EGFET para medição UI, com melhora nas respostas das concentrações mais altas, mas sem resultados satisfatórios na voltametria cíclica.

Os filmes ITO apresentaram resultados parecidos com AZO/SP/FTO na medição UI, com seletividade entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, e variação maior do ΔV em comparação com AZO/SP/FTO, consequentemente com valor maior de sensibilidade. Na voltametria cíclica, os resultados referentes a UI corroboraram com os resultados do EGFET. Para AZO/SP/ITO, os filmes

apresentaram alta sensibilidade para concentrações altas na medição US e alta sensibilidade para as concentrações menores na medição UI, com saturação em concentrações maiores. Na voltametria, a medição US apresentou crescimento linear do ΔE enquanto que UI não apresentou respostas satisfatórias.

A caracterização por FTIR dos filmes U/AZO/SP/FTO e U/AZO/SP/ITO está demonstrada no Apêndice B.

O próximo passo foi realizar os mesmos estudos mas como biossensores de glicose.

4.2 Biossensor de glicose

Agora, ao invés de urease, os filmes foram imobilizados com glicose oxidase e as medições foram feitas utilizando soluções com diferentes concentrações de glicose (descritos na seção 2.5). Para diferenciar, os filmes imobilizados terão a letra G no início do nome.

Ao contrário da ureia, a reação de hidrólise da glicose libera íons H^+ na solução, deixando o pH da solução mais ácido com o aumento da concentração, consequentemente levando a um aumento do valor da corrente, como mostra a equação 4.9.

onde,

Com isso, no caso da glicose, ΔV devem aumentar com o aumento da concentração.

4.2.1 EGFET

4.2.1.1 G/FTO

Os filmes FTO foram imobilizados com glicose oxidase (G/FTO). A figura 4.13 mostra o comportamento do ΔV em função da concentração de glicose.

Para ambas as medições, os filmes se comportaram exatamente iguais, com aumento linear entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e possível dano dos filmes

Figura 4.13: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 1,2 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,5 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes.

para as concentrações maiores. Os valores de ΔV para a medição US apresentaram valores maiores em relação aos valores obtidos na medição UI, com menores barras de erros. Isso demonstra uma consequência menor do efeito memória. Apesar do comportamento parecido em ambas as medições, os valores das sensibilidades foram muito diferentes nas mesmas faixas de concentração, indicando uma piora na qualidade do filme quando utilizados individualmente, ocorrendo exatamente o oposto quando utilizados como biossensores de ureia.

4.2.1.2 G/AZO/SP/FTO

Ao fazermos as mesmas análises para os filmes G/AZO/SP/FTO, podemos ver que a deposição do óxido de zinco melhorou a resposta em relação a somente o filme G/FTO, como mostra a figura 4.14.

O comportamento dos filmes G/AZO/SP/FTO foi bem parecido com o comportamento dos filmes G/FTO, com aumento linear nas concentrações mais baixas, mas sem o estrago dos filmes para concentrações maiores.

Na medição US houve uma quebra na linearidade das respostas dos filmes

Figura 4.14: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/AZO/SP/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,5 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL e de 0,08 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,56 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 0,18 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes.

entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. Provavelmente isso ocorreu em função do efeito memória, onde as próximas medições são prejudicadas pela diminuição das enzimas nas superfícies dos filmes. A sensibilidade alcançada foi em torno de 0,5 mV/(mg/dL) entre as menores concentrações, com praticamente saturação para as concentrações maiores. As barras de erros maiores corroboram o efeito memória citado anteriormente.

Para a medição UI, o valor de sensibilidade para as menores concentrações foi praticamente o mesmo da medição US. Também foi parecido com o valor encontrado para o filme G/FTO. Para as concentrações maiores, ocorre uma diminuição da sensibilidade, mas com indícios de saturação menores do que em US. Essa diminuição do valor da tangente para concentrações maiores indica que os filmes começaram a sentir uma certa saturação da quantidade de glicose na solução, mas ainda assim com diferenciação entre as concentrações, o que praticamente não ocorreu mais em US devido ao efeito memória.

Da mesma forma que ocorreu com os sensores de pH e os biossensores de

ureia, para os biossensores de glicose a deposição do AZO sobre o substrato de FTO melhorou muito a qualidade das respostas em comparação aos substratos.

4.2.1.3 G/ITO

Os filmes de G/ITO apresentaram respostas com piora na qualidade das respostas em relação aos filmes anteriores, como mostra a figura 4.15.

Figura 4.15: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/ITO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 3,18 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes.

Apesar do grande aumento nos valores dos ΔV s para ambas as medições em relação aos valores de ΔV encontrados para os outros filmes, implicando em um valor de sensibilidade mais alto na medição UI pelo aumento da tangente, ao analisarmos o conjunto de dados podemos perceber que os filmes G/ITO não apresentaram respostas satisfatórias como biossensores de glicose. Isso porque para a medição US, houve uma grande diminuição dos valores dos ΔV s ao invés de um aumento, como esperado. A diminuição do ΔV implica que a interface filme/solução está ficando mais básica. Como discutido anteriormente, os filmes de ITO são muito homogêneos, provavelmente levando a uma diminuição da quantidade de enzimas imobilizadas na sua superfície em comparação com filmes mais poroso. Consequentemente, o filme estraga mais rápido, pois o consumo da enzima ocorre mais rapidamente, mesmo em

concentrações menores. Com isso, com o aumento da concentração a diminuição de enzimas leva a uma consequente diminuição de reação, fazendo com que o filme sinta a basicidade da solução levando a uma diminuição dos ΔV s. Quando analisamos os filmes U/ITO, estes também apresentaram respostas ruins como biossensores de ureia na medição US.

Já na medição UI, os filmes apresentam um grande aumento nos valores dos ΔV s entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, com enorme queda para as concentrações maiores, levando a valores de ΔV quase iguais ao de 5 mg/dL. Logo, individualmente, os filmes conseguem detectar uma variação de concentrações entre 5 e 80 mg/dL.

4.2.1.4 G/AZO/SP/ITO

A figura 4.16 mostra a respostas dos filmes G/AZO/SP/ITO.

Figura 4.16: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/AZO/SP/ITO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 2,96 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Para a medição US, os filmes G/AZO/SP/ITO apresentaram respostas praticamente iguais para todas as concentrações, com valores próximos ao zero, indicando pouca variação, além de barras de erros muito grandes para todas as concentrações. Com isso, da mesma forma que ocorreu com os filmes G/ITO, os

filmes G/AZO/SP/ITO não apresentaram respostas de interesse quando medidos sequencialmente.

Já para a medição UI, as respostas obtidas foram parecidas com as respostas apresentadas pelos filmes de G/ITO, com sensibilidade alta na mesma faixa de concentração. O mesmo ocorreu quando testados como biossensores de ureia.

Com isso, a deposição do óxido não alterou muito a qualidade dos biossensores quando medidos na forma UI.

4.2.2 Voltametria Cíclica

As mesmas análises que foram feitas para a ureia foram realizadas para a glicose.

4.2.2.1 G/FTO

Primeiro, seguem os resultados dos filmes G/FTO. A figura 4.17 mostra os perfis voltamétricos para diferentes concentrações de glicose para as medições US (figura 4.17(a)) e UI (figura 4.17(b)), e seus respectivos ΔE (figura 4.17(c) para US e (d) UI).

A medição US apresentou os mesmos perfis voltamétricos para todas as concentrações, com aumento gradativo das correntes em função do aumento das concentrações. Os picos de oxidação e redução sofreram um leve deslocamento.

Para as duas menores concentrações, de 5 e 40 mg/dL, os perfis voltamétricos foram iguais tanto para a medição US quanto para UI onde, com o aumento da concentração, os valores de correntes aumentaram. Além do mais, dois picos de redução podem ser vistos na medição UI para as concentrações acima de 40 mg/dL.

Na medição US, o uso continuado do filme em diferentes concentrações mostra o efeito memória em relação aos filmes medidos individualmente. Isso porque na medição US não é possível verificar os dois picos de redução nas concentrações acima de 40 mg/dL, sendo claramente perceptíveis na medição UI. Além do mais, o uso das enzimas nas superfícies promovem um aumento de corrente de no máximo 0,085 mA no pico de oxidação em US, enquanto que na medição UI, para a mesma concentração, a corrente alcança mais de 0,12 mA. O mesmo ocorre para os picos de redução, obviamente.

Figura 4.17: Perfis voltamétricos para os filmes G/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

Quando medimos a variação de potencial de oxidação com o de redução, temos os comportamentos demonstrados nas figuras 4.17(c) e (d), para as medições US e UI, respectivamente.

Para as concentrações de 80 e 120 mg/dL em US, as variações dos potenciais apresentaram os mesmos valores, aumentando expressivamente para 160 mg/dL e decaindo um pouco para 200 mg/dL. Lembrando que o aumento do ΔE indica que

a reação na superfície do filme/eletrólito está mais difícil de ocorrer, implicando na diminuição dos elétrons transferidos na superfície dos filmes. Já na medição UI, o comportamento dos dois picos de redução em função dos picos de oxidação foi praticamente o mesmo, indicando que nenhum dos dois processos de redução foram deslocados devido ao aumento da concentração. Ao olharmos os perfis voltamétricos das concentrações de 5 e 40 mg/dL (figura 4.17(b)), podemos perceber claramente que não há picos de redução, no entanto, há um “embarrigamento” do voltamograma no sentido da redução. Com o aumento da concentração, quando começam a aparecer os picos de oxidação, concomitantemente começam a aparecer o segundo pico de redução. Com isso, podemos acreditar que o par de oxirredução ocorre entre o pico de oxidação e o segundo pico de redução (E_2). Lembrando que os filmes quando medidos em dispositivos voltamétricos podem apresentar comportamentos somente de oxidação, somente de redução ou de ambos (ver seção 1.2).

Neste caso, a partir de uma determinada concentração (neste caso, a partir de 5 mg/dL) podemos notar um comportamento de filmes somente com redução (E_1), pois são picos que ocorrem desde a primeira medição. A partir do momento que os filmes começaram a sentir o par de oxirredução da solução, que neste caso ocorre a partir de 80 mg/dL, começaram a aparecer os picos de oxidação e de redução. O primeiro pico pode ser considerado existente em função do filme pois aparece desde a primeira medição, e o segundo pico pode ser considerado do par oxirredução pois aparece concomitantemente com o aparecimento do pico de oxidação, além de apresentar crescimento do valor da corrente com o aumento da concentração, como ocorre com os picos de oxidação. Os valores de correntes E_1 ocorreram devido às respostas dos filmes com a quantidade de cargas da solução. Com isso, está ocorrendo somente processo de redução na superfície dos filmes de FTO com glicose oxidase imobilizadas (G/FTO).

No caso da medição US, esses picos de redução não aparecem pois, quando se chega na medição com a concentração de 80 mg/dL, provavelmente toda a enzima imobilizada na superfície do filme já foi consumida, aparecendo somente os picos referentes ao par de oxirredução da solução.

4.2.2.2 G/AZO/SP/FTO

Diferente dos filmes de G/FTO, os voltamogramas dos filmes G/AZO/SP/FTO praticamente não apresentaram picos bem definidos nem de oxidação nem de redução, como mostra a figura 4.18.

Figura 4.18: Perfis voltamétricos para os filmes G/AZO/SP/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US, (b) UI e (c) ΔE em função da concentração de glicose para a medição US.

Na medição US a menor concentração praticamente não apresenta pico de redução, com um leve e extremamente discreto pico de oxidação em torno de 0,3 V.

Com o aumento da concentração começaram a aparecer leves picos de oxidação em torno de 0,6 V e picos extremamente sutis de redução em torno de -0,6 V. Para as concentrações de 40 a 120 mg/dL os voltamogramas foram praticamente iguais, com leve desvio de corrente na redução, mas mantendo os mesmos valores de correntes na oxidação. Ao aumentarmos a concentração para 160 mg/dL, o pico de oxidação ocorreu em torno de 0,07 V, com menor definição de pico, mantendo o pico de redução em torno de -0,6 V com valores de correntes menores. Já com 200 mg/dL de concentração, o perfil voltamétrico foi praticamente o mesmo de 160 mg/dL, mas com diminuição do pico de oxidação em corrente e em torno de 0,1 V.

Com isso, com o aumento da concentração os perfis voltamétricos foram levemente alterados. Para a menor concentração (de 5 mg/dL), praticamente não houve resposta. Com o aumento da concentração, entre 40 e 120 mg/dL, começaram a aparecer picos de oxidação e redução, no entanto não há diferenciação entre essas concentrações, como mostra a 4.18(c), pois os picos de redução ocorreram sempre no mesmo potencial, somente com alteração nos valores das correntes. Os ΔE mostram que a reação ocorre de forma mais dificultada nas concentrações de 40 à 120 mg/dL, apresentando menores valores de ΔE para as concentrações de 160 e 200 mg/dL.

Na medição UI, a figura 4.18(b) mostra comportamentos diferentes em função das concentrações. A concentração de 5 mg/dL não apresentou nenhum pico, enquanto que com o aumento de concentração para 40 mg/dL um leve pico de oxidação apareceu em torno de 0,6 V. Em 80 mg/dL também não houve picos nem de oxidação e nem de redução, enquanto que para 120 mg/dL ocorreram picos de oxidação em torno de 0,4 V e de redução em torno de -0,3 V. Para a concentração de 200 mg/dL, também apareceram picos de oxidação e de redução, em torno de 0,3 V e -0,02 V, respectivamente. Já para 160 mg/dL, o perfil voltamétrico foi totalmente diferente de todas as outras concentrações, apresentando um alto pico de oxidação em torno de -0,47 V. Com isso, não é possível a detecção da concentração pelos perfis voltamétricos apresentados e nem o cálculo dos ΔE s.

4.2.2.3 G/ITO

Os filmes G/ITO apresentaram perfis com características menos resistivas do que os filmes de G/FTO. A figura 4.19 mostra os perfis dos filme G/ITO

na medição US (figura 4.19(a)) e na medição UI (figura 4.19(b)) em função das diferentes concentrações.

(a) G/ITO - US

(b) G/ITO - UI

(c) ΔE - US (d) ΔE - UI

Figura 4.19: Perfis voltamétricos para os filmes de G/ITO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos

Em ambos os casos, a corrente aumentou com o aumento da concentração. No entanto, a medição UI apresentou um leve desvio dos valores dos potenciais de redução e de oxidação em função do aumento da concentração de forma linear (demonstrado em função do ΔE) enquanto que na medição US esses desvios possuem

um comportamento aleatório. Da mesma forma como ocorreu com o EGFET, onde os filmes de G/ITO responderam melhor para a medição UI (mas somente entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL), com respostas bem ruins na medição US.

4.2.2.4 G/AZO/SP/ITO

Ao trocarmos o substrato de FTO por ITO, os filmes G/AZO/SP/ITO apresentaram os seguintes resultados, como mostra a figura 4.20.

Figura 4.20: Perfis voltamétricos para os filmes G/AZO/SP/ITO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US, (b) UI e, (c) ΔE em função da concentração de glicose para as medição US. A linha vermelha é um guia para os olhos

A concentração de 5 mg/dL na medição US apresentou um pico de oxidação em torno de 0,66 V de baixa intensidade de corrente. Os voltamogramas referentes às concentrações de 40 e 80 mg/dL apresentaram picos iguais de oxidação em torno de 0,6 V e de maior intensidade de corrente em relação à 5 mg/dL. A partir de 120 mg/dL começaram a aparecer picos de redução. Em 120 mg/dL, os picos de oxidação e redução ocorreram em torno de 0,69V e -0,24 V, respectivamente. Já para 160 mg/dL, os picos ocorreram em torno de 0,67 V e -0,23 V, respectivamente, mas com intensidades de correntes maiores, enquanto que para 200 mg/dL, os picos ocorreram em torno de 0,67 V e -0,20 V, respectivamente, e com intensidades de correntes maiores ainda. Como não apareceram picos de redução para as concentrações menores não foi possível o cálculo da variação do potencial. Para as maiores concentrações, como mostra a figura 4.20(c), os ΔE s diminuíram linearmente com o aumento da concentração, indicando uma facilidade na reação. Devido ao aumento de glicose na solução, mais fácil fica de reagir com a glicose oxidase. Por isso os perfis voltamétricos das maiores concentrações ocorreram com intensidades de correntes maiores.

Na medição UI (figura 4.20(b)), as concentrações de 5 e 40 mg/dL apresentaram picos bem sutis de oxidação em torno de 0,65 V e 0,61 V, respectivamente. Para a concentração de 80 mg/dL, um pico de oxidação e um de redução apareceram em torno de 0,67 V e -0,26 V, respectivamente. Já para as concentrações maiores, os perfis voltamétricos apresentaram um comportamento mais resistivo e sem a presença de picos. Para 200 mg/dL os valores de correntes encontrados foram bem maiores do que para as outras concentrações. Os perfis encontrados entre os dois tipos de medição apresentaram comportamentos bem distintos, da mesma forma que ocorreu com os filmes testados com uréia, como mostrado na figura 4.12, onde na medição US os voltamogramas apresentaram picos de oxidação e redução enquanto que na medição UI, alguns voltamogramas apresentaram picos enquanto outros apresentaram o mesmo comportamento dos perfis encontrados pelas concentrações de 120 e 160 mg/dL da figura 4.20(b).

Portanto, os filmes FTO apresentaram respostas de interesse no EGFET entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, para ambas as medições. O mesmo ocorreu para os filmes U/FTO, mas em um intervalo de concentração menor, entre 5 e 80 mg/dL.

Isso indica que os biossensores produzidos com filmes de FTO não apresentam efeito memória muito significativo, podendo ser utilizado como biossensores em ambas as medições US e UI, sem grandes danos. Na voltametria, os filmes U/FTO apresentaram resultados satisfatórios para a medição UI, enquanto que para G/FTO, não houve padrão nas respostas dos ΔE s. Com isso, os filmes FTO apresentaram resultado de interesse principalmente como biossensor de ureia pela medição UI, para ambos EGFET e voltametria cíclica.

Para AZO/SP/FTO, ambos biossensores de ureia e glicose não apresentaram respostas de interesse pela voltametria cíclica, mas apresentaram melhora nas respostas pelo EGFET para ambos biossensores. Com isso, estudos mais detalhados desses filmes serão de interesse como biossensores de ureia e glicose utilizando dispositivo EGFET, mas descartados quando utilizados em voltametria cíclica.

Já para os filmes ITO, ambos biossensores apresentaram linearidade entre os ΔE s para os voltamogramas cíclicos medidos em UI, sem respostas de interesse pelas medições US. Tanto U/ITO quanto G/ITO apresentaram respostas melhores pela medição UI quando medidos com EGFET, com respostas muito ruins quando utilizada medição US. G/ITO apresentou sensibilidade muito alta entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL na medição UI com EGFET, enquanto que a mesma medição para U/ITO apresentou sensibilidade bem mais baixa entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. Logo, G/ITO apresentou respostas de interesse maior em comparação com U/ITO.

Por fim, os filmes AZO/SP/ITO apresentaram respostas opostas quando medidos no EGFET como biossensores de ureia, com sensibilidades altas para concentrações maiores na medição US e sensibilidade maiores nas concentrações menores na medição UI. Esse resultado demanda estudos futuros mais aprofundados. Já como biossensores de glicose, os filmes responderam com alta sensibilidade entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL na medição UI pelo EGFET, sem resposta de interesse na medição US, com oposto para voltametria cíclica, onde a medição US apresentou resultados melhores entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL enquanto que a medição UI não apresentou resultado de interesse. Com isso, os filmes U/AZO/SP/ITO necessitam de estudos mais aprofundados para ambas as medições, enquanto que G/AZO/SP/ITO somente apresentaram resultados de

interesse na medição UI, quando usados com dispositivo EGFET. Quando usados com voltametria cíclica, o oposto ocorreu para ambos os casos, também necessitando de estudos mais aprofundados futuramente.

Finalmente, como biossensores de ureia, os filmes U/AZO/SP/FTO responderam de forma mais satisfatória para medição US pelo EGFET, mas os filmes FTO apresentaram no total respostas mais coerentes em comparação com as medições US e UI para EGFET, com voltamogramas cíclicos corroborando com essas respostas. Como biossensores de glicose, tanto os filmes G/AZO/SP/FTO quando G/FTO apresentaram respostas de interesse quando medidos no EGFET, no entanto, os filmes G/AZO/SP/FTO apresentaram melhora para concentrações maiores em relação aos filmes de G/FTO. Na voltametria cíclica, para ambos filmes as respostas não foram de interesse.

ESTUDO DOS FILMES FINOS DE ÓXIDO DE TITÂNIO - TiO_2

Os filmes de óxido de titânio foram produzidos por diferentes rotas (Apêndice A). Da mesma forma que ocorreu com os filmes de AZO, a rota final utilizada foi chamada de Rota 04. Neste caso, a Rota 04 foi retirada da referência [86], e foi produzida a partir de uma solução etanólica 0,1 mol/L com sal oxiacetilacetato de titânio (IV) e 1% de Náfon[®].

As deposições foram realizadas utilizando as técnicas dip-coat, spin-coat e casting, em substratos de vidro hidrofílicos, ITO e FTO. Todos os filmes depositados com a Rota 04 foram ao forno por 1 hora a uma temperatura de 200 °C.

Os resultados foram separados por técnica de deposição.

5.1 Caracterizações elétricas

5.1.1 Spin-coat

- Substratos de vidro hidrofílicos

Utilizando a técnica de spin-coat, foram produzidos quatro filmes, sendo os dois primeiros com uma deposição e os dois próximos com 5 deposições. Após cada deposição os filmes descansaram por 5 minutos à temperatura ambiente para evaporação do solvente. Nenhum filme apresentou resposta.

- Substratos de ITO

Os mesmos números de deposições dos filmes depositados em substratos de

vidro hidrofílicos foram depositados sobre os substratos de ITO, isto é, dois filmes com 1 deposição e outros dois filmes com 5 deposições, com o mesmo pós-tratamento de 5 minutos para evaporação do solvente.

Ambos os filmes com 1 deposição não apresentaram respostas enquanto que somente 1 filme com 5 deposições apresentou resposta em função dos pHs. No entanto, o filme só responde de forma linear entre os pHs 2-5, obtendo-se uma sensibilidade de 31,7 mV/pH com r^2 de 0,94.

- Substratos de FTO

Da mesma forma, três filmes foram depositados com 1 deposição e mais três com 5 deposições. A figura 5.1 mostra os resultados dos filmes com 1 deposição, onde foi chamado de $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ (lembrando a nomenclatura sempre começa com o óxido, seguida da técnica de deposição utilizada, neste caso spin-coat, o subscrito é a quantidade de deposições realizadas, e por último o substrato). A tabela 5.1 mostra os resultados dos filmes individualmente, além da média. “Faixa de pH” significa a faixa de valores de pHs em que os filmes respondem de forma linear.

	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r^2
Média	2-4	90,9	0,98
	4-8	30,2	0,95
Filme 1	2-6	52,1	0,98
	6-8	22,3	0,97
Filme 2	2-6	75,5	0,97
Filme 3	2-5	12,87	0,99
	6-8	24,45	0,82

Tabela 5.1: Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares para diferentes faixas de pHs da média dos filmes $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ produzidos com a Rota 04 e de cada filme individualmente.

Com isso, os filmes $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ apresentaram como sensibilidade média valores muito altos entre as faixas de pHs de 2 a 4 com barras de erros relativamente baixas seguido de 31 mV/pH entre os pHs 4 e 8, ainda com barras de erros muito pequenas.

Figura 5.1: V_{ref} x pH dos filmes $TiO_2/SC_1/FTO$ com a Rota 04. Valor de sensibilidade de 90,95 mV/pH entre os pHs 2-4 (linha preta sólida), e de 30,98 mV/pH entre os pHs 4-8 (linha preta pontilhada).

Individualmente, os filmes apresentaram em sua maioria respostas entre os pHs 2 ao 6, com sensibilidades altas.

A figura 5.2 mostra o resultado para os filmes com 5 deposições. O filme foi chamado de $TiO_2/SC_5/FTO$.

O padrão de respostas tanto para os filmes com 1 deposição ou para os filmes com 5 deposições foram exatamente os mesmos, onde os filmes respondem de forma linear entre os pHs 2-4 e entre os pHs 4-8, com diminuição expressiva da inclinação em função do aumento das deposições, além do aumento nas barras de erros. Os valores das sensibilidades para os filmes com 5 deposições foram muito abaixo dos valores das sensibilidades para os filmes com 1 deposição. Com isso, os filmes $TiO_2/SC_1/FTO$ responderam de forma mais eficaz.

5.1.2 Dip-coat

- Substratos de vidro hidrofílicos

Da mesma forma, quatro filmes foram feitos utilizando a técnica de dip-coat, sendo dois com 1 deposição e dois com 5 deposições, com o mesmo processo

Figura 5.2: V_{ref} x pH dos filmes $TiO_2/SC_5/FTO$ com a Rota 04. Valor de sensibilidade de 49,1 mV/pH e r^2 de 0,94 entre os pHs 2-4 (linha preta sólida) e de 9,5 com r^2 de 0,97 mV/pH entre os pHs 4-8 (linha preta pontilhada).

de descanso dos filmes por 5 minutos à temperatura ambiente após cada deposição. Além do mais, outros dois filmes foram depositados com 1 e 5 deposições, respectivamente, mas sem o descanso para evaporação do solvente. Nenhum dos seis filmes apresentaram respostas.

- Substratos de ITO

O mesmo foi feito em substratos de ITO, onde dois filmes foram depositados com 1 deposição e dois com 5 deposições, mantendo-se sempre o pós-tratamento de 5 minutos à temperatura ambiente. Ambos os filmes com 1 deposição apresentaram respostas com sensibilidades de 15 mV/pH na faixa de pHs de 3-7 ($r^2 = 0,95$) e 18 mV/pH na faixa de pHs de 2-7 ($r^2=0,96$), respectivamente, enquanto que os filmes com 5 deposições não apresentaram seletividade dos pHs.

- Substratos de FTO

Primeiro foram feitos filmes com 1 e 5 deposições como os descritos acima, mas estes não apresentaram respostas. Com isso, os filmes foram refeitos

sem o tempo de descanso por 5 minutos à temperatura ambiente, isto é, as deposições foram realizadas sequencialmente. Quatro filmes foram depositados com 1 deposição e três com 5 deposições. A figura 5.3 mostra o resultado médio dos filmes depositados com 1 deposição em substratos de FTO (chamados de $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$) e a tabela 5.2 mostra os resultados individuais e a média por faixa de pHs.

Figura 5.3: $V_{ref} \times \text{pH}$ da média dos filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ com a Rota 04. Sensibilidade de 39,7 mV/pH e r^2 de 0,85 entre os pHs 2-5 (linha preta sólida) e de 12,5 mV/pH e r^2 de 0,99 entre os pHs 5-8 (linha preta pontilhada).

Já a figura 5.4 mostra o resultado médio dos filmes com 5 deposições e a tabela 5.3 mostra além da média os resultados individuais. Os filmes depositados com 5 deposições em média apresentaram pouca seletividade entre os pHs 4 e 5 e entre os pHs 7 e 8. Os filmes foram nomeados como $\text{TiO}_2/\text{DC}_{5-1}/\text{FTO}$. O número 1 seguido do número de deposições se refere ao tempo de forno.

Os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ possuem barras de erros muito menores que os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_{5-1}/\text{FTO}$. Percebeu-se durante a produção dos filmes com 5 deposições que estes ficavam muito espessos. Com isso, resolveu-se tentar reproduzir os filmes com 5 deposições mas com 4 horas de forno a 200 °C ao invés de somente 1 como feito para todos os filmes. O intuito foi verificar se os filmes estavam secando

	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r^2
Média	2-5	39,7	0,85
	5-8	12,5	0,99
Filme 1	2-5	39,2	0,99
	5-7	18,9	0,98
Filme 2	3-7	33,5	0,99
Filme 3	2-5	34,5	0,95
Filme 4	3-5	48,5	0,98
	5-8	18,4	0,99

Tabela 5.2: Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares para diferentes faixas de pHs da média dos filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ com a Rota 04 e individualmente.

Figura 5.4: $V_{ref} \times \text{pH}$ da média dos filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_{5-1}/\text{FTO}$ com a Rota 04. Sensibilidade de 25,5 mV/pH entre os pHs 2-8.

	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r^2
Média	2-8	25,5	0,94
Filme 1	5-7	50,0	0,97
Filme 2	2-7	30,3	0,99
Filme 3	2-4	45	1,00

Tabela 5.3: Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares para diferentes faixas de pHs da média dos filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_{5-1}/\text{FTO}$ com a Rota 04 e dos resultados individuais.

corretamente devido à alta espessura com somente 1 hora de forno. Para isso, também foram produzidos filmes com 1 deposição e 4 horas de forno.

Os filmes com 1 deposição e 4 horas de forno apresentaram uma grande piora nos resultados em relação aos filmes com 1 deposição e 1 hora de forno. As respostas não apresentaram padrão de linearidade com sensibilidade média de 27,6 mV/pH e r^2 de 0,90. Já os filmes com 5 deposições e 4 horas de forno, chamados de $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ melhoraram muito a resposta em comparação com os outros filmes com o mesmo número de deposições mas com 1 hora de forno ($\text{TiO}_2/\text{DC}_{5-1}/\text{FTO}$). A figura 5.5 mostra estes resultados.

Figura 5.5: $V_{ref} \times \text{pH}$ da média dos filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ com a Rota 04 com 4 horas de forno a 200 °C. Sensibilidade de 37,9 mV/pH entre os pHs 2-8.

Com isso, os filmes depositados com 1 deposição apresentaram maior sensibilidade entres os pHs 2 a 5, enquanto que os filmes com 5 deposições apresentaram linearidade entre os pHs 2 ao 8. Devido a maior espessura dos filmes com 5 deposições, estes, quando curados por 4 horas ao invés de somente 1 apresentaram respostas melhores.

5.1.3 Casting

- Substratos de vidro hidrofílicos

Para o casting também foram depositados dois filmes, um com 1 deposição e outro com 5 deposições, com o mesmo pós-tratamento de descanso dos filmes por 5 minutos. Não apresentaram respostas.

- Substratos de ITO

Para a técnica de deposição casting, houve uma alteração nos números de deposições devido aos testes anteriores não terem apresentados nenhum resultado para esta técnica.

Com isso, foram realizados filmes de 1 até 8 deposições. Os resultados foram resumidos na tabela 5.4.

Deposições	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r ²	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r ²
1	3-8	23,6	0,95	—	—	—
2	3-7	39,01	0,93	—	—	—
3	2-5	54,25	0,95	5-8	5,03	0,31
4	3-6	28,51	0,96	—	—	—
6	3-7	24,24	0,93	—	—	—
7	2-4	52,5	0,93	4-6	9,5	0,95
8	—	—	—	—	—	—

Tabela 5.4: Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares por faixa de pH para os filmes depositados por casting pela Rota 04 em substratos de ITO com 1 a 8 deposições.

Os filmes com diferentes números de deposições responderam em faixas de pHs diferentes. O filme com 5 deposições não apresentou resposta enquanto que o filme com 8 deposições não apresentou seletividade aos valores de pHs. Não foi encontrado um padrão de respostas em função do número de deposições.

- Substratos de FTO

Da mesma forma que feito em substratos de ITO, filmes de 1 a 8 deposições foram depositadas em substratos de FTO.

Primeiro, haviam sido produzidos filmes de 1 a 5 deposições em substratos de FTO e depois foram reproduzidos aumentando até 8 deposições. Os 5 primeiros

foram chamados de c1-c5 e os últimos de c1*-c8*, para diferenciação. Os resultados foram demonstrados na tabela 5.6.

Deposições	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r ²	Faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	r ²
c1	2-3	100,3	—	4-8	23,7	0,99
c2	2-4	65,6	0,99	5-8	8,4	0,94
c3	2-5	44,9	0,98	5-8	2,7	0,84
c4	2-6	35,5	0,99	6-8	13,5	0,99
c5	2-4	11,1	0,99	6-8	61,5	0,84
c1*	—	—	—	—	—	—
c2*	2-3	112	—	4-8	20,2	0,80
c3*	2-4	91,5	0,88	4-8	6,3	0,77
c4*	2-6	41,8	0,99	6-8	13,0	0,98
c5*	2-4	28,5	0,84	5-7	12,5	0,54
c6*	2-5	36,0	0,90	—	—	—
c7*	2-4	14,0	0,60	4-8	6,8	0,83
c8*	2-3	70,0	—	3-8	20,9	0,97

Tabela 5.5: Valores das sensibilidades e dos ajustes lineares por faixa de pH para os filmes depositados por casting pela Rota 04 em substratos de FTO com 1 a 5 deposições (c1-c5) e com 1 a 8 deposições (c1*-c8*).

Quando o filme com 1 deposição foi refeito (c1*) este apresentou uma linearidade muito baixa entre os pHs 3-8, com sensibilidade de de 9,6 mV/pH em r² de somente 0,40.

A figura 5.6 mostra o chamado “ponto de alteração em função das deposições”. Os filmes apresentaram diferentes faixas lineares de pHs, e o ponto de alteração é o valor do pH que houve a quebra da linearidade para outra faixa de pH.

Os filmes com 1 deposição não foram reprodutíveis, enquanto os filmes com 2 e 3 deposições apresentaram faixas de respostas com pontos de alterações diferentes, não apresentando reprodutibilidade também. Os filmes com 4 e 5 deposições apresentaram exatamente os mesmos pontos de alteração, nos pHs 6 e 4, respectivamente, no entanto, para os filmes com 5 deposições as sensibilidades foram bem diferentes com ajustes lineares diferentes, enquanto que os filmes com 4 deposições apresentaram respostas mais parecidas.

Figura 5.6: Ponto de alteração da linearidade por faixa de pH em função do número de deposições realizadas por casting pela Rota 04 em substratos de FTO.

Os filmes com deposições entre 5 e 7 apresentaram os mesmos pontos de alteração (no pH 04), sendo que para os pHs após o ponto de alteração os ajustes lineares foram muito baixos, demonstrando que os filmes não respondem como esperado para os pHs 4 a 8. Já o filme com 8 deposições respondeu em uma faixa maior de pHs, entre 3 e 8, mas com sensibilidade de somente 20,9 mV/pH.

Com isso, os filmes com 4 deposições foram os que apresentaram os melhores resultados devido a reprodutibilidade, com sensibilidades maiores entre os pHs ácidos e sensibilidades menores entre os pHs básicos. Os filmes com deposições de 1 a 3 não apresentaram reprodutibilidade alguma, com resultados bem diferentes entre eles. E o filme com 8 deposições foi o que respondeu em uma faixa maior de pHs, do 3 ao 8. Com isso, o filme considerado como o melhor para uso em sensores de pHs em dispositivo EGFET pela técnica de deposição casting foi o filme com 4 deposições em substrato de FTO e por isso testados por voltametria cíclica. Os filmes com 1 e 8 deposições também foram testados por voltametria cíclica para efeito de comparação, pois foram os filmes que apresentaram respostas na maior faixa de pHs com ajustes lineares altos. Estes filmes foram nomeados como $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$, para 1, 4 e 8 deposições respectivamente.

Portanto, todos os filmes depositados em substratos de FTO responderam melhor em comparação aos filmes depositados em substratos de vidro hidrofílico e ITO. Para a técnica de spin-coat, ambos os filmes $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$ responderam iguais nas mesmas faixas de pHs, no entanto os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ apresentaram barras de erros muito grandes com sensibilidades menores. Com isso, os filmes com 1 deposição apresentaram maior interesse como sensores de pHs depositados por spin-coat. No entanto, para efeito de comparação, ambos foram testados por voltametria cíclica.

Já para a técnica de dip-coat, os filmes com 5 deposições foram considerados de maior interesse em comparação aos filmes com somente 1 deposição, mas com alteração do tempo de cura de 1 para 4 horas ($\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$). Da mesma forma que feita para as técnicas anteriores, todas as análises feitas em voltametria cíclica, caracterizações morfológicas e testes com imobilização de proteínas foram realizadas com os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$, e com os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ para efeito de comparação. Os filmes com 1 deposição e 1 hora de forno também foram analisados para comparação. Os filmes com 1 deposição com 4 horas de forno e $\text{TiO}_2/\text{DC}_{5-1}/\text{FTO}$ foram descartados a partir deste ponto.

5.1.4 Voltametria Cíclica

As voltametrias serão demonstradas por ordem de técnica de deposição, como feito acima.

A figura 5.7 mostra os voltamogramas dos filmes produzidos por spin-coat com 1 deposição ($\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$) em função dos diferentes valores de pHs.

Basicamente não há picos definidos de oxidação e nem de redução, mesmo com o par de ferro nas soluções. Os perfis gerados indicam que os filmes são mais resistivos que somente os filmes de FTO. Como não há picos de oxirredução não foi possível calcular os ΔE s e consequentemente os números de elétrons transferidos (n). As áreas totais dos voltamogramas diminuíram com o aumento do pH. Mesmo não havendo picos podemos perceber que os valores de correntes diminuem com o aumento do pH. Os maiores valores de correntes ocorreram para os pHs 2 a 4, onde para os pHs 5 a 8 os perfis são extremamente resistivos com o praticamente os mesmos valores de correntes. Esse resultado corrobora os resultados obtidos no

Figura 5.7: Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$.

EGFET, onde os filmes $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ responderam linearmente com sensibilidade muito maior entre os pHs 2 e 4, e linearmente entre os pHs 4 e 8, com sensibilidades muito menores (vide figura 5.1).

Já a figura 5.8 mostra os perfis voltamétricos dos filmes $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$.

Apenas com o aumento do número de deposições, os perfis voltamétricos já apresentaram alterações significativas em comparação com os filmes com 1 deposição. Os picos de oxidação e redução já aparecem de forma mais nítida, podendo assim construir a figura 5.8(b), que mostra que não há um comportamento linear em função do pH, como ocorreu com o filme de FTO (vide figura 4.9(b)). Os valores de ΔE diminuíram com o aumento do pH, indicando uma facilidade da reação, com maior número de elétrons transferidos, sendo o contrário da resposta obtida pelo EGFET, onde para os pHs 2 a 4 os filmes apresentaram uma sensibilidade altíssima, com sensibilidade menor entre os pHs 4 a 8. Com isso, os filmes com 5 deposições não apresentaram respostas de interesse em relação a sensibilidade dos diferentes valores de pHs.

Os filmes produzidos por dip-coat apresentaram perfis voltamétricos como apresentados na figura 5.9, onde podemos perceber que para o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$

Figura 5.8: (a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs e (b) ΔE em função dos pHs, para o filme $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$.

não ocorreu nem picos de redução e nem de oxidação (figura 5.9(c)) enquanto que para o filme com $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ os picos ocorreram, mas de forma bem sutis (figura 5.9(a)). A figura 5.9(b) mostra o ΔE do filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$.

Ambos os filmes com 1 e 5 deposições não apresentaram respostas de interesse para uso como sensores de pH. Isso porque não foi possível correlacionar os ΔE s com os pHs, quando houveram picos, como no caso de $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$.

Considerando agora os filmes produzidos por casting, a figura 5.10 mostra os perfis voltamétricos em função dos diferentes valores de pHs para os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (figuras 5.10(a), (b) e (c), respectivamente). A figura 5.10(d) mostra a comparação dos perfis voltamétricos em função do número de deposições depositadas para o mesmo valor de pH (neste caso, para o pH 02).

O filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ apresentou picos de oxidação e de redução somente para o pH 02, enquanto que para os outros valores de pHs só ocorreram picos de oxidação, como pode ser verificado na figura 5.10(a). Com isso, não foi possível o cálculo do ΔE .

Já o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ apresentou perfis com valores maiores de correntes, com picos de oxidação e redução para todos os valores de pHs, e com

(a) Dip-coat – 1 deposição

(b) ΔE – 1 deposição

(c) Dip-coat – 5 deposições

Figura 5.9: (a) Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs do filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$, (b) ΔE em função dos pHs para o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ e (c) perfis voltamétricos em função dos valores de pHs para o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$.

deslocamento dos picos em função dos valores de pHs, como mostra a figura 5.10(b). Por fim, o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ apresentou picos discretos de oxidação com picos mais definidos de redução, como mostra a figura 5.10(c). Os valores de correntes alcançados pelo filme com 8 deposições foram muito baixos.

A figura 5.10(d) mostra a comparação dos perfis voltamétricos para um pH fixo (pH 02) em função do número de deposições depositadas. Podemos ver que os

(a) Casting – 1 deposição

(b) Casting – 4 deposições

(c) Casting – 8 deposições

(d) Comparação entre 1, 4 e 8 deposições no pH 02

Figura 5.10: Perfis voltamétricos em função dos valores de pHs dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, (b) $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$, (c) $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ e (d) comparação entre os perfis voltamétricos no pH 02 em função do número de deposições.

valores de correntes entre os filmes variam fortemente. Para o filme com 4 deposições, além dos picos com maiores valores de correntes, o filme apresentou maior definição tanto na oxidação quanto na redução. A figura 5.11 mostra o comportamento dos ΔE s em função dos pHs para os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$.

Para o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ os valores de ΔE aumentam com o aumento do pH, indicando que a reação na superfície do filme está sendo dificultada, enquanto

Figura 5.11: ΔE em função dos pHs para os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (quadrados pretos) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (círculos vermelhos).

que para o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ os valores de ΔE praticamente não variaram em função dos pHs.

Esse resultado corrobora os resultados obtidos pelo EGFET, onde os filmes com 4 deposições apresentaram resultados em função da seletividade dos pHs, com seletividade menor entre os pHs básicos (vide tabela 5.6), enquanto que $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ apresentou uma seletividade muito menor em função dos pHs.

Com isso, os resultados obtidos por voltametria cíclica corroboraram os resultados apresentados por EGFET. Comparando as três técnicas testadas, o filme que apresentou melhor resultado como sensor de pH utilizando voltametria cíclica, com seletividade dos valores de pHs, foi o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$, enquanto que para o EGFET, o filme que apresentou melhor resultado foi o $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$, com sensibilidade em torno de 38 mV/pH entre os pHs 2 a 8.

5.2 Caracterizações Morfológicas e Estruturais

As caracterizações morfológicas e estruturais foram realizadas para os mesmo filmes testados em voltametria cíclica.

5.2.1 Microscopia Eletrônica por Varredura - MEV

A primeira caracterização realizada foi a microscopia eletrônica por varredura (MEV) dos filmes. A figura 5.12 mostra as imagens das espessuras dos filmes produzidos por spin-coat.

Figura 5.12: *Imagens das espessuras dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$*

O filme $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ possui uma espessura em torno de 616 nm enquanto que o filme $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$ possui uma espessura de 1144 nm (ou 1,114 μm). Já a figura 5.13 mostra a superfícies dos filmes.

Figura 5.13: *Imagens das superfícies dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$*

Enquanto $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ apresenta uma superfície mais granulosa, $\text{TiO}_2/\text{SC}_5/\text{FTO}$ apresenta uma superfície bem mais lisa. No entanto, pedaços mais

altos podem ser encontrados espalhados por toda a sua superfície, como mostra a figura 5.13(b).

A figura 5.14 mostra as imagens da espessura dos filmes depositados por dip-coat, enquanto que a figura 5.15 mostra as superfícies.

Figura 5.14: *Imagens das espessuras dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$.*

Figura 5.15: *Imagens das superfícies dos filmes (a) $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ e (b) $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$.*

Os filmes depositados por dip-coat, como já discutido anteriormente, se formam com espessuras maiores. $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ apresentou uma espessura de 997 nm enquanto que $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ apresentou uma espessura de no mínimo 6469 nm ($6,469 \mu\text{m}$). Ambos os filmes apresentaram superfícies com rachaduras muito grandes. O fato dos filmes ficarem muito espessos acabam por rachar durante a cura no forno, fazendo com que toda a superfície dos filmes se tornem quebradiças. Isso com certeza interfere muito nos resultados como sensores de pH, pois não podemos

controlar o tamanho dessas rachaduras, além da alta espessura, fazendo com que a superfície que entra em contato com a solução possua tamanhos diferentes para cada filmes, alterando drasticamente o número de sítios ativos por superfície de cada filme. Com isso, os resultados dos filmes produzidos por dip-coat geralmente não apresentaram reprodutibilidade.

A figura 5.16 mostra as imagens das espessuras e das superfícies dos filmes depositados por casting.

Figura 5.16: Imagens das (a) espessuras dos filmes (I) $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, (II) $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e (III) $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$, e das (b) superfícies dos filmes (IV) $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, (V) $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e (VI) $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$.

O filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ apresentou uma espessura em torno de 640 nm, com superfície lisa com pequenos grânulos. Já $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ apresentou espessura em torno de 5690 nm (5,690 μm) com superfície mais granulosa. O filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ apresentou uma espessura menor que o filme com 4 deposições,

em torno de 4426 nm ($4,426 \mu\text{m}$) com superfície mais lisa, no entanto, com grânulos espalhados por toda a superfície.

Com isso, o filme com 1 deposição possui a superfície mais lisa, enquanto o filme com 4 deposições (que foi o que apresentou melhor resposta em função do pH) apresentou a superfície mais rugosa. No entanto, mesmo com alta rugosidade, a superfície não apresentou grandes fissuras como ocorreu com os filmes produzidos por dip-coat, e por isso, a resposta em função do pH não foi prejudicada.

5.2.2 Difratomogramas de Raios-X - DRX

A figura 5.17 mostra os picos dos filmes produzidos por spin-coat (figura 5.17(a)) e dip-coat (figura 5.17(b)).

Figura 5.17: Difrátograma dos filmes produzidos por: (a) spin-coat e (b) dip-coat, com 1 deposição (linhas pretas) e 5 deposições (linhas vermelhas).

As relações entre os picos estão demonstradas na tabela 5.6

Pela figura 5.17(a) podemos perceber que a intensidade dos picos relativos aos filmes depositados por spin-coat diminuem com o aumento de deposições realizadas, sendo que para o filme TiO₂/SC₅/FTO, o pico em (110) não aparece mais. Pela tabela 5.6 podemos ver que as intensidades dos picos do filme TiO₂/SC₅/FTO em relação as intensidades dos picos do filme TiO₂/SC₁/FTO decrescem no mínimo 47%, alcançando até 77%. Já com os filmes depositados por dip-coat, o oposto

2θ	(hkl)	Spin - relação (%)	Dip - relação (%)	[ref]
17°	(112)	–	0	[126]
26°	(110)	–	–	[127, 128, 129]
34°	(101)	-66,5	+274	[107, 108]
38°	(004)	-69,3	+286	[127, 128, 129]
51°	(211)	-75,1	+196	[108]
55°	(211)	-73,8	–	[127, 128, 129]
62°	(310)	-47,5	+118	[108]
64°	(310)	-59,4	–	[128]
65°	(301)	-77,0	–	[108]

Tabela 5.6: Relação percentual entre os picos dos filmes com 1 e 5 deposições depositados por spin-coat e dip-coat em função de 2θ .

ocorre, onde os picos tem suas intensidades aumentadas com o aumento do número de deposições realizadas (5.17(b)), alcançando até 286% de aumento na intensidade, além do aparecimento de um pico em (112) de mesma intensidade para ambos os filmes. O filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ apresentou todos os valores de picos expostos na tabela 5.6, no entanto, o filme $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ não apresentou diversos picos, como (110), (211), (310) e (301).

A figura 5.18 mostra a comparação entre as intensidades dos picos dos filmes produzidos por casting (figura 5.18(a)) e a comparação entre os filmes com 1 deposição de cada técnica de deposição utilizada (figura 5.18(b)).

A tabela 5.7 mostra a relação em porcentagem dos picos em função do número de deposições, onde 4/1 significa que a razão entre os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, 8/4 a razão entre os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e 8/1 a razão entre os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$.

O filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ não apresentou os picos (110), (211), (310) e (301). O filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ somente não apresentou o pico (310) e o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ apresentou todos os picos. Para todos os filmes a intensidade aumentou com o aumento do número de deposições.

A figura 5.19 mostra os picos tanto para o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ quanto para o filme de FTO, para efeito de comparação.

Podemos perceber que os picos são praticamente os mesmos, havendo somente um pico exclusivo do filme de $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (vide seta preta na figura 5.19,

Figura 5.18: (a) Difratogramas dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (linha verde) e (b) comparação entre os difratogramas dos filmes com 1 deposição produzidos por spin-coat (linha preta), dip-coat (linha vermelha) e casting (linha verde).

2θ	(hkl)	4/1 - (%)	8/4 - (%)	8/1 - (%)	[ref]
17°	(112)	+171	+96	+433	[126]
26°	(110)	—	+138	—	[127, 128, 129]
34°	(101)	+108	+33	+178	[107, 108]
38°	(004)	+174	+53	+319	[127, 128, 129]
51°	(211)	+127	+88	+329	[108]
55°	(211)	—	+35	—	[127, 128, 129]
62°	(310)	+56	+124	+251	[108]
64°	(310)	—	—	—	[128]
65°	(301)	—	+201	—	[108]

Tabela 5.7: Relação percentual entre os picos dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$, $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ em função de 2θ .

referente ao pico (112)) e somente dois picos exclusivos do filme FTO (setas vermelhas, referentes aos picos (111) e (210)). No entanto, é largamente encontrado na literatura vigente que os picos ocorrem tanto para óxidos de titânio quanto para filmes de óxidos de estanho (“base” do FTO). A grande diferença encontrada entre os picos para ambos os materiais está na intensidade desses picos, onde para o SnO_2

Figura 5.19: Comparação entre os difratogramas do filme $TiO_2/CA_8/FTO$ (linha preta) e do filme FTO (linha vermelha).

os picos são muito mais intensos [108, 107, 130, 129, 127, 128, 126] (vide anexos). Na própria literatura podemos encontrar na mesma figura os difratogramas dos óxidos de estanho e de titânio com os picos apresentando os mesmos valores mas com intensidades diferentes [131].

As relações das intensidades para os picos que coincidem para FTO e $TiO_2/CA_8/FTO$ estão demonstradas na tabela 5.8.

2θ	(hkl)	Intensidade (u.a) FTO	Intensidade (u.a) $TiO_2/CA_8/FTO$	FTO/ $TiO_2/CA_8/FTO$ - (%)
26	186	44	+322	(110)
34	163	45	+262	(101)
38	277	77	+259	(004)
51	329	85	+287	(211)
62	83	26	+219	(310)
65	58	19	+205	(301)

Tabela 5.8: Relação percentual entre os picos do filme $TiO_2/CA_8/FTO$ com o filme FTO em função de 2θ .

Pela tabela 5.8 podemos perceber que os picos do filme de FTO tem um

aumento de intensidade de no mínimo 220% em relação aos picos dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$. Mesmo se compararmos ao filme produzido por $\text{TiO}_2/\text{SP}_1/\text{FTO}$, que apresentou picos de maiores intensidades entre todas as técnicas de deposição testadas, as intensidades dos picos referente ao filme de FTO ainda são muito maiores (a escolha da comparação entre o FTO e o filme produzido por casting ao invés do filme produzido por spin se deve ao filme produzido por casting apresentar todos os picos inclusive o (112) enquanto que o filme produzido por spin não apresenta). Utilizando a mesma sequência dos picos na tabela 5.8 os aumentos percentuais em relação aos picos do filme com 1 deposição realizada por spin foram de: 588%, 82%, 181%, 98%, 144% e 205%. Considerando que entre todos os filmes de TiO_2 o FTO ainda apresenta um aumento de intensidade dos picos de no mínimo 82% podemos concluir que os resultados encontrados seguem os resultados da literatura vigente, sendo que os picos apresentados podem ser considerados dos filmes de TiO_2 e não somente do filme de FTO usado como substrato.

Os filmes depositados por spin-coat apresentaram as maiores intensidades de picos, que somados à pequena espessura demonstrada na figura 5.12 podemos dizer que estes filmes ficaram tão finos que a resposta do substrato pode estar sobreposta à resposta do filme, justificando a alta intensidade dos picos em comparação com as outras técnicas de deposição. Os filmes depositados por dip-coat foram tão espessos e com tantas fissuras (vide figura 5.14) que o aumento de deposições diminuiu a intensidade dos picos, enquanto que os filmes produzidos por casting, mesmo com espessuras largas, não apresentaram fissuras, sendo filmes com superfícies mais uniformes (vide figura 5.16), com isso, com o aumento de deposições as intensidades dos picos referentes ao TiO_2 aumentaram expressivamente.

Os picos (110), (004) e (310) se referem ao titânio na forma de rutilo, segundo referência JCPDS 88-1175 [127, 128], enquanto que o pico (211) pode ser tanto da fase rutilo quanto anatase [127], segundo as referências JCPDS 84-1286 e anexos. O pico (031) poderia se referir à fase brookita [132, 133], no entanto é muito comum a produção de filmes mistos anatase e rutilo [134], mas com brookita a produção se torna mais difícil além de não apresentar mais nenhum pico referente à essa fase. Portanto, conclui-se que os filmes produzidos possuem fases mistas de anatase e rutilo.

5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

A figura 5.20 mostra a comparação dos espectros de absorbância dos filmes produzidos por casting com 1, 4 e 8 deposições, com o filme de FTO e com o etanol.

Figura 5.20: Espectro de absorbância (FTIR) dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (linha verde), do filme de FTO (linha azul pontilhada) e do etanol (linha rosa pontilhada - * retirada da referência [14]).

A figura 5.21 é um aumento da figura 5.20 entre as faixas de comprimento de onda de 3400 a 2600 cm^{-1} (figura 5.21(a)) e entre 1800 a 600 cm^{-1} (figura 5.21(b)), para melhor visualização das bandas de absorbância.

Podemos ver pela figura 5.21(a) que somente o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ demonstrou pequenas bandas nas regiões em torno de 2925 cm^{-1} , presente no etanol [14], e 2851 cm^{-1} , levemente apresentado pelo filme de FTO. Os filmes produzidos por casting com 4 e 8 deposições não apresentaram banda alguma nessa região do espectro, provavelmente pela maior espessura em relação ao filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$. Já na região entre 1800 e 600 cm^{-1} , os filmes produzidos por casting apresentaram bandas mais intensas com diminuição dessa intensidade com o aumento de deposições. Nenhuma dessas bandas foram apresentados pelo filme de FTO.

Figura 5.21: Aumento da figura 5.20 dos espectros de absorvância dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ (linha verde), do filme de FTO (linha azul pontilhada) e do etanol (linha rosa pontilhada) nas regiões (a) 3400 a 2600 cm^{-1} e (b) 1800 a 600 cm^{-1} .

Figura 5.22: Espectros de absorvância na região entre 1700 e 600 cm^{-1} dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ (linha verde).

Ligações Ti-O ocorrem em torno de 500 a 600 cm^{-1} [135, 136] e Ti-O-Ti em torno de 400 a 800 cm^{-1} [137, p. 85]. Em torno de 3400 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} podemos

perceber a presença de grupos referente à interação $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ [138]. Em torno de 1200 cm^{-1} podemos ver bandas muito intensas. Essas bandas foram relatados na literatura como pertencentes ao grupo -OH em filmes de TiO_2 [139]. Em torno de $982\text{-}962\text{ cm}^{-1}$ estão as bandas referentes ao Náfon[®] [140].

A figura 5.22 mostra a comparação dos espectros de absorbância dos filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ (linha preta), $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ (linha vermelha) e $\text{TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$ (linha verde).

Podemos perceber que o filme $\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ apresenta picos mais intensos para os grupos -OH, Náfon[®] e Ti-O.

Portanto, quanto as caracterizações morfológicas, todos as técnicas apresentaram resultados coerentes com os encontrados na literatura vigente. Os filmes produzidos por dip-coat e por casting apresentaram espessuras bem maiores quando comparados com os filmes depositados por spin-coat. Os filmes depositados por dip-coat apresentarm superfícies com muitas ranhuras, piorando a qualidade dos filmes e a reprodutibilidade. Quase nenhum filme apresentou resultado satisfatório quanto a voltametria cíclica, exceto $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$. Para os estudos feitos com uso do dispositivo EGFET, os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ apresentaram melhor resultado como sensor de pH. Mas no geral, devido a melhor reprodutibilidade e aos resultados do EGFET corroborarem os resultados da voltametria cíclica, os filmes $\text{TiO}_2/\text{CA}_4/\text{FTO}$ foram os que apresentaram melhor comportamento como sensores de pH, com grande interesse em estudos futuros mais detalhados.

BIOSSENSORES DE UREIA E GLICOSE UTILIZANDO FILMES DE TiO_2

6.1 Biossensor de ureia

DA mesma forma que foi realizado para os filmes do Capítulo 4 com os filmes AZO, as superfícies dos filmes de TiO_2 foram imobilizadas com urease e as medições realizadas em diferentes concentrações de ureia.

6.1.1 EGFET

6.1.1.1 Spin-coat

A figura 6.1 mostra os resultados para os filmes $\text{U/TiO}_2/\text{SC}_1/\text{FTO}$.

Quando medidos na forma US, os filmes apresentaram um aumento linear do módulo do ΔV para duas faixas diferentes de concentração, sendo a primeira entre 40 e 120 mg/dL, com sensibilidade em torno de 0,78 mV/(mg/dL), e a segunda entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, com sensibilidade em torno de 0,15 mV/(mg/dL). Essa segunda faixa linear apresentou um aumento expressivo nas barras de erros. Entre 5 e 40 mg/dL, basicamente não houve alteração dos valores dos ΔV s, indicando que o filme não sentiu diferença alguma entre essas duas concentrações, apresentando sensibilidade à concentração somente a partir de 40 mg/dL.

Para UI, os filmes não apresentaram um padrão de respostas apropriado, com valores de ΔV aleatórios para as diferentes concentrações, apresentando um aumento somente entre 5 e 40 mg/dL. Exceto para 40 e 120 mg/dL, os valores dos ΔV s foram próximos aos da medição US.

Figura 6.1: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/SC₁/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,78 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL e 0,15 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Quando medido como sensor de pH, o filme TiO₂/SC₁/FTO apresentou maior sensibilidade entre os pHs 2 e 4, com diminuição da tangente para pHs maiores, mas ainda assim com sensibilidade de quase 31 mV/pH. Com isso, os filmes TiO₂/SC₁/FTO possuem boa seletividade para toda a faixa de pHs testada. Quando utilizados como biossensores de ureia, a sensibilidade em função do pH alterado na solução foi menor.

Para os filmes U/TiO₂/SC₅/FTO, as respostas foram diferentes da encontradas para os filmes com 1 deposição, como mostra a figura 6.2.

Para a medição US, os filmes com 5 deposições apresentaram sensibilidade em torno de 0,5 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, com saturação dos valores dos ΔV s para as concentrações maiores. Com isso, podemos dizer que os filmes apresentaram sensibilidade com menor consequência do efeito memória entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL, e a partir de 80 mg/dL o efeito memória apresentou maiores consequências às respostas obtidas, com diminuição da tangente. As barras de erros foram bem expressivas.

Já na medição UI, os filmes apresentaram uma alta sensibilidade, em torno

Figura 6.2: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/SC₅/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,48 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL e 0,06 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 80 a 160 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 3,32 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

de 3,32 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, não respondendo mais para as concentrações maiores. Os valores dos ΔV s foram bem maiores quando comparados com os valores encontrados na medição US, provavelmente devido ao efeito memória, como já discutido.

Com isso, os filmes com 5 deposições apresentaram uma melhora em comparação com os filmes com 1 deposição. Provavelmente essa melhora da qualidade do filme em relação ao aumento de deposições realizadas está correlacionada com a espessura e granulosidade dos filmes, facilitando a imobilização de um número maior de enzimas por conter mais sítios ativos. O mesmo motivo pode ser a consequência do aumento das barras de erros em relação ao aumento do número de deposições, pois o aumento da granulosidade pode produzir números diferentes de sítios ativos, e tendo como consequência quantidades diferentes de enzimas imobilizadas para cada filme.

6.1.1.2 Dip-coat

Considerando agora os filmes depositados por dip-coat, a figura 6.3 mostra o comportamento dos ΔV s em função das medições US e UI para os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO.

Figura 6.3: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,05 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e (b) UI, com sensibilidade de 0,82 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 200 mg/dL. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Os filmes responderam de forma linear para ambas as medições, com sensibilidade de 0,5 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL para medição US, e posterior diminuição da tangente para concentrações maiores. Os filmes depositados por dip-coat, mesmo com somente 1 deposição, possuem altas espessuras e superfícies bem rugosas. Com isso, a quantidade de sítios ativos para imobilização de enzimas aumenta expressivamente, fazendo com que o efeito memória não seja tão forte como ocorre para filmes mais finos. Provavelmente esse é o motivo para que os U/TiO₂/DC₁/FTO apresentem aumento linear dos ΔV s com saturação somente para grandes concentrações, como mostra a figura 6.3(a).

Para UI, os filmes responderam de forma linear entre 40 a 200 mg/dL, com sensibilidade de 0,82 mV/(mg/dL). Entre 5 e 40 mg/dL praticamente não houve alteração do valor do ΔV , mas com barra de erro muito maior para a menor

concentração. Os valores alcançados pelos ΔV s não foram muito diferentes dos encontrados pela medição US, no entanto os valores das sensibilidades foram muito diferentes.

Em relação aos filmes depositados por spin-coat, os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO apresentaram respostas mais satisfatórias como biossensores de ureia.

Para os filmes com 5 deposições, a figura 6.4 mostra que os ΔV s apresentaram um comportamento linear para toda a faixa de concentração para ambas US e UI. No entanto, as sensibilidades não apresentaram valores muito altos.

Figura 6.4: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/DC₅/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,18 mV/(mg/dL) e (b) UI, com sensibilidade de 0,23 mV/(mg/dL).

Apesar da linearidade por toda a faixa de concentração de ureia testada, os valores das sensibilidades foram baixos, com pouca variação dos valores de ΔV . A variação total dos ΔV s foi praticamente a mesma para US e UI, sendo um pouco menor para US provavelmente por consequência do efeito memória.

Da mesma forma que ocorreu para os filmes quando testados como sensores de pHs, o aumento das deposições melhorou a linearidade por toda a faixa testada. No entanto, como biossensores de ureia, os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO apresentaram sensibilidade mais alta (medição UI), mas para uma faixa de concentração entre 40 e 200 mg/dL, e não entre 5 e 200 mg/dL como ocorre com os filmes

U/TiO₂/DC₅/FTO.

6.1.1.3 Casting

Para os filmes produzidos por casting, podemos verificar os resultados pelas figuras a seguir.

A figura 6.5 mostra os resultados para os filmes com 1 deposição (U/TiO₂/CA₁/FTO).

Figura 6.5: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/CA₁/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,61 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e (b) UI, com sensibilidade de 0,39 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes.

Os filmes depositados com 1 deposição apresentaram sensibilidade de 0,61 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL na medição US, com posterior possível dano no filme, não respondendo mais de forma linear provavelmente devido ao efeito memória, e sensibilidade de 0,39 mV/(mg/dL) entre todas as concentrações na medição UI. A variação total do módulo de ΔV foi praticamente a mesma para as duas medições e a variação das barras de erros foram pequenas para a maioria das concentrações.

Com isso, os filmes com 1 deposição apresentaram resultados de interesse para ambas as medições, mas obviamente, com resposta em maior faixa na medição UI.

Para os filmes com 4 deposições, a figura 6.6 mostra as respostas em função dos ΔV s.

Figura 6.6: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes U/TiO₂/CA₄/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,32 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e 0,06 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,47 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Enquanto os filmes U/TiO₂/CA₁/FTO apresentaram um estrago no filme para altas concentrações na medição US, os filmes U/TiO₂/CA₄/FTO apresentaram uma leve melhora, com diminuição da tangente mas ainda com linearidade entre as maiores concentrações. Com isso, foi obtida uma sensibilidade de 0,32 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e de 0,06 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL. No entanto, a variação total do módulo dos ΔV s foi menor quando comparado com a variação apresentada pelos filmes U/TiO₂/CA₁/FTO além das barras de erros maiores para as menores concentrações.

Para a medição UI, os filmes apresentaram uma sensibilidade de 0,47 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL, perdendo a linearidade com a concentração de 200 mg/dL, como ocorreu com U/TiO₂/CA₁/FTO. No entanto, o valor do ΔV não diminuiu ao perder a linearidade, mas aumentou consideravelmente. Isso pode indicar que o U/TiO₂/CA₄/FTO possui uma sensibilidade muito boa

para altas concentrações, podendo responder com alta linearidade em uma faixa de concentração maior. Estudos mais aprofundados nessa faixa de concentração poderão ser realizados para entender a funcionalidade desse filme em concentrações mais altas.

Com isso, o aumento das deposições melhorou as respostas em relação à medição US, e em comparação à medição UI, a figura 6.6(b) indicou uma melhora, mas alguns estudos ainda precisam ser realizados para esta afirmação.

Por fim, os filmes com 8 deposições apresentaram os seguintes resultados.

Figura 6.7: ΔV em função das concentrações de ureia para os filmes $U/TiO_2/CA_8/FTO$ nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,16 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 160 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,67 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL. As linhas pontilhadas delimitam a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Em relação à medição US, os filmes $U/TiO_2/CA_8/FTO$ apresentaram resposta com leve aumento linear somente entre 40 e 160 mg/dL, com sensibilidade em torno de 0,16 mV/(mg/dL) e valor máximo de ΔV menor do que 0,025 V. Com isso, pode-se dizer que $U/TiO_2/CA_8/FTO$ não apresentou diferenciação nos resultados em função das concentrações, com valores muito parecidos para todas as concentrações associados à barras de erros enormes. Com isso, para essa medição, o aumento de deposições piorou a resposta dos biossensores.

Em relação à medição UI, os filmes apresentaram sensibilidade de 0,67

mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL e entre 160 e 200 mg/dL os valores de ΔV s aumentaram mesmo perdendo a linearidade com as concentrações menores.

Portanto, o aumento do número de deposições levou a uma diminuição da faixa de concentração respondendo de forma linear na medição UI, onde com 1 deposição respondeu entre 5 a 200 mg/dL, com 4 deposições respondeu entre 5 e 160 mg/dL e com 8 deposições entre 5 a 120 mg/dL. No entanto, com o aumento das deposições, também aumentou-se os valores de ΔV s para maiores concentrações, indicando que esses filmes podem responder de forma bem satisfatória em concentrações mais altas, e que essa resposta tem influência do número de deposições. Estudos futuros poderão ser realizados para afirmar tal hipótese.

6.1.2 Voltametria Cíclica

As voltametrias cíclicas foram realizadas para todos os filmes testados, com urease imobilizada em suas superfícies, como descrito na seção 2.5.

6.1.2.1 Spin-coat

Primeiro, os testes foram feitos com os filmes U/TiO₂/SC₁/FTO, e os resultados em função das diferentes concentrações de ureia estão demonstrados na figura 6.8.

A medição US apresentou como resultado os voltamogramas da figura 6.8(a), onde os perfis voltamétricos são todos iguais, exceto para as concentrações de 120 e 160 mg/dL. Não houveram picos de oxidação e nem de redução, aparecendo somente nas concentrações de 120 e 160 mg/dL, em torno de 0,5V e -0,5 V respectivamente. Nessas concentrações, os perfis voltamétricos foram exatamente os mesmos, não havendo diferenciação entre eles. Já na medição UI, os perfis voltamétricos da figura 6.8(b) referentes às concentrações de 5 a 80 mg/dL foram exatamente os mesmos encontrados na medição US, havendo alteração a partir de 120 mg/dL. Para as maiores concentrações, os picos de oxidação e redução encontrados foram de 0,46 V e -0,14 V, respectivamente, para 120 mg/dL, 0,47 V e -0,1 V para 160 mg/dL e 0,45 V e -0,08 V para 200 mg/dL. Os ΔE s destas concentrações estão demonstrados na figura 6.8(c), onde podemos perceber que diminuem com o aumento da concentração.

Figura 6.8: Perfis voltamétricos para os filmes $U/TiO_2/SC_1/FTO$ em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI, e (c) ΔE em função da concentração de ureia para a medição UI. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, a variação do ΔE ocorreu de forma linear.

Comparando as duas medições, podemos perceber que para as menores concentrações não há diferenciação alguma, onde os voltamogramas apresentados são praticamente iguais para as concentrações de 5 a 80 mg/dL. Com o aumento da concentração para 120 mg/dL, o biossensor começa a apresentar uma resposta

diferente, com picos de redução e de oxidação para ambas as medições. Na medição US esses picos possuem um perfil mais resistivo enquanto que na medição UI apresentam picos mais definidos. Isso provavelmente ocorre devido ao consumo da urease na superfície do filme, sendo quase imperceptível nas primeiras concentrações. O fato do voltamograma referente à 160 mg/dL ser praticamente o mesmo do de 120 mg/dL indica que houve consumo da maior parte das enzimas até a medição de 120 mg/dL. Na medição UI não existe o gasto das enzimas anteriormente, e o perfil referente à concentração de 160 mg/dL possui valores de correntes maiores, mesmo mantendo o mesmo comportamento do voltamograma de 120 mg/dL. Para 200 mg/dL na medição UI o mesmo ocorre, onde o perfil voltamétrico é o mesmo, mas com valores de correntes maiores, enquanto que na medição US o perfil voltamétrico para 200 mg/dL é o mesmo das concentrações menores, isto é, não apresenta resposta. Isso indica que toda a urease da superfície já foi consumida nas medições anteriores, e com isso o sensor não apresenta mais resposta para essa concentração.

Com isso, os filmes com 1 deposição apresentam diferenciação dos voltamogramas para concentrações acima de 120 mg/dL principalmente para a medição UI, não apresentando resposta para concentrações menores em ambas as medições, e com provável consumo total de urease na medição US.

Os filmes produzidos com 5 deposições apresentaram respostas com comportamentos diferentes em relação aos filmes U/TiO₂/SC₁/FTO, como pode ser verificado na figura 6.9.

Para os filmes U/TiO₂/SC₅/FTO na medição US o aumento da concentração implicou no aumento dos valores de correntes para os picos de oxidação e de redução, assim como no deslocamento desses picos. Já na medição UI, cada concentração apresentou perfis voltamétricos com comportamentos diferentes. Para ambas as medições a concentração de 5 mg/dL não apresenta picos nem de oxidação e nem de redução. O comportamento dos ΔE s em função da concentração está demonstrado nas figura 6.9(c) e (d), para US e UI, respectivamente.

Para US, o ΔE aumentou linearmente com a concentração de ureia entre as concentrações de 40 e 160 mg/dL, com um aumento maior para 200 mg/dL. Já em UI, os ΔE s se comportaram de forma aleatória, não havendo possibilidade de detecção da concentração pelos voltamogramas, como ocorre na medição US.

(a) U/TiO₂/SC₅/FTO - US (b) U/TiO₂/SC₅/FTO - UI (c) ΔE - US (d) ΔE - UI

Figura 6.9: Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO₂/SC₅/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Com isso, os filmes com 1 deposição apresentaram respostas satisfatórias entre as maiores concentrações (120 a 200 mg/dL) na medição UI enquanto que os filmes com 5 deposições apresentaram respostas satisfatórias para todas as concentrações mas na medição US. Isso porque somente uma deposição produzida por spin-coat produz uma camada bem fina, fazendo com que exista uma menor superfície e consequentemente uma menor quantidade de urease ligada à ela. Por

isso, a medição US “estraga” rápido, com rápido consumo da urease, enquanto que na medição UI consegue-se medir para as maiores concentrações, mas não detectando baixa quantidade de ureia na solução para ambas as medições. Já os filmes com 5 deposições possuem uma espessura maior e consequentemente mais defeitos cristalinos na superfície, facilitando para que haja uma maior quantidade de urease ligada na superfície, com maior área de contato da urease entre os cristais da superfície, fazendo com que o gasto da urease com as medições feitas no tipo US não consuma toda a enzima e ainda apresente respostas para todas as concentrações, enquanto que na medição UI, provavelmente esses defeitos cristalinos estão ligados a quantidades diferentes de urease, não sendo possível o controle dessa quantidade, fazendo com que cada filme se comporte de maneira diferente. Esse problema também ocorre com 1 deposição, mas em proporções bem menores, diminuindo o erro drasticamente.

6.1.2.2 Dip-coat

Os resultados dos filmes U/TiO₂/DC₁/FTO estão demonstrados na figura 6.10.

O comportamento dos filmes nas medições US e UI foi muito parecido com o comportamento dos filmes U/TiO₂/SC₅/FTO. Para ambas as medições, não houveram picos nos voltamogramas referentes à 5 mg/dL, com leve indício dos picos nos voltamogramas referentes à 40 mg/dL. Na medição US (figura 6.10(a)) há um aumento dos valores de correntes com o aumento da concentração adicionado à um deslocamento dos picos, enquanto que na medição UI não há um comportamento contínuo dos voltamogramas em função da concentração. As figuras 6.10(c) e (d) mostram mais claramente essa discussão, onde podemos analisar o comportamento do ΔE com a concentração para cada medição.

Na medição US, o ΔE apresentou um aumento com o aumento da concentração, indicando que a reação na superfície do filme foi dificultada. Provavelmente essa dificuldade ocorreu em função do consumo das enzimas em cada medição. Já na medição UI o comportamento do ΔE ocorreu de forma aleatória, não havendo uma distinção das concentrações. O fato do comportamento dos voltamogramas serem muito parecidos com o comportamento dos voltamogramas

(a) U/TiO₂/DC₁/FTO - US (b) U/TiO₂/DC₁/FTO - UI (c) ΔE - US (d) ΔE - UI

Figura 6.10: Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para as medições (c) US e (d) UI. A linha vermelha é um guia para os olhos.

dos filmes U/TiO₂/SC₅/FTO leva a mesma discussão, onde mesmo estes filmes serem produzidos com somente 1 deposição, possui maior espessura, sendo um pouco menor do que dos filmes com 5 deposições produzidas por spin (ver figuras 5.12 e 5.14).

Já os filmes com 5 deposições tem como resultados os voltamogramas apresentados na figura 6.11.

Figura 6.11: Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO₂/DC₅/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI.

Os filmes com 5 deposições possuem espessuras maiores ainda do que os filmes com 1 deposição, além da superfície possuir muitas ranhuras (ver figura 5.14). Com isso, os voltamogramas para ambas as medições não apresentaram respostas de interesse, sem picos de oxidação e nem de redução, e na medição UI com comportamento aleatório.

Com isso, não foi possível a diferenciação das concentrações quando utilizados os filmes U/TiO₂/DC₁/FTO na medição UI e U/TiO₂/DC₅/FTO em ambas as medições, com resultados não satisfatórios. Somente para os filmes com 1 deposição testados na medição US foi possível a diferenciação das concentrações, para concentrações acima de 80 mg/dL, mas com crescimento do ΔE de forma não linear.

Portanto, os filmes U/TiO₂/DC₅/FTO devem ser descartados como biossensores de ureia para ambas as medições por voltametria cíclica.

6.1.2.3 Casting

Os filmes produzidos por casting com 1 deposição apresentaram como resultados os voltamogramas da figura 6.12.

Considerando somente a medição US os valores de correntes foram baixos

(a) U/TiO₂/CA₁/FTO - US(b) U/TiO₂/CA₁/FTO - UI (c) ΔE - US

Figura 6.12: Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO₂/CA₁/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para a medição (c) US. A linha vermelha é um guia para os olhos.

para todas as concentrações, em escala de μA . Com o aumento da concentração os valores de correntes aumentaram, com picos de oxidação e de redução em torno de 0,6 V e -0,3 V, respectivamente. As concentrações de 5 a 80 mg/dL não apresentaram picos de redução definidos o suficiente para detecção do valor do potencial. Com isso, os ΔE s foram feitos somente para as concentrações de 120 a 200 mg/dL, com mostra a figura 6.12(c). Nessas concentrações, os ΔE s apresentaram uma linearidade com o

aumento da concentração. Com isso, é possível a detecção da concentração de ureia nessa faixa. Já a medição UI não apresentou resultados de interesse, como mostra a figura 6.12(b), onde os voltamogramas não possuem perfis definidos, a maioria sem picos de redução, e com valores maiores de correntes quando comparados com a medição US. Com isso, não foi possível o cálculo do ΔE para a maioria das concentrações.

Os filmes produzidos com 4 deposições não apresentaram resultados para ambas as medições, como mostram as figuras 6.13(a) para a medição US e 6.13(b) para a medição UI.

Figura 6.13: Perfis voltamétricos para os filmes U/TiO₂/CA₄/FTO em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI.

Na medição US, os voltamogramas obtidos foram praticamente iguais para todas as concentrações, sem perfil definido e sem picos de oxidação nem de redução. Na medição UI, o mesmo ocorre, não sendo possível o cálculo de ΔE em nenhuma situação. Com isso, os filmes U/TiO₂/CA₄/FTO não responderam como biossensores de ureia com voltametria cíclica, devendo ser descartados para estudos futuros.

Por fim, os resultados dos filmes produzidos com 8 deposições estão demonstrados na figura 6.14.

Da mesma forma que ocorre com os filmes com 4 deposições, os filmes com

Figura 6.14: Perfis voltamétricos para os filmes $\text{U}/\text{TiO}_2/\text{CA}_8/\text{FTO}$ em diferentes concentrações de ureia para as medições (a) US e (b) UI e, ΔE em função da concentração de ureia para a medição (c) UI.

8 deposições não apresentaram resultados na medição US. Na medição UI, para as menores concentrações de 5 até 80 mg/dL, os filmes também não apresentaram resultados, no entanto apresentaram para as maiores concentrações, com perfis voltamétricos mais definidos e com maiores valores das correntes. Os picos de oxidação e de redução dessas concentrações levaram a um ΔE com comportamento não linear, como mostra a figura 6.14(c). Exceto para a concentração de 160 mg/dL,

o aumento da concentração leva a um aumento do ΔE .

Para as concentrações de 120 e 160 mg/dL pequenos picos de oxidação apareceram em torno de -0,6 V. Esses picos ocorreram pois quando aplicado o potencial negativo a partir de -0,8 V os valores das correntes decresceram rapidamente para valores muito baixos, levando à uma redução da superfície muito forte. Com isso, quando o potencial começa a ser aumentado novamente a superfície sofre uma oxidação para voltar ao seu estado normal. Logo, esses pequenos picos devem ser desconsiderados.

Com isso, somente os filmes U/TiO₂/CA₁/FTO na medição US apresentaram resultados entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL. Os filmes U/TiO₂/CA₄/FTO e U/TiO₂/CA₈/FTO não apresentaram resultados para nenhuma medição testada.

Portanto, os filmes U/TiO₂/SC₁/FTO apresentaram respostas melhores em função das concentrações para a medição US, do que para a medição UI utilizando EGFET. O contrário foi apresentado pelos resultados da voltametria cíclica, onde os filmes apresentaram uma diminuição linear do ΔE para as concentrações maiores na medição UI. Já para os filmes U/TiO₂/SC₅/FTO, o aumento do número de deposições realizadas aumentou a qualidade das respostas como sensores de ureia. As respostas apresentadas pela medição US corroboram com as respostas obtidas pela voltametria cíclica, com aumento linear do ΔE para concentrações maiores, indicando uma dificuldade da reação ocorrer, enquanto que no EGFET a tangente para concentrações maiores diminui em relação às concentrações menores. Para ambos os casos, os U/TiO₂/SC₅/FTO apresentaram piora em relação à 200 mg/dL. Na medição UI por voltametria cíclica, não foram encontrados resultados de interesse.

Já para os filmes depositados por dip-coat, houve uma melhora nas respostas em função das concentrações com o aumento de deposições de 1 para 5, para ambas as medições com uso do EGFET. Tanto U/TiO₂/DC₁/FTO quanto U/TiO₂/DC₅/FTO responderam com boa linearidade em função do aumento da concentração para ambas as medições US e UI, no entanto U/TiO₂/DC₅/FTO respondeu na faixa total de concentração de 5 a 200 mg/dL para US e UI, diferente de U/TiO₂/DC₁/FTO. Na voltametria, U/TiO₂/DC₁/FTO apresentou resultados melhores na medição US, e U/TiO₂/DC₅/FTO não apresentou resultados

de interesse em nenhum tipo de medição.

Por fim, para os filmes depositados por casting, o aumento do número de deposições alterou de forma padronizada as respostas no EGFET para ambas as medições. Para US, U/TiO₂/CA₁/FTO responde com sensibilidade entre 5 a 120 mg/dL, com perda na qualidade para concentrações maiores, enquanto que U/TiO₂/CA₄/FTO também respondeu na faixa de concentração de ureia entre 5 e 120 mg/dL, com melhora nas respostas para as concentrações maiores, melhorando a resposta do biossensor de ureia. Já U/TiO₂/CA₈/FTO respondeu somente entre 40 e 160 mg/dL. Já para UI, U/TiO₂/CA₁/FTO responderam com alta linearidade entre toda a faixa de concentração utilizada, enquanto que U/TiO₂/CA₄/FTO respondeu entre 4 a 160 mg/dL, com aumento expressivo da tangente entre 160 e 200 mg/dL, indicando que esses filmes podem responder com alta sensibilidade em concentrações maiores. Já U/TiO₂/CA₈/FTO apresentou resposta linear entre 5 a 120 mg/dL, com mesmo aumento na tangente para maiores concentrações. Com isso, estudos mais detalhados em concentrações maiores deverão ser feitos. Para nenhum filme produzido por casting os resultados da voltametria cíclica apresentou respostas de interesse.

Portanto, como biossensores de ureia, os filmes depositados por dip-coat apresentaram resultados de maior interesse, quando comparados com os filmes depositados por spin-coat e casting.

6.2 Glicose

6.2.1 EGFET

Por fim, os filmes depositados com TiO₂ foram imobilizados com glicose oxidase e testados em diferentes concentrações de glicose no dispositivo EGFET e por voltametria cíclica. Lembrando que a hidrólise da glicose leva a uma diminuição do valor do pH, devido à liberação de íons H⁺ na solução (ver equação 4.9), ao contrário da ureia, como visto até agora, que leva a um aumento do pH da solução devido à liberação de íons OH⁻ (ver equação 4.6).

6.2.1.1 Spin-coat

O filme $G/TiO_2/SC_1/FTO$ apresentou como resposta os ΔV s apresentados na figura 6.15.

Figura 6.15: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes $G/TiO_2/SC_1/FTO$ nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,05 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 2,32 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes.

Para US, os filmes responderam com sensibilidade baixa entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, com saturação para as maiores concentrações, enquanto que para a medição UI os filmes apresentaram sensibilidade alta para toda a faixa de concentração de glicose.

Com isso, os filmes com 1 deposição apresentaram resultados de interesse quando utilizados como biossensores de glicose. O mesmo não ocorreu quando utilizados como biossensores de ureia. Provavelmente isso ocorreu pois os filmes $TiO_2/SC_1/FTO$ responderam muito melhor na faixa de pHs mais ácidos do que para os pHs mais básicos.

A figura 6.16 mostra os resultados para ambas as medições US e UI dos filmes $G/TiO_2/SC_5/FTO$.

O aumento do número de deposições melhorou as respostas dos filmes na medição UI, com sensibilidade muito mais alta para toda a faixa de concentração

Figura 6.16: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes $G/TiO_2/SC_5/FTO$ nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de $6,18 \text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

testada, mas piorou em relação à medição US, com saturação a partir da concentração de 40 mg/dL e barras de erros maiores.

6.2.1.2 Dip-coat

Já para os filmes depositados por dip-coat, a figura 6.17 mostra os resultados dos filmes $G/TiO_2/DC_1/FTO$.

Para a medição US, praticamente não houve sensibilidade em função das concentrações de glicose, com possível resposta somente entre as concentrações de 5 e 40 mg/dL, seguido de dano nos filmes de forma irreversível, pois os valores de ΔV s diminuem com o aumento da concentração. Já para UI, os filmes responderam entre 40 e 200 mg/dL, com sensibilidade de somente $0,48 \text{ mV}/(\text{mg}/\text{dL})$. Diferente dos biossensores de ureia onde os filmes responderam de forma linear para ambas as medições, quando utilizados como biossensores de glicose os filmes não apresentaram resposta de interesse.

Os filmes $G/TiO_2/DC_5/FTO$ apresentaram uma melhora nas respostas dos filmes como biossensores de glicose em comparação com os filmes com 1 deposição para ambas as medições, como mostra a figura 6.18.

(a) G/TiO₂/DC₁/FTO - US (b) G/TiO₂/DC₁/FTO - UI

Figura 6.17: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/DC₁/FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 0,48 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 e 200 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

(a) G/TiO₂/DC₅/FTO - US (b) G/TiO₂/DC₅/FTO - UI

Figura 6.18: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/DC₅/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 1,27 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 e 80 mg/dL e 0,16 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 80 a 200 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 6,31 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Para US, a melhora em relação à G/TiO₂/DC₁/FTO foi muito grande, apresentando sensibilidade em torno de 1,27 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL, e com menor sensibilidade entre as maiores concentrações. No entanto, os filmes conseguiram detectar toda a faixa de concentração mesmo que com linearidades em faixas diferentes, o que não ocorreu com os filmes com 1 deposição.

Para UI, os filmes apresentaram linearidade entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL, com alta sensibilidade em torno de 6,31 mV/(mg/dL). Portanto, apresentaram uma grande melhora em relação aos filmes com 1 deposição.

Os filmes U/TiO₂/DC₅/FTO como biossensores de ureia também apresentaram as respostas de maior interesse, demonstrando que como biossensores são filmes muito efetivos.

6.2.1.3 Casting

Por fim, os filmes depositados por casting apresentaram os seguintes resultados. A figura 6.19 mostra os resultados referentes aos filmes com 1 deposição.

Figura 6.19: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/CA₁/FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 0,47 mV/(mg/dL). A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

Apesar da medição UI apresentar resposta para toda a faixa de concentração, a sensibilidade encontrada foi de somente 0,47 mV/(mg/dL), com expressivo

aumento das barras de erros para as concentrações maiores. A medição US apresentou um aumento do ΔV entre as duas primeiras medições seguido de valores com leve decaimento e barras de erros bem expressivas, demonstrando forte efeito memória.

Já para G/TiO₂/CA₄/FTO, houve uma melhora na qualidade das respostas em relação à medição US e uma leve piora em relação à UI, quando comparados com G/TiO₂/CA₁/FTO, como mostra a figura 6.20.

Figura 6.20: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/CA₄/FTO nas medições (a) US, com sensibilidade de 0,17 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 40 a 120 mg/dL, e (b) UI, com sensibilidade de 0,51 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes.

Para US, os filmes apresentaram aumento dos ΔV s para a faixa de concentração entre 40 e 120 mg/dL, enquanto que para G/TiO₂/CA₁/FTO houve diminuição dos valores de ΔV nessa faixa de concentração. Já para US, os filmes com 1 e 4 deposições responderam com sensibilidades muito parecidas, mas o filme G/TiO₂/CA₄/FTO respondeu entre 5 a 160 mg/dL enquanto que G/TiO₂/CA₁/FTO respondeu entre 5 e 200 mg/dL.

Por fim, os filmes G/TiO₂/CA₈/FTO apresentaram como resultados os ΔV s apresentados na figura 6.21.

O aumento das deposições piorou mais ainda as respostas dos filmes, sem

Figura 6.21: ΔV em função das concentrações de glicose para os filmes G/TiO₂/CA₈/FTO nas medições (a) US e (b) UI, com sensibilidade de 2,16 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL. A linha pontilhada delimita a faixa de concentração de respostas dos filmes. A linha vermelha é um guia para os olhos.

apresentar respostas satisfatórias para a medição US, e com sensibilidade somente entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL na medição UI. Nessa faixa, a sensibilidade encontrada foi de 2,16 mV/(mg/dL).

Com isso, os filmes G/TiO₂/CA₈/FTO apresentaram uma queda muito grande na qualidade das respostas como biossensores de glicose, com diminuição da faixa de respostas na medição UI com o aumento das deposições, da mesma forma que ocorreu com os biossensores de ureia, e sem respostas de interesse nas medições US.

6.2.2 Voltametria Cíclica

Por fim, os testes com as voltametrias cíclicas em diferentes soluções de glicose foram realizadas com os filmes depositados com TiO₂ e com glicose oxidase imobilizadas em suas superfícies.

6.2.2.1 Spin-coat

Os filmes G/TiO₂/SC₁/FTO apresentaram como resultados das medições US e UI os voltamogramas demonstrados nas figuras 6.22(a) e 6.22(b), respectivamente.

Figura 6.22: Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/SC₁/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

A medição US apresentou voltamogramas com picos de oxidação e de redução para as concentrações de 40 até 200 mg/dL, com desvios dos picos em função da concentração. A concentração de 5 mg/dL não apresentou picos definidos. Já a medição UI apresentou perfis voltamétricos diferentes em função das concentrações. Para 5 e 40 mg/dL não aparecem picos de oxidação e nem de redução, para 80 e 160 mg/dL os voltamogramas apresentaram um perfil mais resistivo e as concentrações

de 120 e 200 mg/dL apresentaram voltamogramas mais definidos. Os valores de correntes alcançados na medição Individual foram mais altos em comparação com os valores de correntes alcançados na medição US. Os ΔE s estão demonstrados nas figuras 6.22(c) em relação à medição US e 6.22(d) em relação à medição UI.

Com o aumento da concentração o ΔE deve diminuir devido ao crescimento de íons H^+ na solução, devido à hidrólise da glicose que libera íons H^+ , facilitando então a reação na superfície do filme. Na medição US, para as concentrações de 40 até 160 mg/dL os ΔE s praticamente mantêm os mesmos valores, com leve diminuição entre 80 e 160 mg/dL, apresentando uma grande diferença entre 160 e 200 mg/dL. Com isso, podemos dizer que para 200 mg/dL a reação foi muito dificultada, indicando que quase toda a glicose oxidase da superfície dos filme pode ter sido consumida. Já na medição UI, os ΔE s se comportam de maneira aleatória com o aumento da concentração, não havendo então sensibilidade dos filmes em função das concentrações.

Os filmes G/TiO₂/SC₅/FTO apresentaram como resultados da medição US um aumento dos valores de correntes com o aumento da concentração mantendo o mesmo perfil voltamétrico, como mostra a figura 6.23(a).

Na medição UI, o comportamento dos voltamogramas tenderam a seguir os comportamentos encontrados na medição US mas com algumas alterações, como mostra a figura 6.23(b). Exceto para 80 mg/dL, os perfis voltamétricos tenderam a manter um padrão, com aumento de corrente e leve desvio dos valores de potenciais com o aumento da concentração. Para 80 mg/dL, os picos foram muito mais definidos, com valores de correntes mais altos. Neste caso, o voltamograma apresentou um perfil diferente dos outros encontrados.

Os ΔE s mostram como a superfície dos filmes sentem o aumento da concentração. A figura 6.23(c) mostra que os ΔE s diminuem com o aumento da concentração na medição US, indicando que a reação ficou mais fácil de ocorrer na superfície do filme com o aumento da concentração. Já na medição UI, entre 80 e 160 mg/dL os ΔE s apresentaram um aumento significativo, como mostra a figura 6.23(d). Com isso, as medições US e UI apresentaram respostas opostas, sendo em uma a facilitação da reação com o aumento da concentração enquanto que na outra essa reação foi dificultada.

(a) G/TiO₂/SC₅/FTO — US (b) G/TiO₂/SC₅/FTO – UI

(c) ΔE – US

(d) ΔE – UI

Figura 6.23: Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/SC₅/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

Com isso, para os filmes depositados por spin-coat em substratos de FTO, os filmes com 1 deposição não apresentaram respostas satisfatórias em ambas as medições. Já os filmes com 5 deposições apresentaram respostas de interesse na medição US entre as concentrações de 80 a 200 mg/dL, enquanto que na medição UI as respostas não foram satisfatórias.

6.2.2.2 Dip-coat

Os filmes G/TiO₂/DC₁/FTO apresentaram voltamogramas com perfis definidos para ambas as medições, como mostra a figura 6.24. Para a medição US (figura 6.24(a)) os picos de oxidação e de redução estão bem definidos, com aumento dos valores de correntes e leve deslocamento em função do aumento da concentração. Já a medição UI (figura 6.24(b)) apresentou deslocamentos mais expressivos dos picos.

A figura 6.24(c) mostra o comportamento do ΔE em função da concentração para a medição US. Como houve pouco deslocamento dos picos, a variação do ΔE também foi pequena, com diminuição dos valores em função do aumento da concentração, indicando que a reação foi facilitada com o aumento da concentração. Isso também indica que a glicose oxidase não foi totalmente consumida, podendo o sensor ser reutilizado e ainda assim apresentar resposta de interesse.

A figura 6.24(d) mostra que para a medição UI o comportamento do ΔE ocorre de forma mais aleatória, com aumento do ΔE para as concentrações de 120 e 200 mg/dL, e para as concentrações de 80 e 160 mg/dL com valores muito próximos, não havendo diferenciação.

Com isso, os filmes depositados com 1 deposição por *dip-coat* somente apresentaram respostas de interesse na medição US entre as concentrações de 80 a 200 mg/dL, da mesma forma que somente os filmes depositados por *spin-coat* com 5 deposições também só apresentaram respostas de interesse nessa mesma faixa e no mesmo tipo de medição.

Agora, quando analisamos os filmes depositados com 5 deposições, os voltamogramas não apresentaram perfis tão bem definidos como em relação aos filmes com 1 deposição, como mostra a figura 6.25.

Para a medição US, mostrada na figura 6.25(a), os picos de oxidação e redução foram aparecendo com o aumento da concentração, definindo mais os voltamogramas. No entanto, quase não houve deslocamento dos picos além dos perfis voltamétricos indicarem um perfil mais resistivo. Já na medição UI, os voltamogramas indicaram um perfil menos resistivo, como mostra a figura 6.25(b). As figuras 6.25(c) e (d) mostram o comportamento dos ΔE s em função das concentrações para as medidas US e UI, respectivamente. Podemos perceber que não

Figura 6.24: Perfis voltamétricos para os filmes $G/\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

houve um comportamento definido em nenhuma das medições, com valores aleatórios de ΔE . Com isso, o aumento das deposições realizadas prejudicou as respostas dos sensores em ambas as medições.

Logo, os filmes $G/\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ não apresentaram respostas de interesse para nenhuma medição testada, da mesma forma que ocorreu no EGFET.

Figura 6.25: Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/DC₅/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

6.2.2.3 Casting

Por fim, as mesmas análises foram realizadas para os filmes produzidos por casting. A figura 6.26 mostra os resultados dos filmes G/TiO₂/CA₁/FTO.

Para a medição US os perfis voltamétricos começaram a apresentar picos a partir de 80 mg/dL, como mostra a figura 6.26(a). Na medição UI (figura 6.26(b)), os perfis foram diferentes dos encontrados na medição US, com picos mais definidos

Figura 6.26: Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/CA₁/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

e valores de correntes menores. No entanto, os ΔEs se comportaram de maneira aleatória para ambas as medições, como mostram as figuras 6.26(c) para a medição US e (d) para a medição UI.

Com isso, os filmes G/TiO₂/CA₁/FTO não apresentaram respostas em função da concentração de glicose com a voltametria cíclica.

Já para os filmes G/TiO₂/CA₄/FTO os resultados foram bem diferentes. A

figura 6.27(a) mostra que os picos de oxidação na medição US cresceram definidos com o aumento da concentração, com leve deslocamento, enquanto que os picos de redução também crescem, mas com menor definição. Na medição UI (figura 6.27(b)), os perfis apresentaram valores de correntes menores para todas as concentrações, em comparação com os perfis obtidos na medição US, além de apresentaram picos de oxidação com maiores deslocamentos em função da concentração. Os picos de redução quase não apresentaram deslocamentos. Com isso, o ΔE para cada concentração foi calculado e plotado nas figuras 6.27(c) e (d).

Para a medição US (figura 6.27(c)), os ΔE s apresentaram um aumento no valor em função do aumento da concentração, indicando uma maior dificuldade da reação ocorrer. Isso provavelmente ocorreu devido ao consumo das enzimas das superfícies dos filmes, e com a diminuição da quantidade de enzimas, diminui consequentemente a reação na superfície do filme. No entanto, na medição UI (figura 6.27(d)), os ΔE s aumentaram em função do aumento da concentração. Nesta medição, cada concentração foi medida com um filme novo, portanto não podemos contabilizar o consumo das enzimas referentes às medições anteriores. Logo, a dificuldade da reação ocorrer na superfície, no caso dos filmes com 4 deposições, não ocorre devido ao consumo das enzimas como discutido anteriormente, e sim à algum outro fator.

Por fim, os filmes G/TiO₂/CA₈/FTO apresentaram como resultados os perfis demonstrados na figura 6.28.

Os perfis voltamétricos referentes à medição US (figura 6.28(a)) apresentaram, como nos outros casos, aumento dos valores dos picos e melhor definição destes com o aumento da concentração. Os valores de ΔE neste caso tenderam a aumentar com o aumento da concentração, mas com um decaimento expressivo somente em 120 mg/dL, como mostra a figura 6.28(c). Já na medição UI (figura 6.28(b)), os perfis não apresentaram picos de oxidação e nem de redução em função de nenhuma concentração. Alguns picos de oxidação apareceram em torno de -0,5 V, no entanto esses picos se referem à drástica queda de valor de corrente para potenciais menores, reduzindo drasticamente os íons na superfície do filme, fazendo com que no aumento do potencial ocorra um oxidação. No entanto, isso não ocorre devido somente aos íons da interface filme/solução, e sim devido ao potencial aplicado. Logo, esses picos

Figura 6.27: Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/CA₄/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e ΔE em função da concentração de glicose para as medições (c) US e (d) UI.

devem ser descartados para análises como sensores.

Portanto, nenhum filme depositado por casting apresentou resposta de interesse ao medirmos em diferentes concentrações de glicose, demonstrando que essa técnica deve ser descartada para testes futuros para medições na voltametria cíclica. Neste caso, somente os filmes depositados por spin-coat com 5 deposições e dip-coat com 1 deposição apresentaram respostas entre as concentrações de 80 a

Figura 6.28: Perfis voltamétricos para os filmes G/TiO₂/CA₈/FTO em diferentes concentrações de glicose para as medições (a) US e (b) UI, e (c) ΔE em função da concentração de glicose para a medição US.

200 mg/dL, com diferenciação das concentrações, devendo todos os outros filmes testados serem descartados no uso da técnica de voltametria cíclica.

Por fim, os filmes depositados por spin-coat apresentaram melhora nas respostas com uso do EGFET em função do aumento de deposições, com sensibilidades altas para a medição UI tanto para G/TiO₂/SC₁/FTO quanto para G/TiO₂/SC₅/FTO. Para voltametria cíclica os resultados não foram de

grande interesse para G/TiO₂/SC₁/FTO, com melhor resultado para US do filme G/TiO₂/SC₅/FTO.

Da mesma forma que para os filmes depositados por spin-coat, os filmes depositados por dip-coat apresentaram uma melhora nas respostas em função das concentrações de glicose quando medidos no EGFET em função do aumento de deposições. Os filmes G/TiO₂/DC₁/FTO apresentaram resultados melhores na medição UI, sem resultados de interesse na medição US, enquanto que os filmes G/TiO₂/DC₅/FTO apresentaram resultados bons na medição US e resultados excelentes na medição UI, com sensibilidade de 6,31 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 160 mg/dL. Quanto a voltametria cíclica, os filmes G/TiO₂/DC₁/FTO apresentaram resultados de interesse na medição US, e não apresentaram respostas de interesse para os filmes G/TiO₂/DC₅/FTO.

Os filmes produzidos por casting apresentaram uma piora nas respostas em função do aumento de deposições para a medição UI, com melhora entre G/TiO₂/CA₁/FTO e G/TiO₂/CA₄/FTO na medição US, quando testados no EGFET. Nenhum filme depositado por casting apresentou respostas de interesse na voltametria cíclica.

Com isso, tanto para biossensores de ureia quanto para biossensores de glicose, os filmes depositados por dip-coat apresentaram as respostas de maior interesse, necessitando agora estudos mais aprimorados. Essa resposta foi surpreendente pois como os filmes depositados por dip-coat apresentaram espessuras elevadas com superfície com grandes ranhuras, esperava-se que a qualidade dos filmes piorasse. No entanto, provavelmente devido à essas ranhuras, a imobilização das enzimas ocorre de forma mais satisfatória, com maior quantidade de enzimas imobilizadas devido à maior oferta de sítios ativos presentes nas superfícies dos filmes, assim como provavelmente esses filmes possuem uma maior superfície de contato com a solução. Com isso, essa técnica foi a que apresentou as respostas de maior interesse para deposição de filmes finos de TiO₂ para serem utilizados como biossensores de ureia e de glicose utilizando dispositivo EGFET.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1 Conclusões

ESTE trabalho procurou aperfeiçoar e otimizar a produção de filmes finos de óxidos por diversas técnicas de deposição para serem utilizados como eficientes sensores de pH para uso comercial na medicina. Com isso, as conclusões gerais estão descritas em função de cada filme testado.

- FTO, ITO e AZO

Os filmes FTO apresentaram como resposta em função do pH no dispositivo EGFET duas faixas lineares de resposta, sendo uma entre os pHs 2 a 6, com sensibilidade de 37,8 mV/pH e ajuste linear de somente 0,96 e entre os pHs 6 a 8, com sensibilidade menor, de 11,3 mV/pH mas com ajuste linear melhor, de 0,99. Portanto, os filmes de FTO não responderam de forma efetiva como sensores de pH com respostas em ampla faixa de pHs, com sensibilidades baixas e linearidades comprometidas. O mesmo quando testado por voltametria cíclica apresentou resultados parecidos com os apresentados pelo EGFET, com resposta na faixa de pHs de 2 a 5. No entanto, não responderam para os pHs mais básicos. Com isso, as duas técnicas se completaram apresentando o mesmo padrão de respostas.

Ao utilizarmos os filmes FTO com enzimas imobilizadas, os filmes U/FTO responderam somente entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL para ambas as medições US e UI. Com o aumento da concentração o pH da solução se torna mais básico, justificando a piora nas respostas. Quando utilizados com glicose, os filmes G/FTO apresentaram respostas um pouco diferentes em comparação com U/FTO.

A sensibilidade encontrada para a medição US foi maior do que para a medição UI, na mesma faixa de concentrações, agora entre 5 a 120 mg/dL. Com isso, parece que o filme G/FTO não sentiu tanto o chamado efeito memória, como ocorreu com U/FTO. Os resultados obtidos na voltametria cíclica foram coerentes com os obtidos no EGFET.

Os filmes ITO apresentaram como resposta em função do pH no dispositivo EGFET sensibilidade de 37 mV/pH com ajuste linear de 0,81 na faixa de pHs de 2 a 4 e de somente 6,4 mV/pH com ajuste linear de 0,98 na faixa de 4 a 7. Na voltametria cíclica, apresentaram respostas muito parecidas com os filmes FTO, com resposta em função do pH somente entre os pHs 2 a 5, não respondendo em pHs mais básicos, como ocorreu no EGFET.

Quando imobilizados com ureia, os filmes U/ITO responderam de forma linear entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL na medição UI, mas com baixa sensibilidade (0,22 mV/(mg/dL)) e barras de erros grandes. Na voltametria cíclica os resultados foram coerentes com os obtidos no EGFET, com diminuição do ΔE em função do aumento da concentração (na medição UI).

G/ITO apresentou alta sensibilidade (3,18 mV/(mg/dL)) na medição UI entre 5 a 80 mg/dL. A voltametria cíclica apresentou aumento linear do ΔE com a concentração na medição UI, sem resposta de interesse na medição US, corroborando novamente com as respostas obtidas pelo EGFET. Logo, os filmes de ITO responderam de forma muito mais efetiva como biossensores de glicose do que como biossensores de ureia, provavelmente porque respondem melhor em pHs mais ácidos.

Os filmes de AZO com 7% de alumínio apresentaram os melhores resultados como sensores de pH quando depositados por spray-pyrolysis pela Rota 04. Os filmes AZO/SP/FTO apresentaram resultados em função do pH com sensibilidade média em torno de 27 mV/pH com ajuste linear de 0,92 entre os pHs 2 a 8. A voltametria cíclica apresentou voltamogramas mais resistivos (devido ao aumento expressivo da espessura do filme), com aumento do ΔE para todos os valores de pH, apresentando resposta para toda a faixa de pH, melhorando em relação ao FTO.

U/AZO/SP/FTO apresentaram sensibilidade em torno de 0,9 mV/(mg/dL) entre as concentrações de 5 a 120 mg/dL na medição UI. Na voltametria cíclica,

a medição UI apresentou respostas diferentes para as maiores concentrações, entre 120 e 200 mg/dL, como ocorreu com o EGFET. G/AZO/SP/FTO apresentaram respostas parecidas entre as concentrações 5 a 120 mg/dL para as medições US e UI, apresentando efeito memória com menor consequência. Na voltametria cíclica, o fator memória pareceu ter uma consequência maior, apresentando mesmo valor de ΔE para as concentrações de 40 a 120 mg/dL.

Portanto, os filmes AZO/FTO apresentaram resultados parecidos para ambos biossensores, corroborando com o resultado em função do pH onde os filmes responderam de forma linear por toda a faixa de pHs.

Em comparação com o substrato, os filmes AZO/SP/FTO apresentaram melhora na resposta quando usados como sensores de pH. Como biossensores de ureia, os filmes U/FTO apresentaram um efeito memória menor em comparação à U/AZO/SP/FTO, no entanto, novamente a deposição do óxido melhorou a resposta dos biossensores para pHs mais básicos (maiores concentrações de ureia). Já como biossensores de glicose, tanto os filmes G/FTO quanto G/AZO/SP/FTO apresentaram respostas parecidas, com diminuição do efeito memória na medição US, e respostas nas mesmas faixas de concentrações. Com isso, a deposição dos AZO em substratos de FTO melhorou as respostas como sensores de pHs e biossensores de ureia, mas não obteve muita alteração como biossensores de glicose.

Os filmes AZO/SP/ITO apresentaram respostas em função dos pHs na faixa de 3 a 8, com sensibilidade em torno 24 mV/pH com ajuste linear de 0,99, indicando uma melhora em relação ao ITO. Os perfis voltamétricos apresentaram comportamento muito resistivo, impossibilitando o cálculo de ΔE . Quando imobilizada urease, os filmes U/AZO/SP/ITO apresentaram alta sensibilidade entre 40 e 120 mg/dL na medição UI (1,33 mV/(mg/dL)), seguida de uma saturação para as maiores concentrações. Na voltametria cíclica a medição US apresentou aumento linear dos ΔE s em função do aumento da concentração, indicando uma dificuldade da reação ocorrer ao invés de facilitar. Por fim, os filmes G/AZO/SP/ITO apresentou grande efeito memória. Na medição US, a sensibilidade entre as concentrações de 5 a 80 mg/dL foi de quase 3 mV/(mg/dL). No entanto, ao medirmos na voltametria cíclica, os filmes responderam melhor na medição US, mas com possível cálculo do ΔE somente entre as concentrações de 120 a 200 mg/dL, com diminuição linear em

função do aumento da concentração.

Os filmes AZO/SP/ITO também apresentaram uma melhora em relação aos filmes ITO quando usados como sensores de pH medidos no EGFET, mas apresentaram uma piora muito grande quando usados na voltametria cíclica. Como biossensores de ureia, também apresentaram uma melhora expressiva nas respostas, apresentando agora resposta na medição US, onde os filmes U/ITO não apresentaram resposta alguma, com sensibilidades altas para as maiores concentrações, onde o pH se torna mais básico e os filmes U/ITO não apresentam resposta alguma. Na medição UI, ambos U/ITO e U/AZO/SP/ITO responderam na mesma faixa de concentrações, mas com aumento muito expressivo da sensibilidade com a deposição do óxido de zinco. Por fim, como biossensores de glicose, ambos G/ITO e G/AZO/SP/ITO apresentaram sensibilidades altas na medição UI na mesma faixa de concentração, no entanto na medição US, somente G/AZO/SP/ITO apresentou resposta. Portanto, para os casos de sensores de pH e biossensores de ureia e glicose, a deposição do óxido de zinco melhorou as respostas em comparação à somente o substrato de ITO.

- TiO_2

Para os filmes de TiO_2 , os filmes depositados pela Rota 04 em substratos de FTO apresentaram os melhores resultados.

Quando depositados por spin-coat apresentaram melhores resultados quando depositados pela Rota 04 em substratos de FTO com 1 deposição com piora quando depositados com 5 deposições. Ambos não responderam de forma linear por toda a faixa de pHs, respondendo somente entre 2 e 4 e entre 4 e 8, com diminuição expressiva das sensibilidades com o aumento das deposições e aumento das barras de erros. A voltametria cíclica corroborou o resultado do EGFET, apresentando voltamogramas cíclicos diferentes entre os pHs 2 e 4, com voltamogramas muito parecidos para os outros valores de pH.

Como biossensores de ureia, o aumento do número de deposições melhorou muito a qualidade dos biossensores. Na voltametria cíclica, os resultados não foram de grande interesse.

Como biossensores de glicose, os filmes G/ TiO_2 /SC₁/FTO apresentaram

respostas de interesse, no entanto, o aumento de deposições melhorou muito a qualidade dos biossensores, com sensibilidade em torno de 6,18 mV/(mg/dL) por toda a faixa de concentração. Novamente, a voltametria cíclica apresentou respostas diferentes das apresentadas pelo EGFET, e sem interesse futuro.

Portanto, o número de deposições alterou de forma significativa a qualidade dos sensores, com piora em alguns casos em função do aumento do número de deposições, como no caso do sensor de pH, e melhora em outros, como nos casos dos biossensores de ureia e glicose.

Para a técnica de dip-coat, os filmes que apresentaram melhores respostas como sensores de pH foram os produzidos com 5 deposições mas com 4 horas de forno ($\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$), com sensibilidade de 38 mV/pH e ajuste linear de 0,99 para toda a faixa de pHs. Os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_1/\text{FTO}$ apresentaram sensibilidades para diferentes faixas de pH, sendo em torno de 40 mV/pH e ajuste linear de 0,85 entre os pHs 2 a 5 e 12,5 mV/pH com ajuste linear de 0,99 entre os pHs de 5 a 8. Os voltamogramas de ambos os filmes não apresentaram respostas de interesse. Os filmes depositados por dip-coat apresentaram espessura muito expressiva, com rachaduras por toda a superfície.

Como biossensores de ureia, o aumento do número de deposições também melhorou muito a qualidade dos biossensores, assim como no caso dos biossensores de glicose.

Portanto, para os filmes depositados por dip-coat, o aumento no número de deposições melhorou a qualidade de todos os sensores testados. Em nenhum caso a voltametria cíclica apresentou respostas de interesse.

Por fim, para os filmes depositados por casting, os filmes com 4 deposições apresentaram os melhores resultados como sensores de pH no EGFET e na voltametria cíclica. Neste caso, ambas as técnicas corroboraram nos resultados.

Como biossensores de ureia, o aumento do número de deposições depositadas alterou os resultados para ambas as medições. O filme $\text{U}/\text{TiO}_2/\text{CA}_1/\text{FTO}$ apresentou o melhor resultado na medição UI, com sensibilidade por toda a faixa de concentração. No entanto, com o aumento de deposições, parece que os filmes tendem a melhorar as respostas para as maiores concentrações, necessitando de estudos futuros mais aprimorados. Em nenhum caso, a voltametria cíclica

apresentou resultados de interesse.

Como biossensores de glicose, novamente o aumento do número de deposições alterou significadamente as respostas dos sensores. Nas medições UI, o aumento do número de deposições piorou a qualidade dos biossensores, como diminuição da faixa de concentração das respostas. A voltametria cíclica não apresentou resultados de interesse.

- Resumo

Os filmes AZO apresentaram resultados melhores em comparação com os substratos utilizados, com respostas de interesse tanto com o EGFET quanto com a voltametria cíclica. Os filmes TiO_2 apresentaram resultados com grande dependência do número de deposições, mas sem respostas de interesse pela técnica de voltametria cíclica.

Como sensores de pH, os filmes AZO/SP/FTO apresentaram os melhores resultados para os filmes AZO, e os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$ foram os que apresentaram linearidade por toda a faixa de pHs testada. Como biossensores de ureia, os filmes depositados por dip-coat apresentaram os resultados de maior interesse comercial, assim como biossensores de glicose. Para todos os filmes de TiO_2 a voltametria cíclica não apresentou resultados de interesse, enquanto que para todos os filmes AZO a voltametria cíclica apresentou resultados corroborando fielmente aos encontrados pelo EGFET.

Para facilitar o entendimento geral, a tabela 7.1 foi construída com os principais resultados de todos os filmes como sensores de pH, biossensores de ureia e biossensores de glicose no dispositivo EGFET.

Filme	faixa de pH	Sensibilidade (mV/pH)	[Ureia] (mg/dL)	Sensibilidade (mV/(mg/dL))	[Glicose] (mg/dL)	Sensibilidade (mV/(mg/dL))
FTO	2-6	37,8	5-80	1,74	5-120	1,2
ITO	2-4	37,0	5-120	0,22	5-80	3,18
AZO/FTO	2-8	27,0	5-120	0,9	5-120	0,55
AZO/ITO	3-8	24,2	40-120	1,33	5-80	2,96
TiO ₂ /SC ₁ /FTO	2-4	90,95	40-120	0,78	5-200	2,32
TiO ₂ /SC ₅ /FTO	2-4	49,1	5-120	3,32	5-200	6,18
TiO ₂ /DC ₁ /FTO	2-5	39,7	40-200	0,82	40-200	0,48
TiO ₂ /DC ₅ /FTO	2-8	37,9	5-200	0,23	5-160	6,31
TiO ₂ /CA ₁ /FTO	4-8	23,7	5-200	0,39	5-200	0,47
TiO ₂ /CA ₄ /FTO	2-6	41,8	5-160	0,47	5-160	0,51
TiO ₂ /CA ₈ /FTO	3-8	20,9	5-120	0,67	5-80	2,16

Tabela 7.1: Resumo das principais sensibilidades em função da faixa de respostas para os sensores de pH, biossensores de ureia e biossensores de glicose.

A tabela mostra as faixas de pH ou concentração onde os filmes responderam de forma linear, no qual foram retiradas os valores das sensibilidades.

7.2 Perspectivas

Atualmente existem sensores e biossensores no mercado na área médica, mas a otimização e aprimoramento é de grande interesse visando principalmente a diminuição dos custos. Com isso, ainda há muito o que pesquisar para finalmente termos sensores de pH e biossensores de ureia e glicose com menor invasão ao paciente, rápida resposta e baixo custo. Este trabalho colabora como pesquisa de base, de acordo com as pesquisas vigentes da literatura, para otimização dos processos de produção dos filmes finos de óxidos, com caracterizações morfológicas e elétricas para uso em futuros estudos. Com isso, podemos entender qual filme poderá ser totalmente descartado e qual deve ser estudado mais profundamente para evolução dos estudos.

Os filmes AZO/SP/FTO devem ser cuidadosamente estudados para uso como sensores de pH devido as respostas satisfatórias na faixa de pH de 2 a 8, assim como os filmes $\text{TiO}_2/\text{DC}_5/\text{FTO}$. Quando requeridos filmes com proteínas imobilizadas, os filmes de AZO apresentaram resultados de interesse para ambas as técnicas, enquanto que os filmes de TiO_2 não apresentaram respostas de interesse com a voltametria cíclica, devendo ser aprofundado o motivo dessa diferença entre as técnicas de caracterização elétrica. Os filmes depositados por dip-coat, apesar de apresentarem grandes fissuras nas superfícies, apresentaram as sensibilidades mais altas como biossensores, devendo ser mais aprofundado os estudos dos filmes depositados por esta técnica.

Com isso, trabalhos futuros poderão ser feitos com outros tipos de caracterizações elétricas e morfológicas, com passos mais avançados utilizando os melhores filmes com melhores respostas para cada situação, visando aperfeiçoar e aumentar as faixas de concentração e pHs utilizados.

REFERÊNCIAS¹

- [1] GALLI, A. *Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos*. Tese (Doutorado) — Doutorado em Ciências (Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- [2] SZE, S. M.; KWOK, K. N. *Physics of semiconductor devices*. 3. ed. [S.l.]: New Jersey : Wiley-Interscience, 2007.
- [3] STENGER, V. *Rugosidade superficial de camadas eletrodepositadas de óxido de cobre*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- [4] FERNANDES, E. G. R. *Imobilização de enzimas em plataformas (sub)microestruturadas para aplicação em biossensores*. Tese (Doutorado) — Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- [5] SILVA, M. F. C. G. D. *Voltametria Cíclica: Aplicações ao estudo de mecanismos de reacções induzidas por transferência eletrônica*. 2015. <http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/594/article/3000848/pdf>. Acessado em 19 de novembro de 2015.
- [6] BERGVELD, P. ISFET, Theory and Practice. In: *IEEE SENSOR CONFERENCE TORONTO*. [S.l.: s.n.], 2003. p. 26.
- [7] NASCIMENTO, R. A. S. *Quantificação de glicose intra e extra-celular por meio de biossensores micro e nanoestruturados: [Intra and extra-cellular glucose quantification by micro-nano-structured biosensors]*. Tese (Doutorado) — Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

- [8] SANTOS, J. C. D. C. *Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores*. Dissertação (Mestrado) — Dissertação de mestrado em Ciências - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- [9] SOARES, J. C. *Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol*. Tese (Doutorado) — Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- [10] DIP-COATING. <http://www.ahk-service.de/main/coating-technologies/beschichtungsverfahren/dip-coating/?L=1>. Acessado: 18/setembro/2015.
- [11] CONDELES, J. F. *Filmes finos de iodeto de chumbo (PbI_2) produzidos por spray-pyrolysis*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- [12] GALHARDO, K. S. *Construção de biossensores baseados em biomoléculas e líquidos iônicos*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Química (Físico-Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- [13] UNESP, G. de Plasmas e M. *Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IRS)*. 2014. <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>. Acessado em 14 de dezembro de 2015.
- [14] DOROSHENKO, I.; POGORELOV, V.; SABLINKAS, V. *Infrared Absorption Spectra of Monohydric Alcohols*. [S.l.]: Hindawi Publishing Corporation, 2013. <http://www.hindawi.com/journals/dpis/2013/329406/>. Dataset Papers in Chemistry.
- [15] DEPOSIÇÃO de filmes finos. <http://www.ccs.unicamp.br/cursos/fee107/download/cap11.pdf>. Acessado: 21/setembro/2015.

- [16] ALVES, O.; RONCONI, C. M.; GALEMBECK, A. Metallo-organic decomposition: A chemical approach to thin film deposition [Decomposição de precursores metalorgânicos: Uma técnica química de obtenção de filmes finos]. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 69–77, 2002.
- [17] OLIVI, P. et al. Preparation and characterization of a dip-coated SnO₂ film for transparent electrodes for transmissive electrochromic devices. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 140, n. 5, p. 81–82, 1993.
- [18] RUDINO, F. K.; TAKEUCHI, M. Morphological characteristics of perylene-doped phthalocyanine thin films and their photovoltaic effect. *Applied Surface Science*, v. 142, n. 1, p. 598–602, 1999.
- [19] NOGUEIRA, A.; PAOLI, M. D. A dye sensitized TiO₂ photovoltaic cell constructed with an elastomeric electrolyte. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, v. 61, n. 2, p. 135–141, 2000.
- [20] ZHANG, H. X. et al. Photoluminescence at 1.54 μm in sol-gel-derived, Er-doped BaTiO₃ films. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 308, p. 134–138, 2000.
- [21] SAFONOVA, O. V. et al. Two successive effects in the interaction of nanocrystalline SnO₂ thin films with reducing gases. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, v. 77, n. 2, p. 159–166, 2000.
- [22] ERHLICH, G. M.; SCHLEICH, D. M. The preparation and characterization of electrode materials for solid state batteries. *Sensors and Actuators: A. Physical*, v. 51, n. 1, p. 17–19, 1995.
- [23] ZHU, B. Fast ionic conducting film ceramic membranes with advanced applications. *Solid State Ionics*, v. 119, n. 1, p. 305–310, 1999.
- [24] OLIVEIRA, H. E. *Tecnologia Fotovoltaica em filmes finos (películas delgadas)*. Dissertação (Mestrado) — Monografia de especialização ? Departamento de Engenharia, Universidade Federal de Lavras - Minas Gerais, 2008.

- [25] PRATS-ALFONSO, E. et al. Iridium oxide pH sensor for biomedical applications. case urea/urease in real urine samples. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 39, n. 1, p. 163–169, 2013.
- [26] YIN, L.-T. et al. Glucose ENFET doped with MnO₂ powder. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 76, n. 1-3, p. 187–192, 2001.
- [27] CHEN, J.-C. et al. Portable urea biosensor based on the extended-gate field effect transistor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 91, n. 1-3, p. 180–186, 2003.
- [28] CHOUM, J.-C.; LI, J.-H.; LEE, T.-S. Preparation and characteristics of screen-printed calcium ion sensor. *Biomedical Engineering - Applications, Basis and Communications*, v. 21, n. 6, p. 381–384, 2009.
- [29] BRAEKEN, D. et al. Glutamate sensing with enzyme-modified floating-gate field effect transistors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 8, p. 2384–2389, 2009.
- [30] CHEN, C.-P. et al. Ultrasensitive in situ label-free DNA detection using a GaN nanowire-based extended-gate field-effect-transistor sensor. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 6, p. 1938–1943, 2011.
- [31] ARORA, K.; TOMAR, M.; GUPTA, V. Highly sensitive and selective uric acid biosensor based on RF sputtered NiO thin film. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 30, n. 1, p. 333–336, 2011.
- [32] BATISTA, P. D.; MULATO, M. ZnO extended-gate field-effect transistors as pH sensors. *Applied Physics Letters*, v. 87, n. 14, p. 1–3, 2008.
- [33] LI, G.-J.; KAWI, S. High-surface-area SnO₂: A novel semiconductor-oxide gas sensor. *Materials Letters*, v. 34, n. 1-2, p. 99–102, 1998.
- [34] BATISTA, P. D.; MULATO, M. Polycrystalline fluorine-doped tin oxide as sensing thin film. *Journal of Materials Science*, v. 45, n. 1, p. 5478–5481, 2010.

- [35] CHOU, J.-C.; CHIANG, J.-L. Ion sensitive field effect transistor with amorphous tungsten trioxide gate for pH sensing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 62, n. 2, p. 81–87, 2000.
- [36] BERTAUX, S.; REYNDERS, P.; HEINTZ, J.-M. Sintering of nanocrystalline Ta₂O₅ and ZrO₂ films compared to that of TiO₂ films. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 26, n. 6, p. 923–932, 2006.
- [37] ZHAO, R. et al. A ph sensor based on the TiO₂ nanotube array modified Ti electrode. *Electrochimica Acta*, v. 55, n. 20, p. 5647–5651, 2010.
- [38] BATISTA, P. D. *Dispositivos semicondutores a partir de óxidos de estanho e zinco*. Tese (Doutorado) — Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- [39] ZHAO, Z. ZnO-based amperometric enzyme biosensors. *Sensors*, v. 10, n. 2, p. 1216–1231, 2010.
- [40] FRAGA, T.; PEREYRA, I.; ALBERTIN, K. F. Production of TiO₂ nanotubes and nanoparticles. *ECS Transactions*, v. 39, n. 1, p. 131–136, 2011.
- [41] CHETTAH, H. et al. Electrosynthesis of TiO₂ oxide film on ITO substrate and electrochemical comparative study of the oxide with its hydrated gel. *Ionics*, v. 15, n. 2, p. 169–176, 2009.
- [42] MECHIAKH, R. et al. Elaboration and characterization of nanocrystalline TiO₂ thin films prepared by sol-gel dip-coating. *Surface and Coatings Technology*, v. 206, n. 2-3, p. 243–249, 2011.
- [43] YU, G. C.; YEN, S. K. The pH response drift of thermally grown titanium oxide thin films. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 150, n. 3, p. E190–E196, 2003.
- [44] YANG, L. et al. A review on TiO₂ nanotube arrays: Fabrication, properties, and sensing applications. *Chinese Science Bulletin*, v. 55, n. 4, p. 331–338, 2010.

- [45] GUERRA, E. M.; SILVA, G. R.; MULATO, M. Extended gate field effect transistor using V_2O_5 xerogel sensing membrane by sol-gel method. *Solid State Sciences*, v. 11, p. 456–460, 2009.
- [46] NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*. 3a. ed. [S.l.]: New York : W. H. Freeman and Company, 2002.
- [47] NASCIMENTO, R. A. S. *Análise de procedimentos de medida de dispositivos EGFET utilizando filmes de FTO*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Física Aplicada a Biologia e Medicina - Departamento de Física, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- [48] BERGVELD, P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*, v. 17, p. 70–71, 1970.
- [49] LIAO, H.-K. et al. Study on $pH_{(pzc)}$ and surface potential of tin oxide gate. *Materials Chemistry and Physics*, v. 59, n. 1, p. 6–11, 1999.
- [50] YIN, L.-T. et al. Study of indium tin oxide thin film for separative extended gate ISFET. *Materials Chemistry and Physics*, v. 70, p. 12–16, 2001.
- [51] YIN, L.-T. et al. Separate structure extended gate H^+ -ion sensitive field effect transistor on a glass substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 71, p. 106–111, 2000.
- [52] YIN, L.-T. et al. Characteristics of silicon nitride after O_2 plasma surface treatment for pH-ISFET applications. *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, v. 48, n. 3, p. 340–344, 2001.
- [53] GIMMEL, P. et al. Ta_2O_5 -gates of pH-sensitive devices - Comparative spectroscopic and electrical studies. *Sensors and Actuators*, v. 17, n. 1-2, p. 195–202, 1989.
- [54] LIAO, H.-K. et al. Study of amorphous tin oxide thin films for ISFET applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 50, n. 2, p. 104–109, 1998.

- [55] RESENDE, S. M. *A física de materiais e dispositivos eletrônicos*. [S.l.]: Editora da Universidade Federal de Pernambuco, 1996.
- [56] SEDRA, A. S.; SMITH, K. C. *Microelectronic Circuits*. [S.l.]: Oxford University Press, 2007.
- [57] THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 16, p. 121–131, 2001.
- [58] BERGVELD, P. The future of biosensors. *Sensors and Actuators, A: Physical*, v. 56, n. 1–2, p. 65–73, 1996.
- [59] CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, n. 6–7, p. 441–456, 2002.
- [60] SUGIMOTO, L. Biossensores: de tão simples e barato, as pessoas desconfiam. *Jornal da Unicamp*, n. 232, p. 8, 2003.
- [61] MALHOTRA, B. D.; TURNER, A. P. F. *Advances in Biosensors - Perspectives in Biosensors*. 1a. ed. [S.l.]: Elsevier Science BV, 2003.
- [62] FRADEN, J. *Handbook of modern sensors: Physics, designs and applications*. 4. ed. [S.l.]: Springer, 1996.
- [63] LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: Considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópios. *Química Nova*, v. 29, p. 1318–1325, 2006.
- [64] PAN, C.-W. et al. Solid-state urea biosensor based on the differential method. *IEEE SENSORS JOURNAL*, v. 6, n. 2, p. 269–275, 2006.
- [65] TORRES, K. Y. C. et al. Recent advances and new perspectives of ion-selective electrodes. *Química Nova*, v. 29, n. 5, p. 1094–1100, 2006.
- [66] FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T.; NETO, G. de O. Ion-selective electrodes: Historical, mechanism of response, selectivity and concept review. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 120–130, 2001.

- [67] SILVA, G. R. *Materiais micro e nanoestruturados para sensores de íons do tipo EGFET*. Tese (Doutorado) — Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- [68] KIM, D.-S. et al. An extended gate FET-based biosensor integrated with a Si microfluidic channel for detection of protein complexes. *Sensors and Actuators B*, v. 117, n. 2, p. 488–494, 2006.
- [69] SHINWARI, M. W.; DEEN, M. J.; LANDHEER, D. Study of the electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor (EISFET) with applications in biosensor design. *Microelectronics Reliability*, v. 47, n. 12, p. 2025–2057, 2007.
- [70] BUCK, R. P. Electrochemistry of ion-selective electrodes. *Sensors and Actuators*, v. 1, p. 197–260, 1981.
- [71] FUNG, C. D.; CHEUNG, P. W.; KO, W. H. A generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor. *IEEE Transactions On Electron Devices*, v. 33, n. 1, p. 8–18, 1986.
- [72] PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 4, p. 516 – 537, 2013. Acessado em 19 de novembro de 2015.
- [73] ANDRADE, L. S. et al. Estudo de efeito dos sais precursores sobre as propriedades eletrocatalíticas de eletrodos de Ti-SnO₂/Sb preparados por decomposição térmica [Study of the effect of precursor salts on the electrocatalytic properties of Ti-SnO₂/Sb electrodes prepared by thermal decomposition]. *Química Nova*, v. 27, n. 6, p. 866–872, 2004.
- [74] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2. ed. [S.l.]: Wiley, 2000.
- [75] CHIANG, J. L.; CHOU, J. C. Simulation and experimental study of the pH-sensing property for AlN thin films. *Japanese Journal of Applied Physics*, v. 40, p. 5900–5904, 2011.

- [76] BATISTA, P. D. et al. SnO₂ extended gate field-effect transistor as pH sensor. *Brazilian Journal of Physics*, v. 36, n. 2A, p. 478–481, 2006.
- [77] BOCKRIS, J. O.; REDDY, A. K. N.; GAMBOA-ALDECO, M. E. *Modern Electrochemistry 2A: Fundamentals of Electrodics*. 2. ed. [S.l.]: Springer, 2001.
- [78] KARUBE, I.; SYDENHAM, P.; THORN, R. *Handbook of Measurement Science*. 1. ed. [S.l.]: WILEY, 1992.
- [79] MARQUES, P. R. B. de O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática [Biosensors based on the enzymatic inhibition process]. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.
- [80] CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. de; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas [Immobilization of the enzymes on chromatographic supports: a tool to research of inhibitor compounds]. *Química Nova*, v. 32, n. 1, p. 175–187, 2009.
- [81] SUL, L. de Proteínas Tóxicas ? Universidade Federal do Rio Grande do. *Ureases - Aspectos Estruturais*. [S.l.]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. <http://www.ufrgs.br/laprottox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-aspectos-estruturais>. Acessado em 24 de setembro de 2015.
- [82] MEDICINE, N. M. L. S. . *Valores Normais do Açúcar no Sangue*. 2015. [http://www.news-medical.net/health/Blood-Sugar-Normal-Values-\(Portuguese\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Blood-Sugar-Normal-Values-(Portuguese).aspx). Acessado em 24 de setembro de 2015.
- [83] PORTUGAL, A. P. dos Diabéticos de. *Valores de Referência*. 2014. <http://www.apdp.pt/diabetes/a-pessoa-com-diabetes/valores-de-referencia#valores-de-referência>. Acessado em 24 de setembro de 2015.
- [84] CHIANG, J.-L. et al. Ion sensitivity of the flowerlike ZnO nanorods synthesized by the hydrothermal process. *Journal of Vacuum Science and Technology B : Nanotechnology and Microelectronics*, v. 27, n. 3, p. 1462–1465, 2009.

- [85] SILVA, R. F.; ZANIQUELLI, M. E. D. Aluminium doped zinc oxide films: formation process and optical properties. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 247, p. 248–253, 1999.
- [86] HU, X.; TAO, S. An optical fiber H_2O_2 -sensing probe using a titanium (IV) oxyacetylacetonate immobilized nafion coating on an bent optical fiber probe. *IEEE Sensors Journal*, v. 11, n. 9, p. 2032–2036, 2011.
- [87] NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J. Filmes de titânio-silício preparados por spin e dip-coating. *Química Nova*, v. 26, n. 5, p. 674–677, 2003.
- [88] DIAS, C. A. C. M.; JÚNIOR, H. R. P. Production and characterization of zinc oxide thin films intrinsic and doped with aluminum and boron [Produção e caracterização de filmes finos de óxido de zinco intrínsecos e dopados com alumínio e boro]. *Matéria*, v. 11, n. 3, p. 267–272, 2006.
- [89] ASHOUR, A. et al. Physical properties of ZnO thin films deposited by spray pyrolysis technique. *Applied Surface Science*, v. 252, n. 22, p. 7844–7848, 2006.
- [90] MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. *Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização, preparação, purificação com indicadores de segurança e de descarte de produtos químicos*. 2a. ed. [S.l.]: Editora Blucher, 2007.
- [91] PIJANOWSKA, D. G.; DAWGUL, M.; TORBICZ, W. Comparison of urea determination in biological samples by ENFETs based on pH and pNH_4 detection. *Sensors*, v. 3, n. 6, p. 160–165, 2003.
- [92] PIJANOWSKA, D. G.; TORBICZ, W. ph-ISFET based urea biosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 44, n. 1-3, p. 370–376, 1997.
- [93] SILVA, G. de O. *Biossensor de ureia utilizando dispositivo pH-EGFET*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.
- [94] FIORITO, P. A.; TORRESI, S. I. C. D. Glucose amperometric biosensor based on the co-immobilization of glucose oxidase (GOx) and ferrocene in poly(pyrrole)

- generated from ethanol / water mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 6, p. 729–733, 2001.
- [95] KOUDELKA-HEP, M.; ROOIJ, N. F. D.; STRIKE, D. J. Immobilization of enzymes on microelectrodes using chemical crosslinking. In: BICKERSTAFF, G. (Ed.). *Immobilization of Enzymes and Cells*. [S.l.]: Humana Press, 1997, (Methods in Biotechnology, v. 1). p. 83–85.
- [96] HOUSE, J. L.; ANDERSON, E. M.; WARD, W. K. Immobilization techniques to avoid enzyme loss from oxidase-based biosensors: A one-year study. *Journal of Diabetes Science and Technology*, v. 1, n. 1, p. 18–27, 2007.
- [97] INSTRUMENTS, T. *CD4007UB*. [S.l.]: Texas Instruments, 2003. <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/cd4007ub.pdf>. Original document from Harris Semiconductor.
- [98] CHI, L.-L. et al. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. *Materials Chemistry and Physics*, v. 63, n. 1, p. 19–23, 2000.
- [99] JUNIOR, S. V. C. *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. 1a. ed. [S.l.]: Editora ARTLIBER, 2004.
- [100] ALBERS, A. P. F. et al. A simple method for the characterization of clay minerals by x-ray diffraction [Um método simples de caracterização de argilominerais por difração de raios X]. *Cerâmica*, v. 48, n. 305, p. 34–37, 2002.
- [101] SOLOMONS, T. W. G. *Química Orgânica – Volume 1*. 10a. ed. [S.l.]: Editora LTC, 2012.
- [102] BATISTUTI, M. R. *Classificação de fungos através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.
- [103] KINETICS of the Oxidation of Fe^{2+} to Fe^{3+} . [http://academic.depauw.edu/harvey_web/Chem260/Chem%20260%20pdfs/Worksheet%20Keys/KineticsFe\(II\)ToFe\(III\)Key.pdf](http://academic.depauw.edu/harvey_web/Chem260/Chem%20260%20pdfs/Worksheet%20Keys/KineticsFe(II)ToFe(III)Key.pdf). Accessed: 2015-08-28.

- [104] AZIZ, M. A. et al. Electrochemical investigation of metal oxide conducting electrodes for direct detection of sulfide. *Electroanalysis*, v. 27, n. 5, p. 1268–1275, 2015.
- [105] SENTHILKUMARA, M. et al. Electrochemical instability of indium tin oxide (ITO) glass in acidic pH range during cathodic polarization. *Materials Chemistry and Physics*, v. 108, n. 2-3, p. 403 – 407, 2008.
- [106] LINS, V. F. C. et al. Effect of nickel and magnesium on zinc eletrowinning using sulfate solutions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 28, n. 3, p. 475 – 482, 2011.
- [107] ZHANG, B. et al. The role of oxygen vacancy in fluorine-doped SnO₂ films. *Physica B: Condensed Matter*, v. 406, n. 9, p. 1822–1826, 2011.
- [108] ZHANG, B. et al. The characterization of fluorine doped tin oxide films by Fourier Transformation Infrared spectrum. *Materials Letters*, v. 64, n. 24, p. 2707–2709, 2010.
- [109] ALVER, A.; KUDRET, A.; TEKEREK, S. Spray pyrolysis deposition of ZnO thin films on FTO coated substrates from zinc acetate and zinc chloride precursor solution at different growth temperatures. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 72, n. 6, p. 701–704, 2011.
- [110] IVANOVA, T. et al. Study of ZnO sol-gel films: Effect of annealing. *Materials Letters*, v. 64, n. 10, p. 1147–1149, 2010.
- [111] SAHOO, T. et al. Nanocrystalline ZnO thin films by spin coating-pyrolysis method. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 491, n. 112, p. 308–313, 2010.
- [112] WEN, R. et al. Influence of substrate temperature on mechanical, optical and electrical properties of ZnO:Al films. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 508, n. 2, p. 370–374, 2010.
- [113] BHADANE, H.; SAMUEL, E.; GAUTAM, D. K. Influence of post annealing on sol-gel deposited ZnO thin films. *Surface Review and Letters*, v. 21, n. 4, 2014.

- [114] AL-ASSIRI, M. S. et al. Synthesis, structural and electrical properties of annealed ZnO thin films deposited by pulsed laser deposition (PLD). *Superlattices and Microstructures*, v. 75, p. 127–135, 2014.
- [115] PARK, J.-H. et al. The x-ray single crystal structure of $[\text{Me}_2\text{In}(\text{acac})]_2$ and its use as a single-source precursor for the deposition of indium oxide thin films. *Journal of Materials Chemistry*, v. 11, p. 2346 – 2349, 2001.
- [116] OLIVEIRA, F. M. B. D. *Métodos solvotérmico assistido por micro-ondas aplicado à obtenção de nanocristais de ITO: deposição e caracterização de filmes de ITO*. Dissertação (Mestrado) — Mestrado em Química - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- [117] PURUSHOTHAMAN, K. K.; DHANASHANKAR, M.; MURALIDHARAN, G. Preparation and characterization of F doped SnO_2 films and electrochromic properties of FTO/NiO films . *Current Applied Physics*, v. 9, p. 67–72, 2009.
- [118] BANERJEE, A. N. et al. Synthesis and characterization of nano-crystalline fluorine-doped tin oxide thin films by sol-gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 28, p. 105–110, 2003.
- [119] PRAKOSO, S. P.; SALEH, R. Synthesis and spectroscopic characterization of undoped nanocrystalline ZnO particles prepared by co-precipitation. *Materials Sciences and Applications*, v. 3, n. 8, p. 530–537, 2012.
- [120] KHUN, K. et al. Fabrication of well-aligned ZnO nanorods using a composite seed layer of ZnO nanoparticles and chitosan polymer. *Materials*, v. 6, n. 10, p. 4361–4374, 2013.
- [121] HUSAIN, S. et al. Nickel sub-lattice effects on the optical properties of ZnO nanocrystals. *Journal of Optoelectronics Engineering*, v. 1, n. 1, p. 28–32, 2013.
- [122] SEGALA, K. et al. *In situ* and *ex situ* preparations of ZnO/poly-{trans- $[\text{RuCl}_2(\text{vpy})_4]$ /styrene} nanocomposites. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 10, p. 1986–1991, 2010.

- [123] SINGH, J. et al. Synthesis, band-gap tuning, structural and optical investigations of Mg doped ZnO nanowires. *CrystEngComm*, v. 14, p. 5898–5904, 2012.
- [124] CELIK, E. et al. ITO films on glass substrate by sol-gel technique: synthesis, characterization and optical properties. *Journal of sol-gel science and technology*, v. 50, p. 337–347, 2009.
- [125] YANG, R.-Y. et al. Effects of organic compounds on microstructure, optical, and electrical properties of ITO thin films prepared by dip-coating method. *Advances in Materials Science and Engineering*, v. 2012, 2012.
- [126] IUCHI, K. et al. *Oxytitanium phthalocyanine, process for producing same and electrophotosensitive member using same*. jan 1991. <http://www.google.com/patents/EP0409737A1?cl=zh>.
- [127] THAMAPHAT, K.; LIMSUWAN, P.; NGOTAWORNCHAI, B. Phase characterization of TiO₂ powder by XRD and TEM. *Natural Science*, v. 42, n. 5, p. 357–361, 2008.
- [128] TAMISELVAN, V. et al. Growth of rutile TiO₂ nanorods on TiO₂ seed layer deposited by electron beam evaporation. *Applied Surface Science*, v. 258, p. 4283–4287, 2012.
- [129] ALVES, V. A.; SILVA, L. A. da; BOODTS, J. F. C. Análise por difração de raios x de filmes de filmes de óxidos cerâmicos compostos por IrO₂/TiO₂/CeO₂. *Química Nova*, v. 23, p. 608–613, 2000.
- [130] YANG, X. et al. Anatase TiO₂ nanocubes for fast and durable sodium ion battery anodes. *Journal of Materials Chemistry A*, v. 3, n. 16, p. 8800–8807, 2015.
- [131] WU, W. Q. et al. Hydrothermal fabrication of hierarchically anatase TiO₂ nanowire arrays on FTO glass for dye-sensitized solar cells. *Scientific Reports*, v. 3, n. 1352, 2013.

- [132] CHOI, M.; YONG, K. A facile strategy to fabricate high-quality single crystalline brookite TiO_2 nanoarrays and their photoelectrochemical properties. *Nanoscale*, v. 6, n. 22, p. 13900–13909, 2014.
- [133] PAOLA, A. D.; BELLARDITA, M.; PALMISANO, L. Brookite, the least known TiO_2 photocatalyst. *Catalysts*, v. 3, n. 1, p. 36–73, 2013.
- [134] WU, M. C.; LEE, P. H.; LEE, D. L. Enhanced photocatalytic activity of palladium decorated TiO_2 nanofibers containing anatase-rutile mixed phase. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 40, n. 13, p. 4558–4566, 2015.
- [135] BERANEK, R.; KISCH, H. *Tuning the Optical and Photoelectrochemical Properties of Surface-Modified TiO_2* . <http://www.rsc.org/suppdata/pp/b7/b711658f/b711658f.pdf>. Supplementary Information.
- [136] GUPTA, S. K. et al. Synthesis, phase to phase deposition and characterization of rutile nanocrystalline titanium dioxide (TiO_2) thin films. *Applied Surface Science*, v. 264, p. 737–742, 2013.
- [137] ALMEIDA, R. M.; SAKKA, S. *Handbook of sol-gel science and technology: processing, characterization, and applications. Volume II: Characterization and properties of sol-gel materials and products*. 9a. ed. [S.l.]: Boston [u.a.] Kluwer Academic Publisher, 1976.
- [138] RESENDE, S. F. et al. Simple sol-gel process to obtain silica-coated anatase particles with enhanced TiO_2 – SiO_2 interfacial area. *Applied Surface Science*, v. 264, p. 737–742, 2013.
- [139] GULLEY-STAHLE, H. et al. Surface complexation of catechol to metal oxides: an ATR-FTIR, adsorption, and dissolution study. *Environmental Science Technology*, v. 44, p. 4116–4121, 2010.
- [140] KUMARI, D. *Vibrational spectroscopy of ion exchange membranes*. Dissertação (Mestrado) — Master of Science in Chemistry - Department of Chemistry and Chemical Biology - Northeastern University, 2011.

- [141] CASANOVA, J. R. et al. Structural characterization of supported nanocrystalline ZnO thin films prepared by dip-coating. *Applied Surface Science*, v. 257, n. 23, p. 10045–10051, 2011.
- [142] ARMELAO, L. et al. Sol-gel synthesis and characterisation of ZnO-based nanosystems. *Thin Solid Films*, v. 394, n. 1-2, p. 90–96, 2001.
- [143] MAROTTI, R. E. et al. Characterization of ZnO and ZnO:Al thin films deposited by the sol-gel dip-coating technique. *Thin Solid Films*, v. 517, n. 3, p. 1077–1080, 2008.
- [144] ZOPPI, R. A.; MORTEAN, N. H. R. Sol-gel titanium dioxide: Properties and electrochromic behavior [Dióxido de titânio sol-gel: Propriedades e comportamento eletrocromico]. *Química Nova*, v. 23, n. 6, p. 727–732, 2000.
- [145] TRASFERETTI, B. C.; DAVANZO, C. U.; ZOPPI, R. A. Infrared reflection-absorption characterization of TiO₂ films on ITO: Detection of LO modes. *Electrochemistry Communications*, v. 4, n. 4, p. 301–304, 2002.
- [146] YOLDAS, B. E. Hydrolysis of titanium alkoxide and effects of hydrolytic polycondensation parameters. *Journal of Materials Science*, v. 21, n. 3, p. 1087–1092, 1986.
- [147] YOLDAS, B. E. *Polymerized solutions for depositing optical oxide coatings*. aug 1982. <https://www.google.com/patents/US4346131>.
- [148] HAMASAKI, Y. et al. Photoelectrochemical properties of anatase and rutile films prepared by the sol-gel method. *Journal of the Electrochemical Society*, v. 141, n. 3, p. 660–663, 1994.
- [149] AIROLDI, C.; FARIAS, R. F. D. Alkoxide as precursors in the synthesis of new materials through the sol-gel process [Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel]. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 84–88, 2004.

-
- [150] MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. D. Organic compound solubility [Solubilidade das substâncias orgânicas]. *Quimica Nova*, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.
- [151] WINDHOLZ, M. *Merck Index of Chemicals and Drugs*. 9a. ed. [S.l.]: Editora Merck and Rahway (N.J.), 1976.
- [152] D'SOUZA, S. F. et al. Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 850–854, 2013.
- [153] D'SOUZA, S. F. et al. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to assay for urease from *pseudomonas aeruginosa* and *canavalia ensiformis*. *Analytical Biochemistry*, v. 331, p. 115–121, 2004.
- [154] SAEEDFAR, K. et al. Potentiometric urea biosensor based on an immobilised fullerene-urease bio-conjugate. *Sensors*, v. 13, p. 16851–16866, 2013.

ROTAS UTILIZADAS PARA PRODUÇÃO DOS FILMES FINOS DE ÓXIDOS DE ZINCO E DE TITÂNIO

A.1 Produção dos filmes - Óxido de zinco (ZnO)

A.1.1 Rotas

DIVERSAS rotas baseadas em artigos da literatura foram testadas para se chegar na produção final dos filmes de ZnO. A primeira rota testada, chamada de **Rota 01**, foi baseada nos artigos [141] e [142], e foi feita utilizando uma primeira solução contendo 0,01 mL de ácido acético glacial P.A A.C.S (Dinâmica) em 3,47 mL de água deionizada e adicionando essa solução a uma segunda solução com 4,386 g de acetato de zinco dihidratado diluído em 86,93 mL de etanol absoluto. A solução final foi agitada por uma hora a uma temperatura de 65 °C utilizando uma coluna de refluxo. Após pronta a solução foi depositado em substratos de vidro previamente limpos [84], como detalhado na seção 2.1.

As deposições foram feitas utilizando-se as técnicas de deposição dip-coat, spin-coat e spray-pyrolysis, e os parâmetros utilizados foram descritos no capítulo 2. Exceto para spray-pyrolysis os filmes foram produzidos com seis deposições com pré-aquecimento de 200 °C durante 5 minutos por deposição. Após as deposições, os filmes foram levados ao forno por 1 hora a 540 °C.

Os filmes produzidos pela Rota 01 não apresentaram resultados satisfatórios quando testadas no EGFET, isto é, nenhum dos filmes produzidos dentre as técnicas

de fabricação testadas apresentaram separação dos valores dos pHs. Com isso, optou-se por tentar uma segunda rota, chamada de **Rota 02**, que segue o mesmo procedimento da Rota 01 mas com a adição de 0,02 mol/L de um estabilizador chamado Dietanolamina P.A A.C.S(Dinâmica), como descrito na referência [143]. Visualmente, a solução preparada pela Rota 01 apresentava precipitação do sal de zinco poucos minutos após o término da agitação, o que não deveria ocorrer pois a concentração utilizada era baixa (0,01 mol/L). A escolha da Rota 02 foi feita visando eliminar essa precipitação, o que ocorreu de forma satisfatória.

Tanto para a técnica dip-coat quanto para spin-coat foram testados filmes com 6 deposições com pré-aquecimento de 200 °C por 5 minutos, 6 a 8 deposições com pré-aquecimento de 200 °C por 10 minutos e 6 a 8 deposições com pré-aquecimento de 275 °C por 10 minutos, totalizando 7 filmes para cada técnica. No entanto, nenhum desses filmes apresentaram resultados satisfatórios quando testados no EGFET, assim como os filmes feitos com a solução da Rota 01. Nenhum filme produzido por spin-coat apresentou ao menos resposta em corrente, isto é, o maior valor de corrente alcançado foi de 2,63 mA, enquanto que, por exemplo, para a mesma voltagem aplicada só no transistor, a corrente alcançada é de 5,67 mA. Já para os filmes produzidos por dip-coat, apesar de apresentarem valores razoáveis de corrente basicamente não apresentam separação dos valores de pH. O filme que apresentou melhor resposta em corrente com separação dos valores de pH foi o filme com 6 deposições e pré-aquecimento de 200 °C por 10 minutos. No entanto, a separação dos valores de pH não ocorre de forma linear como proposto pela teoria de Nernst.

Não foi encontrada nenhuma correlação direta entre as respostas dos filmes e o pré-aquecimento e/ou número de deposições.

Para a técnica de spray-pyrolysis foram depositados cinco filmes em substratos de vidro e três em substratos de FTO. Todos os filmes depositados sobre os substratos de vidro apresentaram valores altos de correntes, perto do valor do transistor, no entanto não apresentaram separação dos valores de pH.

Já os filmes depositados sobre os substratos de FTO apresentaram uma resposta mais adequada. Os três filmes apresentaram praticamente os mesmos valores de corrente para cada pH, demonstrando que os filmes são reprodutíveis. No entanto, os valores de pHs básicos quase não separaram, diminuindo a sensibilidade

do sensor. Quando medimos somente o FTO no EGFET, o mesmo ocorre para os pHs básicos, colocando em dúvida se as respostas obtidas são provenientes dos filmes ou basicamente dos substratos.

A partir destes resultados, uma terceira rota foi testada mantendo o sal precursor. Essa rota foi chamada de **Rota 03** e foi retirada da referência [32], onde 13,7 g de acetato de zinco dihidratado foram adicionadas em 100 mL de etanol absoluto. a esta solução adicionou-se mais 700 μL de ácido láctico, que também funciona como um estabilizador. A solução final foi agitada a 75°C por duas horas utilizando uma coluna de refluxo. Após a deposição por esta rota, os filmes foram levados ao forno por 1 hora a 540°C .

Considerando a técnica de dip-coat, foram depositados 2 filmes em substratos de vidro, sem pré-aquecimento e com 3 deposições, sendo que após cada deposição o filme secou a temperatura ambiente por 60 minutos. Um filme foi depositado com estes mesmos parâmetros em substrato de FTO. Tanto para os filmes em substratos de vidro quanto o filme em substrato de FTO apresentaram respostas satisfatórias em valores de correntes além de separação dos valores de pH. Os valores de corrente alcançados pelo filme depositado em substrato de FTO foram mais altos para os mesmos pHs do que os em substratos de vidro. Com esta nova rota os filmes apresentaram melhor separação para os pHs básicos, o que não ocorria quando utilizada a Rota 02. No entanto, os valores de sensibilidade variaram de 10,7 mV/pH (substrato de FTO) até 18,3 mV/pH (substrato de vidro), valores ainda muito abaixo da teoria de Nernst.

Ainda utilizando a técnica de dip-coat com 3 deposições, outro filme foi depositado em substrato de vidro mas agora utilizando pré-aquecimento de 275°C por 10 minutos. Esta pequena alteração piorou a qualidade de resposta do filme pois, além de apresentar uma sensibilidade ainda bem abaixo da esperada (13,3 mV/pH), as linhas referentes a cada pH se misturaram durante as medições. Em busca de uma resposta melhor, foram testados dois filmes, sendo um em substrato de vidro e um em substrato de FTO, mas agora com 4 deposições cada e com pré-aquecimento de 200°C por 10 minutos. Os parâmetros do pré-aquecimento utilizados nos filmes com 4 deposições foram escolhidos de acordo com os resultados anteriores (rotas anteriores) em função do pré-aquecimento.

O filme em substrato de vidro novamente não apresentou separação dos valores de pH enquanto que o filme em substrato de FTO apresentou o mesmo padrão do FTO, onde não há separação dos pHs básicos, trazendo novamente a dúvida da veracidade da resposta obtida em função do filme depositado frente ao substrato. Além desses filmes, mais três filmes foram depositados em substratos de vidro mas agora com 5 deposições. Dois destes filmes foram produzidos sem pré-aquecimento e com secagem a temperatura ambiente, sendo o primeiro com secagem por 5 minutos e o segundo por 20 minutos. Já o terceiro filme foi depositado com pré-aquecimento de 200 °C por 10 minutos, e foi o único que apresentou separação dos pHs, alcançando uma sensibilidade em torno de 17 mV/pH.

Com isso, mesmo havendo uma melhora nas respostas para alguns parâmetros, ainda assim os valores das sensibilidades obtidas foram muito abaixo da sensibilidade teórica, necessitando ainda aprimorar esses valores para esta técnica.

Para a técnica de spin-coat, assim como para o dip-coat, alguns parâmetros foram testados. Um filme com três deposições em substrato de vidro e com pré-aquecimento de 275 °C por 10 minutos não apresentou resposta alguma, enquanto que outro filme sem pré-aquecimento em substrato de FTO apresentou uma sensibilidade de 21,8 mV/pH.

Ao depositar 4 vezes em substratos de vidro, o filme sem pré-aquecimento e seco a temperatura ambiente por 30 minutos após cada deposição não resultou em um filme com seletividade dos pHs. Ao alterar o parâmetro do pré-aquecimento, dois filmes foram depositados utilizando pré-aquecimento de 200 °C por 10 minutos. O primeiro foi seco a temperatura ambiente após cada deposição e o segundo sem a secagem pós-deposição. Com isso, somente alterando-se o tempo de secagem pós-deposição de cada deposição obteve-se resultados totalmente diferentes, sendo o primeiro sem seletividade dos pHs e o segundo com sensibilidade de 12,0 mV/pH.

Ao repetir o último filme (com sensibilidade 12,0 mV/pH) em substrato de FTO, voltou-se ao problema da pouca separação em pHs básicos. Apesar da sensibilidade ser um pouco maior, em torno de 19,6 mV/pH, o r^2 é de 0,74, mostrando que os pontos não são lineares. O ajuste linear do filme em substrato de vidro foi de 0,95. A figura A.1 mostra ambos os resultados.

Ainda com 4 deposições em substratos de vidro, dois filmes foram depositados

Figura A.1: $V_{ref} \times pH$ dos filmes depositados por spin-coat com a Rota 03, com 4 deposições e pré-aquecimento por deposição de 200°C por 10 minutos em substratos de vidro (quadrados pretos - sensibilidade de 12 mV/pH com r^2 de $0,95$) e FTO (círculos vermelhos - sensibilidade de $19,6\text{ mV/pH}$ com r^2 de $0,74$).

utilizando pré-aquecimento de 275°C por 10 minutos, sendo um com secagem a temperatura ambiente por 30 minutos e outro sem essa secagem. Ambos não apresentaram seletividade dos pHs.

Da mesma forma, foram produzidos seis filmes em substratos de vidro com 5 deposições cada. Dois desses filmes foram depositados sem pré-aquecimento mas um filme com secagem a temperatura ambiente por 30 minutos e o outro sem a secagem, respectivamente. Outros dois filmes foram depositados com pré-aquecimento de 200°C por 10 minutos cada, com mesmo procedimento da secagem a temperatura ambiente, sendo um por 30 minutos e outro sem, e mais dois filmes foram depositados seguindo o mesmo processo de secagem pós-deposição mas com pré-aquecimento de 275°C por 10 minutos. Nenhum deles apresentou resposta.

Portanto, da mesma forma que ocorreu com alguns filmes depositados por dip-coat com uso da Rota 03, alguns filmes depositados por spin-coat apresentaram resultados com separação dos pHs, no entanto, também com sensibilidades ainda abaixo da teórica.

Por fim, considerando agora a deposição pela técnica de spray-pyrolysis, sete filmes foram depositados em substratos de vidro e três em substratos de FTO. Os parâmetros utilizados estão descritos na seção 2.3.1.

Quando depositados em substratos de vidro, os filmes não separaram os valores de pH, no entanto, em substratos de FTO, houve uma separação dos pHs, inclusive dos pHs básicos e os três filmes apresentaram valores muito próximos de corrente para cada valor de pH, demonstrando reprodutibilidade. As sensibilidades encontradas foram em torno de 25 mV/pH com r^2 de 0.99 para os três filmes.

Com isso, observou-se que independente da rota utilizada, a técnica de spray-pyrolysis sempre apresentava resultados mais confiáveis, principalmente em questão de reprodutibilidade. No entanto, as sensibilidades ainda estavam muito abaixo do esperado, fazendo com que outra rota fosse testada (**Rota 04**), na qual apresenta pequenas alterações em relação a Rota 03. Esta foi a rota utilizada para todos os filmes mostrados no capítulo 3 e foi descrita nele.

A.2 Produção dos filmes - TiO_2

A.2.1 Rotas

As rotas testada para produção dos filmes finos de TiO_2 foram baseadas em artigos e patentes da literatura vigente. No total, foram 4 rotas testadas, depositadas por dip-coat, spin-coat e casting. A proposta inicial foi baseada na utilização dos mesmos métodos de deposição para o ZnO e TiO_2 , visando comparação. No entanto, não foi possível a deposição dos filmes de TiO_2 por spray-pyrolysis, devido ao gel espesso formado pelas rotas com sal de titânio, e adicionado o casting, pelo mesmo motivo. Todos os filmes depositados pelas Rotas 01-03 foram ao forno por 1 hora a 400 °C, enquanto que os filmes depositados pela Rota 04 foram ao forno por 1 hora mas com temperatura de 200 °C.

A chamada **Rota 01** foi baseada principalmente nos artigos [144] e [145], onde 1200 μL de tetraisopropóxido de titânio (TTIP - Sigma-Aldrich) foram misturados com 30 mL de álcool isopropílico P.A A.C.S (Dinâmica) e 50 μL de HC P.A A.C.S (HCl - Dinâmica). A solução final (0,13 mol/L) foi agitada por 1 hora a temperatura ambiente e utilizada imediatamente. Somente dois filmes foram produzidos por esta técnica utilizando o spin-coater em substratos de vidro. Isso porque o gel formado foi tão espesso que não foi possível depositar por dip-coat. Para o primeiro filme foram realizadas 10 deposições (de 100 μL cada) com parâmetros de tempos de “subida”

e “descida” de 26 segundos cada, com frequência de 3000 rpm por 16 segundos, e a resposta no EGFET apresentou baixos valores de correntes, sem seletividade para os valores de pHs. Já no segundo filme foram realizadas 15 deposições (500 μL cada) com frequência de 2000 rpm por 8 segundos. Para o segundo filme, a solução foi agitada por 40 min ao invés de 1 hora para tentativa de se evitar o grau de hidrolização onde o gel já estava muito espesso. No entanto, somente o pH 07 apresentou resposta em corrente, apesar do valor muito baixo, enquanto os outros valores de pHs não apresentaram resposta alguma. Com isso, esta rota foi alternada para a chamada **Rota 02**, onde os mesmos reagentes foram mantidos, mas em proporções diferentes, de acordo principalmente com o artigo [146] e com a patente [147].

Nesta rota foram misturados 0,02 mL de HCl em 0,14 mL de água deionizada. Esta solução foi adicionada em 13,5 mL de álcool isopropílico e agitada a 50 °C até a formação do gel. Durante agitação o TTIP (1,12 mL) foi adicionado aos poucos. O gel se formou em torno de 10 minutos, e a deposição foi imediata.

A primeira deposição (em triplicata) foi feita seguindo os parâmetros propostos na referência [147], onde foram realizadas 4 deposições por spin-coat, com pré-aquecimento de 100 °C por 10 minutos e após cada deposição o filme foi levado ao forno a 400 °C por 1 hora. Os tempos de “subida” e “descida” do spin foram mantidos em 26 segundos cada, com frequência de rotação de 2000 rpm por 15 segundos. As respostas obtidas apresentaram valores baixos de corrente e sem separação dos valores de pHs. Este primeiro teste foi feito em substrato de ITO, seguindo exatamente os mesmos procedimentos, onde foram feitos 4 filmes. Além do mais, foram feitos mais dois filmes com alteração somente no tempo de pré-aquecimento por deposição, onde ao invés de 10 minutos os filmes foram pré-aquecidos por somente 5 minutos. Estes dois últimos filmes, com tempo de 5 minutos no pré-aquecimento, apresentaram respostas bem diferentes um do outro. O primeiro, apresentou uma sensibilidade de 23 mV/pH com 0.98 de ajuste linear, enquanto que o segundo, apresentou mistura dos valores de pHs, com sensibilidade de 5 mV/pH, demonstrando que não existe nenhuma chance de reprodutibilidade. Já os filmes pré-aquecidos por 10 minutos apresentaram respostas mais coerentes, como pode ser visto na figura A.2.

Figura A.2: $V_{ref} \times \text{pH}$ dos filmes produzidos por spin-coat com 4 deposições e pré-aquecimento de 100°C por 10 minutos, em substratos de ITO utilizando a Rota 02.

Pela figura A.2 podemos verificar que apesar da linearidade apresentada, as barras de erros são grandes principalmente para o pH 02. A sensibilidade média alcançada foi muito baixa, em torno de $9,7 \text{ mV/pH}$. Com isso, podemos perceber que a Rota 02 com os parâmetros descritos anteriormente começou a apresentar uma resposta em função dos valores de pHs, mas ainda com sensibilidades muito baixas e barras de erros grandes. Dois novos filmes foram depositados em substratos de FTO, sendo um com 4 deposições e pré-aquecimento de 100°C por 10 minutos (sendo a reprodução dos filmes anteriores mas em substratos de FTO) e outro com os mesmos parâmetros mas com 3 deposições. Ambas apresentaram mesmo padrão de respostas, sem separação dos pHs básicos, com valores de correntes muito próximos para cada valor de pH, demonstrando que além da falta de sensibilidade, o aumento de 3 para 4 deposições não influenciou na resposta.

Durante a deposição do gel sobre os substratos, verificou-se que o gel se formava muito rápido e em questão de poucos minutos já se tornava inviável a sua deposição, impossibilitando a realização de várias deposições, e dificultando a reprodutibilidade. O HCl é o agente responsável pela hidrólise da solução. A policondensação hidrolítica necessária para formação do gel ocorre em função da quantidade de água na solução e depois pela presença de uma quantidade crítica de

algum ácido [146]. Existe uma quantidade mínima de 0,3 mol/L do ácido por mol do alcóxido utilizado que deve ser utilizada na preparação da solução, assim como uma razão água/alcóxido de no mínimo 1,7 para que a deposição forme um filme contínuo [147]. Mesmo seguindo essas proporções na produção da rota, a formação do gel foi muito rápida.

Com isso, optou-se por realizar uma deposição por filme em diferentes tempos de formação do gel, isto é, com a mesma solução vários filmes com 1 deposição em substrato de vidro utilizando os parâmetros do spin-coat anteriores foram depositados em diferentes tempos. Após a preparação da solução, o gel começa a se formar após dez minutos. Com isso, os tempos de deposição dos filmes foram repectivamente após 10, 12, 14, 16, 18, 21, 25, 29, 33 e 36 minutos da preparação da solução.

Não foi encontrado nenhum padrão de resposta, sendo que os filmes depositados após 12, 18, 25 e 36 minutos não apresentaram respostas enquanto que os outros filmes apresentaram respostas aleatórias. A partir de 21 minutos os filmes começaram a apresentar respostas com correntes muito baixas, enquanto que para os filmes depositados com 10, 14 e 16 minutos foram os únicos que apresentaram valores de corrente altas, mas o filme depositado com 14 minutos não separou pHs básicos enquanto que os filmes depositados com 10 e 16 minutos apresentaram separação dos pHs. Com esses resultados, um novo teste foi feito, onde 2 até 10 deposições foram realizadas em substratos de vidro. Para *cada deposição* uma solução nova foi preparada e depositada após 10 minutos da sua preparação. Com isso, mesmo os filmes com um grande número de deposições foram produzidos, na medida do possível, com o gel em um ponto “padronizado” da hidrolização da solução. Todos os filmes não apresentaram resposta alguma, somente os filmes com 6, 7 e 9 deposições apresentaram resposta em corrente mas com valores muito baixos e sem seletividade dos pHs.

Concomitantemente com este teste, outro teste foi feito foram realizadas de 1 a 10 deposições por filme em substratos de vidro, onde agora uma solução foi feita *por filme*, em uma tentativa de verificar se o problema era realmente a formação rápida do gel, ou a solução em si, pela dificuldade em manter uma padronização da formação gel. Novamente, os filmes não apresentaram respostas em função do número de

deposições. Somente os filmes com 4 e 5 deposições apresentaram respostas em corrente mas, novamente, com valores muito baixos e sem seletividade para os valores de pHs.

A partir deste ponto, novos parâmetros do spin-coat foram testados ainda em substratos de vidro, sendo agora alterados para tempos de “subida” e “descida” de 17 segundos cada e frequência de rotação de 3000 rpm por 34 segundos, como descrito na seção 2.3.2. Todos os filmes, de 1 até 10 deposições não apresentaram resposta.

Concomitante aos testes por spin-coat, foram produzidos filmes utilizando a técnica de dip-coat. Em substratos de vidro, foram produzidos 5 filmes com 5 deposições e pré-aquecimentos de 100°C por 5 minutos. Todos apresentaram resposta sem padrão de reprodutibilidade, com valores de correntes baixos e sem seletividade dos valores de pHs. Ao reproduzir estes parâmetros em substrato de ITO, os filmes testados também não apresentaram respostas. Optou-se por tentar produzir filmes com 4 deposições ao invés de 5, devido a formação do gel como citado anteriormente. Um filme foi produzido em substrato de ITO com pré-aquecimento de 100°C por 5 minutos e outro no mesmo substrato mas com pré-aquecimento por 10 minutos. O primeiro apresentou resposta com altos valores de correntes mas sem separação dos pHs básicos, enquanto que o segundo apresentou separação de todos os valores de pHs mas com sensibilidade ainda baixa, em torno de 12 mV/pH. Mesmo com a sensibilidade abaixo do valor teórico, mais 3 filmes foram reproduzidos com estes parâmetros para testar reprodutibilidade e mais dois em substratos de FTO. Estes em substratos de FTO não apresentaram seletividade para pHs básicos.

A figura A.3 mostra o resultado da média dos 4 filmes em substrato de ITO.

As barras de erros são muito maiores para os pHs ácidos do que para os pHs básicos, no entanto, os filmes praticamente não apresentaram seletividade para os pHs básicos, justificando a barra de erro ser bem menor. A sensibilidade média alcançada foi de 39,6 mV/pH com ajuste linear de 0,96, mas somente entre os pHs 2 ao 6.

Com isso, mesmo alterando-se vários parâmetros e substratos, não foi possível a produção de um filme com alta sensibilidade em função dos pHs. Devido a alta viscosidade do gel formado pela Rota 02, optou-se por utilizar a técnica de deposição

Figura A.3: $V_{ref} \times \text{pH}$ dos filmes produzidos por dip-coat em substratos de ITO com a Rota 02, com 4 deposições e pré-aquecimento de 100°C por 10 minutos.

Casting, por ser uma técnica mais simples, onde foram depositados filmes de 1 a 4 deposições em substratos de vidro seguindo os procedimentos de pré-aquecimentos por deposição de 100°C durante 10 minutos. Nenhum filme apresentou resposta.

A partir desses resultados, procurou-se novas alternativas para produção dos filmes de TiO_2 . A referência [148] foi testada, pois praticamente todos os reagentes foram mantidos, com somente algumas alterações. Essa nova rota foi chamada de **Rota 03** e foi composta por duas soluções mantidas sob resfriamento para retardar a evaporação dos solventes. A primeira solução etanólica (100 mL) foi feita a partir de 29,6 mL de TTIP e mantida sob agitação e resfriamento, posteriormente misturada a uma segunda solução etanólica (100 mL) contendo $160\ \mu\text{L}$ de HCl e 2,7 mL de água deionizada, também mantida sob o mesmo processo de agitação e resfriamento.

As duas soluções foram misturadas a temperatura ambiente até a formação do gel, o que ocorreu após 2 horas. Mantendo-se os mesmos parâmetros da referência, 6 deposições foram realizadas por casting em substratos de vidro, com o mesmo pré-aquecimento por deposição de 100°C durante 10 minutos.

Com a alteração da rota os filmes depositados por casting apresentaram uma resposta com leve separação dos valores de pHs, com isso, optou-se por tentar reformular a Rota 02, na tentativa de “arrumá-la”. Dois testes foram feitos,

sendo o primeiro a reprodução da Rota 02, mas ao invés de álcool isopropílico colocou-se etanol, mantendo agora as soluções resfriadas até chegar no último passo de aquecimento, e o segundo refazendo a Rota 02 com o resfriamento e sem o aquecimento no final, deixando com que a hidrólise ocorresse a temperatura ambiente. Para ambos os testes manteve-se os parâmetros de 6 deposições com mesmo pré-aquecimento e tempo final de forno. Nenhum deles apresentou resposta alguma. Um outro teste foi feito em uma última tentativa de salvar essas rotas onde a Rota 03 foi refeita com álcool isopropílico no lugar do etanol. O filme depositado também não apresentou resposta.

Essa troca dos alcóois durante as rotas se deve as propriedades dos reagentes entre si, isto é, o tetraisopropóxido de titânio (cujá fórmula é $\text{Ti}(\text{CH}_3)_4$) é um alcóxido que reage com a água para formar o óxido de titânio. Um composto é chamado de alcóxido quando resulta da reação de um haleto metálico com um determinado álcool na presença de um receptor do ácido formado para deslocar a reação, ou então quando consiste na reação direta do próton do álcool com o metal, levando a eliminação de hidrogênio gasoso [149].

A principal diferença entre o etanol (fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e o álcool isopropílico (fórmula $\text{CH}_3\text{COHCH}_3$) na utilização destas rotas é que a dissolução do etanol é completa em água, devido as interações dipolo-dipolo entre as moléculas de água e etanol serem da mesma ordem de grandeza das interações dipolo-dipolo entre as moléculas só de etanol ou só da água [150], enquanto que no caso do álcool isopropílico apesar de miscível em água pura, quando em contato com uma solução salina o álcool isopropílico pode ser separado da solução aquosa devido a menor solubilidade do álcool isopropílico em solução salina em relação a água pura [151]. Com isso, a ordem de mistura dos reagentes altera gravemente o processo de reação entre eles. Mesmo assim, não foram encontradas melhoras nas produções dos filmes de TiO_2 .

A partir daqui, optou-se por alterar totalmente os reagentes utilizados a fim de se obter um filme fino de TiO_2 com alta seletividade de pHs. Para isso, outra rota foi testada, chamada de **Rota 04**, sendo feita uma solução etanólica 0,1 M com sal oxyacetilacetionato de titânio (IV) (fórmula $\text{TiO}(\text{AcAc})_2$ ou $\text{TiO}[\text{CH}_3\text{COCHCOCH}_3]_2$)– (Sigma-Aldrich); e 1% de Náfon[®] 117 (Sigma-Aldrich)

[86].

Esta rota foi depositada pelas três técnicas de deposição (dip-coat, spin-coat e casting) e todas elas foram feitas em substratos de vidro, ITO e FTO. Todos os filmes depositados com a Rota 04 foram ao forno por 1 hora a uma temperatura de 200 °C. Os resultados foram separados por técnica de deposição, mostrados no capítulo 5.

CARACTERIZAÇÃO POR FTIR DOS FILMES FINOS DE ÓXIDOS IMOBILIZADOS COM UREASE

B.1 Filmes U/AZO/SP/FTO e U/AZO/SP/FTO

A caracterização por FTIR desses filmes serão demonstradas no apêndice pois não foi possível caracterizar todos os filmes usados como biossensores de ureia e glicose, devido a problemas no equipamento por um período de tempo muito longo. Com isso, serão mostradas somente alguns filmes imobilizados com urease.

Para os filmes U/AZO/SP/FTO, a figura B.1 mostra a comparação entre os filmes com e sem imobilização.

Os filmes U/AZO/SP/FTO apresentou banda de extrema intensidade principalmente em torno de 1010 cm^{-1} , que se refere à ligação de estiramento C–N de aminas primárias e secundárias alifáticas e da amida (peptídica), presentes nas enzimas [152]. A figura B.2 apresentou a mesma banda, além de uma maior intensidade na região em torno de 3320 cm^{-1} , comumente associada à bandas de água, mas também pode ser associada à ligação de estiramento N–H de aminas primárias e secundárias alifáticas e de amidas de proteínas [152].

Figura B.1: FTIR dos filmes AZO/SP/FTO (linha preta) e U/AZO/SP/FTO (linha vermelha).

Figura B.2: FTIR dos filmes AZO/SP/ITO (linha preta) e U/AZO/SP/ITO (linha vermelha).

B.2 Filmes U/TiO₂/SC₁/FTO, U/TiO₂/DC₁/FTO e U/TiO₂/CA₈/FTO

A figura B.3 apresenta os espectros de absorbância dos filmes TiO₂/SC₁/FTO e U/TiO₂/SC₁/FTO.

Figura B.3: FTIR dos filmes TiO₂/SC₁/FTO (linha preta) e U/TiO₂/SC₁/FTO (linha vermelha).

Em torno de 841 cm⁻¹ os filmes U/TiO₂/SC₁/FTO apresentaram bandas referentes à ligação de balanço de amins primárias e secundárias [152]. Em torno de 916 cm⁻¹ uma banda de deformação angular de ácidos carboxílicos O-H pode ser visto [152]. Em torno de 1648 cm⁻¹ aparecem bandas C=O [153], em torno de 3260 cm⁻¹ tem ligação de estiramento N-H de amins primárias e secundárias alifáticas e de amidas de proteínas [152] e em torno de 2939 cm⁻¹ tem ligação de estiramento -C-H de alcanos de lipídeos e proteínas [152] [154].

A figura B.4 mostra os espectros de absorbância dos filmes TiO₂/DC₁/FTO e U/TiO₂/DC₁/FTO.

Todos as bandas apresentado pelo filme U/TiO₂/SC₁/FTO estão presentes para o filme U/TiO₂/DC₁/FTO, mas com menor intensidade.

Por fim, a figura B.5 mostra as respostas para os filmes depositados por

Figura B.4: FTIR dos filmes $TiO_2/DC_1/FTO$ (linha preta) e $U/TiO_2/DC_1/FTO$ (linha vermelha).

casting com 8 camadas.

Figura B.5: FTIR dos filmes $TiO_2/CA_8/FTO$ (linha preta) e $U/TiO_2/CA_8/FTO$ (linha vermelha).

A mesma banda referente à ligação de estiramento C–N foi encontrado com alta intensidade, além de bandas referentes aos grupos carbonatos, em torno de 1638

cm^{-1} [153].

○

○

○

Pattern : 01-070-4411		Radiation = 1.540600		Quality : Calculated	
Ti _{0.1} Sn _{0.9} O ₂					
Titanium Tin Oxide					
Lattice : Tetragonal					
S.G. : P4 ₂ /mm (136)					
a = 4.72360					
c = 3.16370					
Z = 2					
Mol. weight = 143.61					
Volume [CD] = 70.59					
Dx = 6.756					
I/Icor = 9.01					
Test from ICSD: REF. Journal of the American Ceramic Society, CLAS 4/mm (Hermann-Mauguin) - D4h (Schoenflies), PRS tP6. No R value given in the paper. (Code 51). At least one temperature factor missing in the paper. (C. ICSD Collection Code: 90868. Hypothetical Structure: Structure calculated theoretically. Structure calculated theoretically. ANX: AX2. Wyckoff Sequence: f a (P4 ₂ /MMN). Minor Warning: No R value given in the paper. No e.s.d. reported/abstracted on the cell dimension. Data collection flag: Ambient.					
Calculated from ICSD using POWD-12++					
Hirata, T., J. Am. Ceram. Soc., volume 83, page 3205 (2000)					
Radiation : CuKα1		Filter :			
Lambda : 1.54060		d-sp : Calculated spacings			
SS/FOM : F30=1000(0.0000,32)					