UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM FÍSICA
APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

“Biossensor de ureia utilizando dispositivo pH-EGFET”

Guilherme de Oliveira Silva

Dissertação apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências, e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia

Ribeirão Preto – SP

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM FÍSICA
APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

“Biossensor de ureia utilizando dispositivo pH-EGFET”

Guilherme de Oliveira Silva

Dissertação apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências, e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Associado Marcelo Mulato

Ribeirão Preto – SP

2013

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

Silva, Guilherme de Oliveira

Biossensor de ureia utilizando tecnologia pH-EGFET.
Ribeirão Preto, 2013.

68 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Mulato, Marcelo.

1. EnFET. 2. EGFET. 3. FTO. 4. Biossensor de ureia. 5. Sensor de íons.

Nome: Guilherme de Oliveira Silva

Título: Biossensor de ureia utilizando tecnologia pH-EGFET

Dissertação apresentada ao Departamento de Física da Faculdade de Filosofia, Ciências, e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Comissão Julgadora

Orientador: Prof. Associado Marcelo Mulato

2º Examinador:

3º Examinador:

Ribeirão Preto, de

de 2013

Dedico essa dissertação as interações da matéria com a própria matéria, o mais intrínseco e verdadeiro do universo: a Força Gravitacional, a Força Eletromagnética, as forças nucleares Forte e Fraca.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer aos companheiros de laboratório pela companhia, conversas, ajuda e todos os momentos de trabalho e descontração que estivemos juntos. Um grande e forte abraço ao Tobias, muito obrigado por todas as conversas a cerca da vida, da sociedade e do funcionamento dessas coisas em conjunto, a Natalia, por todos os galhos que me ajudou a quebrar, a Jessica, a pessoa mais boazinha do universo, ao Julio, Shirlei, Marina e Hugo, valeu!!!

Gostaria de agradecer a Cíntia Eleonora, pela ajuda, conselhos, dicas, truques, macetes e, especialmente, a paciência que exige me explicar tudo isso. Muito obrigado por tudo. O Meu Esquema é melhor assim, Happy Together.

Ao professor Marcelo, pela orientação para realizar esse trabalho.

A Capes, Fapesp e CNPq pela apoio financeiro.

Eu tô te explicando
Prá te confundir
Eu tô te confundindo
Prá te esclarecer
Tô iluminado
Prá poder cegar
Tô ficando cego
Prá poder guiar

TÔ – Tom Zé

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Índice de gráficos	iv
Índice de tabelas.....	vi
1. Introdução.....	1
1. 2 Objetivos.....	9
2. Materiais e Métodos.....	10
2. 1. Confecção das amostras.....	10
2. 2. Rotas de imobilização.....	11
2. 3. Descrição do sistema de medidas.....	12
2. 4. Descrição dos processos de medidas utilizados.....	14
2. 5. Cálculo da resistência de folha.....	14
2. 6. Experimentos utilizando EGFET.....	15
2. 7. Experimentos utilizando EnFET.....	16
2. 8. Teste dos métodos de imobilização utilizados.....	17
2. 9. Mudança no método de adição de ureia.....	18
2. 10. Otimização do ambiente de medida.....	18
2. 11. Degradação das amostras.....	18
2. 12. Determinação da região linear de responsividade.....	19
2. 13. Imagens feitas com Microscopia Eletrônica de Varredura.....	19

3. Resultados de Discussões.....	20
3. 1. Caracterização do filme fino de FTO.....	20
3. 1. 1. Cálculo da resistência de folha.....	20
3. 1. 2. Análise da morfologia superficial das amostras.....	22
3. 1. 3. Caracterização com medida V_{ds}	23
3. 1. 4. Caracterização com medida V_{gs}	26
3. 2. Influência da ureia na resposta do sensor.....	28
3. 3. Testes com hidróxido de amônio.....	30
3. 4. Testes dos métodos de imobilização utilizados.....	35
3. 5. Procedimento de adição de ureia.....	39
3. 6. Otimizando o ambiente de medida.....	41
3. 7. Reprodutibilidade e confiança.....	46
3. 8. Caracterização com MEV.....	50
3. 9. Determinação da região linear de resposta e cálculo da responsividade.....	53
4. Conclusões e Perspectivas.....	59
5. Referências bibliográficas.....	61

RESUMO

Silva, G. O.; **Biossensor de ureia utilizando dispositivo pH-EGFET**, Dissertação, Departamento de Física, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, 2013.

Palavras chaves: EnFET, EGFET, FTO, biossensor de ureia, sensor de íons.

Sensores são dispositivos capazes de captar um determinado sinal físico-químico do meio e converte-lo num sinal elétrico mensurável por meio de um transdutor. Biossensor é um sensor que tem como parte funcional um receptor biológico específico a determinado analito alvo. Os sinais físico-químicos experimentados por estes dispositivos são convertidos em sinais elétricos de magnitude proporcional à concentração de um ou mais compostos químicos. Neste trabalho, foi construído um sensor de pH utilizando filmes finos comerciais de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) como receptor a íons. O sensor foi feito ligando-se amostras de FTO ao terminal de porta de um transistor de efeito de campo do tipo MOS (*Metal Oxide Semiconductor*). Quando colocado em solução, os íons presentes interagem com a amostra sendo adsorvidos na superfície do filme de FTO. O potencial gerado pelos íons adsorvidos modulam a tensão na porta do transistor e, desta maneira, pode-se determinar a concentração dos íons presentes na solução de acordo com a magnitude da resposta do transistor. A este tipo de dispositivo dá-se o nome de EGFET (*Extended Gate Field Effect Transistor*). O EGFET construído apresentou responsividade de 55 mV/pH e resposta linear em soluções de pH 2 ao 12. Através de técnicas de imobilização enzimática foi possível ligar covalentemente proteínas urease sobre a superfície dos filmes de FTO, convertendo o sensor de pH em biossensor de ureia. Soluções tampão com diferentes pHs e concentrações foram testadas e determinou-se que as condições ideais para o uso deste biossensor de ureia são soluções tampão com pH = 6 e concentração de 10mM. Nessas condições, o biossensor apresentou uma responsividade de 114,5 mV/p(ureia) e linearidade no intervalo de concentrações de ureia entre $3,2 \cdot 10^{-4}$ e $3,2 \cdot 10^{-2}$ mol/L.

ABSTRACT

Silva, G. O.; **Urea biosensor based on pH-EGFET technology**, Dissertação, Departamento de Física, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, 2013.

Keywords: EnFET, EGFET, FTO, urea biosensor, ion sensor.

Sensors are devices capable of capturing a certain physical-chemical signal from environment and convert it into a measurable electrical signal by a transducer. Biosensor is a sensor which has a biological sensing element as receptor specific to a particular target analyte. The physical-chemical signals experienced by these devices are converted into electrical signals with magnitude proportional to the concentration of one or more chemical compounds. In this work, we built a pH-sensor using commercial thin films of tin oxide doped with fluorine (FTO) as ions receptor. The sensor was made by linking FTO samples to the gate of a field effect transistor MOS type. In solution, the ions interact with the sample being adsorbed on the surface of FTO film. The potential generated by the ions adsorbed on film's surface modulate the gate voltage of the transistor and, in this way, we can determine the concentration of ions present in solution correlated with the magnitude of the transistor response. This kind of device is given the name of EGFET (*Extended Gate Field Effect Transistor*). The EGFET built exhibits sensitivity of 55 mV/pH and linear response in the range of pH 2 to 12. Through enzyme immobilization techniques we could covalently bind urease proteins on the surface of FTO film, changing the pH-sensor in urea biosensor. Buffer solutions with different pHs and concentrations were tested and was determined that optimal environment conditions for this urea biosensor is buffer solutions with pH = 6 and 10mM of concentration. Under these conditions, the biosensor showed sensitivity of 114.5 mV/p(urea) and linear response in the range of $3,2 \cdot 10^{-4}$ to $3,2 \cdot 10^{-2}$ mol/L.

Índice de Figuras

Figura 1. 1 – Diagrama esquemático de sensores e biosensores.....	1
Figura 1. 2 – Diagrama esquemático de um MOSFET (a) e de um ISFET (b).....	3
Figura 1. 3 – Diagrama esquemático do EGFET proposto por Van der Spiegel et. all em (a) e seu aprimoramento proposto por Chi et. Al – 2000, em (b).....	4
Figura 2. 1 – Imagem de uma amostra pronta para ser utilizada.....	10
Figura 2. 2 – Diagrama esquemático do sistema de medidas e seus componentes.....	13
Figura 2. 3 – Diagrama esquemático do sistema de quatro pontas.....	15
Figura 3. 1 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície de uma amostra de FTO.....	22
Figura 3. 2 – Ilustração esquemática do procedimento de imobilização proposto por Pijanowska ⁴¹ , descrito na seção 2. 2.....	35
Figura 3. 3 – Ilustração esquemática do procedimento de imobilização proposto por Lue ³⁹ , descrito na seção 2. 2.....	36
Figura 3. 4 – Imagem de MEV de uma amostra nova com 1000x de magnificação.....	50
Figura 3. 5 – Imagem de MEV de uma amostra nova com 10000x de magnificação....	51
Figura 3. 6 – Imagem de MEV de uma amostra usada com 1000x de magnificação....	51
Figura 3. 7 – Imagem de MEV de uma amostra usada com 10000x de magnificação..	52
Figura 3. 8 – Imagem de MEV com a amostra inclinada e 10000x de magnificação....	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Resposta do EGFET para medida V_{ds} . Encarte: zoom da região delimitada pelas linhas pontilhadas.....	24
Gráfico 2 – Responsividade do EGFET em $\text{mA}^{1/2}/\text{pH}$	25
Gráfico 3 – Resposta do EGFET para medida V_{gs}	27
Gráfico 4 – Responsividade em mV/pH	28
Gráfico 5 – Medida V_{gs} utilizando soluções com diferentes concentrações de ureia.....	29
Gráfico 6 – Medida V_{gs} utilizando soluções de Hidróxido de amônio simulando a catálise total da ureia.....	32
Gráfico 7 – Medida V_{gs} utilizando concentrações de hidróxido de amônio necessárias para se obter os pHs desejados.....	34
Gráfico 8 – Resposta V_{gs} x Tempo frente a adição de alíquotas com diferentes concentrações de ureia em solução tampão 5mM e pH 6, utilizando o procedimento de imobilização enzimática descrito por Pijanowska et al.....	37
Gráfico 9 – Resposta V_{gs} x Tempo frente a adição de alíquotas com diferentes concentrações de ureia em solução tampão 5mM e pH 6, utilizando o procedimento de imobilização enzimática descrito por Lue et al.....	38
Gráfico 10 – Resposta V_{gs} x Tempo utilizando uma amostra nova para cada concentração de ureia. Medidas em solução tampão 5mM e pH 6.....	39
Gráfico 11 – Resposta V_{gs} x Tempo diluindo previamente a ureia em solução tampão 5mM e pH 6.....	40
Gráfico 12 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia para diferentes concentrações de solução tampão com pH 6.....	42
Gráfico 13 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia para soluções tampão com diferentes pHs e concentração 10mM.....	44

Gráfico 14 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia para diversos instantes.....	46
Gráfico 15 – Variação de resposta (V_{gs}) de uma mesma amostra quando reutilizada em duas séries de medidas.....	47
Gráfico 16 – Variação de resposta (V_{gs}) de uma mesma amostra frente sucessivas medidas utilizando $p(\text{ureia}) = -0,5$	49
Gráfico 17 – Resposta V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.....	54
Gráfico 18 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.....	55
Gráfico 19 – Derivada de V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.....	56
Gráfico 20 – Resposta V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ e $-3,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.....	57
Gráfico 21 – Resposta V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ e $-3,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.....	58
Gráfico 22 – Derivada de V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ e $-3,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.....	59

Índice de Tabelas

Tabela 1. 1 – Materiais já utilizados como filme sensível a íons em ISFETs/EGFETs...	7
Tabela 2. 1 – Experimentos realizados com EGFET.....	16
Tabela 2. 2 – Conversão entre as diferentes unidades de concentração de ureia.....	17
Tabela 2. 3 – Experimentos realizados para determinação do melhor ambiente de medida para o funcionamento do EnFET.....	18
Tabela 3. 1 – Valores obtidos utilizando o sistema de quatro pontas.....	21
Tabela 3. 2 – Concentração máxima de hidróxido de amônio gerada a partir da ureia..	31
Tabela 3. 3 – Concentrações de hidróxido de amônio necessárias para se obter diferentes pHs.....	33
Tabela 3. 4 – Variação de resposta para diferentes concentrações de solução tampão..	43
Tabela 3. 5 – Variação de resposta para soluções tampão com diferentes pHs.....	45
Tabela 3. 6 – Região de linearidade de alguns biossensores.....	55

1 – Introdução

Sensores são dispositivos capazes de captar um determinado sinal físico-químico do meio e converte-lo num sinal elétrico mensurável¹. Por sua vez, um biossensor é definido segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) como: “dispositivo integrado transdutor-receptor capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semiquantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico”². Em outras palavras: o biossensor é um sensor que tem como parte funcional da membrana sensível um receptor biológico específico a um analito alvo³.

Sensores e biossensores são formados de duas partes fundamentais: uma membrana sensível ao analito alvo que se deseja quantificar e um transdutor capaz de converter o sinal experimentado através da membrana em um sinal elétrico mensurável e de magnitude proporcional à concentração de um ou mais compostos químicos³. Os sensores podem ser classificados de acordo com o tipo de receptor empregado na região sensível como sensor de íons, sensor molecular, biossensor enzimático, biossensor genético, imunológico, etc⁴... E também podem ser divididos em categorias de acordo com o tipo de transdutor utilizado⁴, sendo classificados como sensores: eletroquímicos⁵, ópticos⁶, piezoelétricos⁷, magnéticos⁸ e termocalorimétricos⁹. Abaixo (fig. 1.1) pode ser vista a representação esquemática dos diferentes tipos de sensores:

Figura 1. 4 – Diagrama esquemático de sensores e biossensores.

Entre os vários tipos de transdutores disponíveis, sensores e biossensores construídos a partir de transdutores eletroquímicos são os mais difundidos, numerosos e

mais bem sucedidos comercialmente¹⁰. Este grupo de transdutores pode ser subdividido em diversas subclasses, cujas mais importantes são os transdutores amperométricos e potenciométricos.

Transdutores amperométricos funcionam a partir da corrente elétrica gerada através da transferência de elétrons das espécies envolvidas (reações de oxi-redução) com um eletrodo de trabalho polarizado em relação a um eletrodo de referência¹⁰. O primeiro biossensor amperométrico apresentado à comunidade científica foi utilizado para detecção de glicose e proposto em 1967 por Updike e Hicks¹¹ a partir do “eletrodo enzimático”, desenvolvido em 1962 por Clark e Lions e considerado como primeiro biossensor da história¹².

Sensores e biossensores que utilizam transdutores potenciométricos compõem um dos grupos mais antigos e bem estabelecidos de análise sensorial, que compreendem os eletrodos de vidro e todos os tipos dispositivos baseados em tecnologia MOS (*Metal Oxide Semiconductor*), dentre eles os ISFETs (*Ion Selective Field Effect Transistor*), EGFET (*Extended Gate Field Effect Transistor*) e todas suas derivações¹³. Neste tipo de sensor, íons são adsorvidos na superfície do eletrodo (de vidro ou íon seletivo), criando uma diferença de potencial entre este e o eletrodo de referência, que é quantificada pelo transdutor¹³.

Como dito anteriormente, sensores e biossensores funcionam a partir de uma grandeza físico-química ligada direta ou indiretamente à concentração do analito que se deseja quantificar. Dentre as grandezas mais utilizadas para quantificar o analito destaca-se o potencial hidrogeniônico (pH). O termo pH deriva da combinação de “p” da palavra “*potenz*”, que em alemão significa poder de concentração e “H” para o íon Hidrônio (H⁺), e indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa¹⁴. A medida do pH é um dos procedimentos mais importantes e mais frequentes utilizados em bioquímica, pois ele é capaz de alterar a estrutura e atividade das macromoléculas biológicas, bem como controlar a atividade catalítica das enzimas¹⁵. Matematicamente, o pH é definido como¹⁶:

$$pH = -\log \alpha H^{+} \quad (1.1)$$

onde αH^{+} representa a atividade dos íons H⁺.

Para soluções com concentrações menores que 0,1M os valores das atividades se aproximam do valor das concentrações, e a equação 1.1 pode ser reescrita como¹⁶:

$$pH = -\log H^+ \quad (1.2)$$

Os métodos comumente empregados na determinação do pH são feitos através de tira indicativa, a qual contém substâncias que mudam de cor de acordo com o pH da solução, ou através de um pHmetro, capaz de medir a variação de potencial entre um eletrodo de vidro combinado a um eletrodo de referência¹⁷. Todavia, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para determinação do pH¹⁷. Neste contexto, durante a década de 70 Bergveld utilizou o conceito de efeito de campo¹⁸, com o qual se tornou possível determinar a atividade iônica de determinado ambiente químico através do que chamou de ISFET (*Ion Sensitive Field Effect Transistor*). O processo de construção deste dispositivo é o mesmo utilizado na construção de MOSFETs (*Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*)¹⁹. A diferença entre os dispositivos MOSFET e ISFET consiste na ausência do eletrodo metálico de porta presente no MOSFET (fig. 1. 2 a), que fora substituído por um eletrodo de referência contido em uma solução eletrolítica diretamente em contato com o óxido isolante no ISFET (fig. 1. 2 b)²⁰.

Figura 1. 5 – Diagrama esquemático de um MOSFET (a) e de um ISFET (b).

A principal vantagem ao se utilizar ISFETs como sensores é a possibilidade de sua fabricação em massa e miniaturização a partir de tecnologias já disponíveis para produção industrial de semicondutores a base de silício e filmes finos²¹. No entanto, uma grande desvantagem de sua aplicação é a dificuldade do isolamento do corpo do

FET (*Field Effect Transistor*) do meio reacional, podendo ocasionar contaminações iônicas e, ainda, devido as suas dimensões reduzidas, aumenta-se o grau de dificuldade em realizar procedimentos de imobilização de receptores biológicos sobre a superfície do óxido exposto a solução²².

Na tentativa de reduzir os problemas de encapsulamento, Van der Spiegel e colaboradores propuseram em 1983 a modificação do ISFET em um dispositivo batizado de EGFET (*Extended Gate Field Effect Transistor*), onde pela primeira vez o óxido sensível a íons, embora ainda sobre um mesmo chip, estava separado do restante da estrutura do FET e ligado a ele pelo terminal de porta (fig. 1. 3 a)²³. O aprimoramento deste dispositivo veio no ano 2000, quando Chi e colaboradores utilizaram um filme de óxido de estanho conectado a um MOSFET comercial (fig. 1. 3 b) de alta impedância de entrada²⁴.

Figura 1. 6 – Diagrama esquemático do EGFET proposto por Van der Spiegel et. al em (a) e seu aprimoramento proposto por Chi et. Al – 2000, em (b).

As vantagens ao se utilizar o EGFET são claras: não há problemas de encapsulamento uma vez que o filme sensível a íons não está diretamente ligado ao corpo do FET, eliminando também as dificuldades de realizar processos de imobilização de receptores biológicos sobre a superfície do óxido isolante devido às dimensões reduzidas dos ISFETs. Não obstante, o dispositivo comercial (MOSFET) pode ser reaproveitado e utilizado como dispositivos descartáveis, bastando a simples troca do filme, sem a necessidade de construção de todo um novo componente eletrônico²⁵.

Os dispositivos embasados no conceito de efeito de campo (FETs) constituem os componentes eletrônicos mais comuns em chips lógicos de circuitos integrados²¹. Tem seu funcionamento modulado de acordo com a densidade dos portadores de cargas num canal condutor. Este canal condutor é gerado na interface entre o óxido isolante da porta e o semiconductor através do potencial aplicado entre o eletrodo de porta e a fonte (V_{gs}). Através da aplicação de um segundo potencial elétrico, este entre dreno e fonte (V_{ds}) e paralelo à superfície do óxido, gera-se uma corrente entre o dreno e a fonte, que por sua vez, tem intensidade que depende da densidade dos portadores de carga presentes na interface entre o semiconductor e o óxido isolante²¹. O funcionamento dos dispositivos ISFET e EGFETs é análogo, no entanto, o potencial entre porta e fonte (V_{gs}) é determinado através do potencial experimentado pela superfície do óxido que está em contato com a solução eletrolítica²¹. Matematicamente, temos:

$$V_{gs} = V_{ref} + dV \quad (1.3)$$

onde:

V_{ref} : potencial do eletrodo de referência;

dV : potencial na superfície do óxido.

Portanto, o valor do potencial aplicado ao terminal de porta (V_{gs}) no EGFET têm duas componentes: a primeira gerada através do potencial aplicado à solução eletrolítica pelo eletrodo de referência (V_{ref}) e a segunda componente (dV), oriunda do potencial gerado através adsorção de íons H^+ da superfície do óxido semiconductor²¹.

Diferentes técnicas têm sido empregadas na construção de filmes sensíveis ao pH a partir da deposição de óxidos e nitretos semicondutores. Dentre as técnicas mais utilizadas, podemos destacar *Sputtering*^{24, 26}, Sol-gel^{27, 28}, oxidação anódica²⁹, *Chemical Vapor Deposition*³⁰, *layer by layer*³¹, etc... Diversos também são os materiais utilizados como filme sensível a íons: pentóxido de vanádio²⁷, óxido misto de vanádio/tungstênio³², dióxido³³ e nitreto³⁴ de titânio, nitreto de rutênio³⁵, óxido de alumínio³⁶, óxido de Zinco²⁸, óxido de estanho^{24, 37}, entre muitos outros.

A busca de novos materiais é dirigida àqueles que possuem propriedades anfotéricas, isto é: capacidade de doar ou aceitar prótons de acordo com o meio reacional, princípio fundamental para detecção do pH¹⁹. Tal propriedade deriva da presença de grupos OH presentes na superfície dos filmes de óxidos semicondutores,

capazes de protonar e desprotonar quando em contato com soluções aquosas, tendo o potencial da superfície do óxido alterado por mudanças do pH^{18,38} e descrito pela equação de Nernst (eq. 1.4), que teoriza uma responsividade máxima de 59,15 mV/pH para esses tipos de sensores²⁰. Alguns materiais e suas respectivas responsividades podem ser vistos na tabela 1. 1.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]} \quad (1.4)$$

onde:

E^0 : Potencial de referência;

R: Constante universal dos gases perfeitos ($R = 8,31447 \text{ J/mol.K}$);

T: Temperatura (Kelvin);

n: Carga transferida ($n = 1$ para cátions, $n = -1$ para ânions);

F: Carga elétrica de um mol de elétrons ($F = 96480 \text{ J/V.mol}$);

[Ox]: Concentração das espécies oxidadas;

[Red]: Concentração das espécies reduzidas.

Tabela 1. 2 – Materiais utilizados como filme sensível a íons em ISFETs ou EGFETs.

Material	Fórmula Química	Responsividade mV/pH	Referencia
Pentóxido de Vanádio	V ₂ O ₅	58,1	27
Oxido Misto de Vanádio/Tungstênio	V ₂ O ₅ /WO ₃	68,0	32
Dióxido de Titânio	TiO ₂	58,7	33
Nitreto de Titânio	TiN	57,0	34
Nitreto de Rutênio	RuN	58,0	35
Oxido de Alumínio	Al ₂ O ₃	56,0	36
Óxido de Zinco	ZnO	38,0	28
Óxido de Estanho	SnO ₂	58,0	24
Pentóxido de Tântalo	Ta ₂ O ₅	51,8	39
Óxido de Háfio	HfO ₂	46,2	40
Nitreto de Silício	Si ₃ N ₄	45,0	41
Óxido de Lutetium	Lu ₂ O ₃	55,78	42
Óxido de Índium dopado com Estanho (ITO)	In ₂ O ₃ :Sn	58,0	43
Óxido de Estanho dopado com Fluor (FTO)	SnO ₂ :F	50,0	44

Ainda no que tange a aplicação de sensores a íons embasados em dispositivos EGFETs, estes podem ainda ser utilizados como plataforma para o funcionamento de biossensores através da imobilização de receptores biológicos sobre a superfície do filme sensível³. Em 1980, Janata & Moss reportaram o primeiro EnFET (*Enzymatic Field Effect Transistor*) sensível a penicilina⁴⁵, abrindo o caminho para uma vasta gama de biossensores que seriam desenvolvidos mais tarde a partir da imobilização de enzimas a superfície de filmes sensíveis a variação de pH. Subsequentemente, muitos EnFETs foram empregados na detecção de compostos de origem biológica, como ureia⁴¹, glicose⁴⁶, creatina⁴⁷, triglicerídeos⁴⁸ etc... E, ainda, na detecção de pesticidas⁴⁹, monitoramento ambiental⁵⁰, indústria alimentícia⁵¹ e diversas outras aplicações em detecção clínica, controle ambiental e em processos industriais^{52, 53, 54}.

Para fabricação de um EnFET, o material biológico deve ser ligado à superfície do filme sensível a íons do EGFET, desta maneira, a resposta do biossensor não

depende somente das características do material biológico imobilizado, como também da responsividade do próprio filme sensível a íons utilizado no EGFET⁴.

O procedimento onde uma enzima é ligada a um substrato com perda ou diminuição de sua mobilidade, sem que esta resulte na perda total da atividade catalítica, dá-se o nome de imobilização enzimática⁴. Tais rotas podem ser classificadas em três grupos de acordo com o tipo de ligação empregada: adsorção física^{55, 56}, aprisionamento⁵⁷⁻⁶⁰ ou por ligação covalente, que pode ainda ser feita diretamente à superfície do filme^{61, 62} ou com o auxílio de algum material capaz de se ligar aos grupos funcionais da superfície do filme e da proteína^{63, 64}. Métodos de imobilização a partir de ligações covalente têm se mostrado vantajosos quando comparados a métodos baseados em adsorção ou aprisionamento, provendo maior resistência mecânica, maior estabilidade em longo prazo e superando limitações causadas por processos de difusão das proteínas aprisionadas⁶⁵.

Mais frequentemente, a superfície do filme suporte é previamente modificada para criar grupos funcionais onde as proteínas são imobilizadas covalentemente através de grupos funcionais presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos expostos no exterior da proteína, o que resulta em uma ligação forte e irreversível entre filme e proteína⁶⁶. Os grupos funcionais requeridos para imobilização na superfície do filme são gerados a partir de tratamento químico e cada grupo funcional potencialmente disponível para imobilização em uma determinada proteína requer a presença de um grupo funcional específico na superfície do óxido⁶⁶.

A ureia é o produto terminal do metabolismo proteico em mamíferos, formada principalmente no fígado e levada através do sangue até os rins, onde é filtrada e eliminada por meio da urina e do suor¹³. Por ser um produto final do metabolismo humano, a concentração de ureia no sangue e urina permite estimar a função renal dos rins, e em concentrações elevadas (síndrome urêmica), acarreta a perda de função renal, eventualmente fatal se não tratada com diálise ou transplante¹³. O número de biossensores potenciométricos de ureia reportados na literatura é grande. Normalmente são construídos a partir da proteína urease, responsável pela catálise enzimática da ureia (eq. 1. 5). A urease é uma enzima barata, estável e disponível em várias formas com alto grau de pureza, portanto, é comumente empregada para investigação de novos

protocolos de imobilização, demonstração de potenciais utilidades de novos biossensores e no desenvolvimento esquemático para biossensoriamento¹³.

A catálise da ureia pela urease é dada por:

O biossensoriamento da ureia a partir de medidas de pH é possível devido aos produtos gerados no processo de hidrólise enzimática da ureia pela urease apresentarem propriedades proteolíticas (eq. 1. 5). Estes produtos alcalinizam o microambiente da superfície do filme sensível a íons do sensor de pH causando diminuição do potencial local, que é suficiente para ser utilizada como parâmetro de funcionamento em EnFETs²¹.

1.2 OBJETIVOS:

Os principais objetivos desse trabalho foram:

1. Construir um sensor de pH do tipo EGFET utilizando filme fino comercial de FTO como parte sensível a íons H⁺ e sua utilização para monitorar a variação de pH durante a reação de hidrólise da ureia pela urease;
2. Imobilizar a enzima urease sobre a superfície do filme de FTO transformando o sensor de íons (EGFET) em biossensor de ureia (EnFET);
3. Investigar e avaliar quais as melhores condições do ambiente de medida para utilização do EnFET como biossensor de ureia.

2 – Materiais e Métodos

2.1 Confecção das amostras

Chapas comerciais de filmes finos de óxido de estanho dopado com flúor (FTO: *Fluorine Tin Oxide*) depositado sobre substrato de vidro foram compradas da empresa Sigma Aldrich. O FTO é um óxido semicondutor transparente que tem se mostrado promissor na substituição do ITO (*Indium Tin Oxide*), óxido condutor mais relatado como eletrodo na literatura⁶⁷, por ter propriedades semelhantes a ele e menor custo de produção. Possui resistividade elétrica podendo variar de 10^{-3} a $10^{-4}\Omega\cdot\text{cm}$ conforme a concentração de dopantes e *band gap* de $3,5\text{eV}$ ⁶⁸, boa resistência mecânica, excelente morfologia superficial e possui ainda propriedades anfotéricas, característica requerida para aplicação como sensor de pH. As chapas adquiridas são anunciadas pelo fabricante como tendo resistência de folha de $7\Omega/\square$ e o filme depositado por *spray pyrolysis*.

As chapas foram cortadas e divididas em pedaços com dimensões de 26mm x 10mm. Sobre esses pedaços menores foi feito um contato elétrico no qual se ligou à superfície do filme um fio de cobre com o auxílio de uma cola tipo epóxi de prata. A amostra com o fio era levada a estufa a 70°C por 20 minutos para o processo de cura da cola epóxi, tornando o contato rígido. Ao retirar a amostra da estufa, o fio do contato elétrico era passado por dentro de uma pipeta de pasteur, que por sua vez fora fixada sobre a amostra formando um cabo. A fixação do cabo na amostra foi feita com araldite®, também utilizada para isolar toda a área superior da amostra, desta maneira isolando completamente o contato elétrico. A amostra já pronta pode ser visualizada na fig. 2. 1 abaixo:

Figura 2. 4 – Imagem de uma amostra pronta para ser utilizada sobre papel milimetrado.

2.2 Rotas de Imobilização

Neste trabalho foram utilizadas duas rotas de imobilização de proteínas via ligação covalente em filmes finos de óxidos semicondutores. A primeira delas foi descrita por Pijanowska et al. para imobilização de urease em filmes de nitreto de silício (Si_3N_4)^{41,69}, segundo o procedimento tal como é descrito abaixo:

1. Para eliminar possíveis contaminações contidas na superfície do filme sensível a íons, as amostras eram imersa por 20 minutos em acetato de etila;
2. Duas camadas de glutaraldeído foram depositados por *drop coating* na superfície da amostra a partir de 400µl de uma solução 2,5% de glutaraldeído. Após cada aplicação foi deixado que as amostras secassem por 1,5 horas em temperatura ambiente, para depois serem lavadas com água Milli-DI corrente;
3. Uma camada de enzima era depositada por *drop coating* a partir de 400µl de solução composta por 10mg de urease em 400µl em solução tampão 5mM e pH = 6;
4. As amostras secavam de um dia para o outro em temperatura ambiente. As enzimas não ligadas eram então removidas lavando a amostra em solução tampão 5mM e pH = 6 por 15 minutos, com o auxílio de um agitador magnético.

O segundo procedimento de imobilização utilizado neste trabalho foi descrito por Lue et al. e utilizado para imobilização de urease em filmes de Pentóxido de Tântalo (Ta_2O_5)³⁹. Procedimento:

1. As amostras eram imersas em solução de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 10% pelo período de 24 horas;
2. Depois, as amostras eram mantidas a 40°C em solução APTS (3-aminopropil-trietoxisilano) 9% por 4 horas;
3. Então as amostras eram imersas em solução de glutaraldeído 10% por uma hora;
4. Para então ser depositado uma camada de enzima via *drop coating*, a partir de uma solução contendo 1,5µg de urease em 1 ml de solução tampão 5mM e pH = 6;
5. As amostras eram então guardadas de um dia para o outro a 4°C, para então as enzimas não ligadas serem removidas via lavagem da amostra em solução tampão 5mM e pH = 6 por 15 minutos, com o auxílio de um agitador magnético.

2.3 Descrição do sistema de medidas

Neste trabalho utilizamos um MOSFET comercial modelo CD4007UB da Texas Instruments®. A arquitetura do CD4007UB é composta por seis MOSFETs internos, sendo três deles de canal n e os três restantes de canal p. Somente um dos MOSFETs internos de canal n foi utilizado. Como descrito anteriormente, para o funcionamento do EGFET, o MOSFET necessita de duas fontes de tensão contínua (V_{ds} e V_{ref}), que modulam a corrente entre dreno e porta (I_{ds}). Esta corrente foi monitorada através de um amperímetro ligado em série com terminal de dreno e a fonte de tensão V_{ds} . O sistema de medidas e todos seus componentes estão esquematicamente representados na figura abaixo (fig. 2. 2):

Figura 2. 5 – Diagrama esquemático do sistema de medidas e seus componentes.

O eletrodo de referência utilizado foi um eletrodo de calomelano saturado ($\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{Cl}_2$) com junção cerâmica (código 3.41 ER) do fabricante Sensotec Indústria e Comércio Ltda. Como fontes variáveis de tensão contínua foi utilizado o equipamento Agilent E364 Dual Output DC Power Supplies. O amperímetro utilizado foi o Data Acquisition HP 34970A. A fonte e o amperímetro foram ligados através de uma placa GPIB USB a um computador e tinham seus dados salvos para posterior análise e tratamento. Todos os parâmetros variáveis foram controlados através de um programa, do qual se controlavam os valores dos potenciais V_{ref} e V_{ds} , bem como a frequência amostral e o tempo total de amostragem.

O esquema ilustrado acima (fig. 2. 2) foi utilizado para trabalhar de duas maneiras distintas: como EGFET e como EnFET. Ao utilizar somente o filme sensível a íons feito de FTO (seção 2.1) trabalhamos o com o EGFET (*Extended Gate Field Effect Transistor*), ou seja, um sensor de íons H^+ ou pHmetro, e, ainda, realizando o procedimento de imobilização da enzima urease sobre o filme, trabalhamos como EnFET (*Enzymatic Field Effect Transistor*), utilizando o conjunto como biossensor de ureia.

2.4 Descrição dos processos de medidas utilizados

O sistema de medidas descrito na seção 2.3 foi utilizado para realizar três medidas distintas:

Medida V_{ds} : era fixado 5 volts de tensão entre o eletrodo de referência e o terminal da fonte (V_{ref}) enquanto a tensão entre dreno e fonte (V_{ds}) era variada com passos de 0,1 volts, até que V_{ds} atingisse o valor de 5 volts;

Medida V_{gs} : era fixado 5 volts de tensão entre os terminais de dreno e fonte (V_{ds}) enquanto a tensão entre o eletrodo de referência e o terminal da fonte (V_{ref}) era variada com passos de 0,1 volts, até que V_{ref} atingisse o valor de 5 volts.

Medida em tempo corrente: era fixado o valor de 5 volts em ambas as fontes ($V_{\text{ref}} = V_{\text{ds}} = 5$ Volts) e então a cada 250 milésimos de segundo era tomado o valor de corrente. Esses valores de tensão foram utilizados por serem os valores onde se obtém a melhor relação sinal-ruído para o CD4007⁷⁰.

2.5 Cálculo da resistência de folha

Para realizar a medida de resistência de folha do filme fino de FTO foi utilizado um sistema de quatro pontas como o ilustrado na figura 2. 3. A técnica consiste em injetar uma corrente a partir das pontas externas (1 e 4) enquanto se mede a queda de potencial entre as pontas internas (2 e 3)^{71,72}.

Prosseguindo com este método, foram medidos valores de corrente e suas respectivas queda de potencial e, a partir dos dados obtidos, foi determinada a resistência de folha da amostra. O procedimento foi realizado alternando-se a posição das quatro pontas em diversas direções para minimizar erros^{71,72}.

Figura 2. 6 – Diagrama esquemático do sistema de quatro pontas.

2.6 Experimentos utilizando EGFET

Nos experimentos utilizando EGFET o eletrodo de referência e o filme sensível a íons foram submergidos em um becker contendo 40ml da solução em que se desejava realizar a análise, então prosseguia-se com uma das medidas descritas na seção 2.4.

Depois, a membrana era lavada com água milli-DI e repetia-se o procedimento utilizando outra solução, conforme apresentado na tabela 2. 1, abaixo:

Tabela 2. 4 – Experimentos realizados com EGFET.

Experimento	Medida realizada (seção 2.4)	Soluções em que foram realizadas as medidas	Concentrações utilizadas
Caracterização V_{ds}	V_{ds}	Soluções tampão comercial	pHs: 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12
Caracterização V_{gs}	V_{gs}	Soluções tampão comercial	pHs: 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12
Influência da ureia na resposta do sensor	V_{gs}	Soluções aquosas de ureia	5, 20, 100, 150, 300, 450 e 600 mg/dL
Teste simulando catálise total da ureia com hidróxido de amônio	V_{gs}	Soluções aquosas de hidróxido em amônio	5,83; 23,33; 116,66; 174,99; 349,99; 524,99; 699,98 mg/dL
Teste da variação do pH com hidróxido de amônio	V_{gs}	Soluções aquosas de hidróxido de amônio	de $2,23 \cdot 10^{-6}$ a $\approx 2,0$ mg/dL
Monitoramento do pH durante a catálise da ureia pela urease	Tempo corrente	solução de urease 0,5mg/mL na qual era adicionado 200 μ L de ureia	5, 20, 100, 150, 300, 450 e 600 mg/dL

2.7 Experimentos utilizando EnFET

Antes de realizar qualquer medida com o EnFET, as amostras eram deixadas em solução tampão de mesma composição daquelas em que as medidas seriam realizadas durante 40 minutos, para depois dar início aos procedimentos de coleta de dados.

Após o término de cada medida a amostra era colocada novamente em solução tampão de mesma composição daquela em que estávamos utilizando, por intervalo de tempo igual ao utilizado para realizar a medida.

Todas as medidas descritas foram feitas com amostras novas. Após o procedimento de imobilização (que era realizado de um dia para o outro, seção 2.2), as

amostras que não eram utilizadas eram guardadas a temperatura 4°C e utilizadas ainda no mesmo dia.

Cada amostra foi utilizada para realizar apenas um experimento e depois descartada.

A notação utilizada para tratar as concentrações de ureia foi feita em $p(\text{ureia})$, similar a notação utilizada para concentração de íons H^+ (pH), temos:

$$p(\text{ureia}) = -\log[\text{ureia}] \quad (2.1)$$

Abaixo, a tabela 2.2 traz as conversões das quantidades de ureia utilizadas em diferentes unidades:

Tabela 2. 5 – Conversão entre as diferentes unidades de concentração de ureia.

$p(\text{ureia})$	mol/L	mg/dL
-0,5	$3,2 \cdot 10^{-1}$	190
-1,0	$1 \cdot 10^{-1}$	60
-1,5	$3,2 \cdot 10^{-2}$	19
-2,0	$1 \cdot 10^{-2}$	6
-2,5	$3,2 \cdot 10^{-3}$	1,90
-3,0	$1 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-1}$
-3,5	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$1,90 \cdot 10^{-1}$
-4,0	$1 \cdot 10^{-4}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$
-4,5	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$1,90 \cdot 10^{-2}$
-5,0	$1 \cdot 10^{-5}$	$6,0 \cdot 10^{-3}$

2.8 Teste dos métodos de imobilização utilizados

O eletrodo de referência e o biossensor eram submergidos em um becker contendo 40ml de solução tampão 5mM e pH = 6. Através do software, estabelecia-se 5 segundos de atraso do instante em que o conjunto era submergido até começar uma medida em tempo corrente (seção 2.4). Neste instante era adicionado, com o auxílio de uma micropipeta, 200µL de solução de ureia. A corrente foi monitorada por 12,5 minutos (3000 pontos). Para evitar diluição do meio, as soluções de ureia foram preparadas com a mesma solução em que se realizava a medida. As concentrações de ureia utilizadas foram $p(\text{ureia}) = -0,5, -1,5, -2,5, -2,5$ e $-4,5$.

2.9 Mudança no método de adição de ureia

O eletrodo de referência e o biossensor eram submergidos em um becker contendo 40ml de solução de ureia já diluída em solução tampão 5mM e pH = 6. Através do software, estabelecia-se 5 segundos de atraso e o conjunto era submergido no instante em que se iniciava uma medida em tempo corrente (seção 2.4). A corrente era então monitorada por 12,5 minutos (3000 pontos). As concentrações de ureia utilizadas foram $p(\text{ureia}) = -0,5, -1,5, -2,5, -2,5$ e $-4,5$.

2.10 Otimização do ambiente de medida

Os experimentos para otimizar as condições do ambiente de medida ideal para o funcionamento do biossensor foram realizados com soluções tampões onde a ureia já havia sido previamente diluída, como descrito no experimento “Mudança do método de adição de ureia”, acima. Os experimentos realizados para otimizar as condições do meio ambiente de medida estão descritos na tabela 2. 3, abaixo:

Tabela 2. 6 – Experimentos realizados para determinação do melhor ambiente de medida para o funcionamento do EnFET.

Condição ambiental avaliada	Concentrações de ureia utilizadas	Concentração dos sais da solução tampão utilizadas	pHs utilizados
Concentração dos sais da solução tampão	$p(\text{ureia}) = -0,5, -1,5, -2,5, -3,5$ e $-4,5$	1, 5, 10, 25 e 100mM	6,00
pH da solução em que se realiza a medida	$p(\text{ureia}) = -0,5, -1,5, -2,5, -2,5$ e $-4,5$	10mM	4,85; 5,30; 6,00; 7,00 e 8,00

2.11 Degradação das amostras

No experimento para avaliar a degradação sofrida pelas amostras, foi utilizado o mesmo *setup* descrito no experimento acima, onde a ureia era previamente diluída nas soluções tampão, no entanto, apenas solução de ureia com concentração $p(\text{ureia}) = -0,5$ foi utilizada.

2.12 Determinação da região linear e responsividade

Nos experimentos para determinar a região de funcionamento linear foi utilizado o mesmo setup descrito no experimento acima, onde a ureia era previamente diluída nas soluções tampão. Para determinar a região linear foram utilizadas soluções tampão com concentrações de ureia contidas no intervalo entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$, variando-se de $-0,5$ (em termos de $p(\text{ureia})$) a cada medida realizada. Para calcular a responsividade na região linear as concentrações de ureia utilizadas estavam contidas no intervalo entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ a $-3,0$, variando-se de $-0,1$ a cada medida realizada.

2.13 Imagens feitas com Microscopia Eletrônica de Varredura

Todas as imagens de microscopia eletrônica de varredura deste trabalho foram feitas através de um equipamento da marca Zeiss, modelo EVO-50. As amostras foram recobertas com ouro durante 150 segundos por um pulverizador da marca Bal-Tec, modelo SDC-050 Sputter Coater.

As soluções tampão utilizadas neste trabalho em todos os experimentos utilizando o EnFET, como também nos procedimentos de imobilização enzimática, foram fabricadas através dos sais fosfato de sódio bibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e ácido cítrico anidro ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), compondo um tampão do tipo PBS (*Phosphate buffered saline*), conforme utilizados nos trabalhos acima citados^{39,41,69}.

A enzima utilizada foi a enzima urease EC 3.5.1.5 extraída de *Canavalia Ensiformis* (Jack Bean) tipo III 15000-50000 unidades por grama de sólido.

3 – Resultados e Discussões

3.1 Caracterização do filme fino de FTO

3.1.1 Cálculo da resistência de folha

Pode-se demonstrar que o valor da resistividade de determinado material é dada em um sistema de quatro pontas ideal, onde a amostra tem dimensões infinitas, por^{71,72}:

$$\rho = \frac{2\pi}{\left[\frac{1}{S_1} - \frac{1}{(S_1+S_2)} - \frac{1}{(S_1+S_2)} + \frac{1}{S_3}\right]} \cdot \frac{V}{I} \quad (3.1)$$

No sistema de quatro pontas utilizado neste trabalho, a distância entre as quatro pontas do sistema são idênticas, assim, $s = S_1 = S_2 = S_3$, e, portanto, a equação 3.1 se resume em:

$$\rho = 2\pi s \frac{V}{I} \quad (3.2)$$

Em casos reais são necessários fatores de correção devido a geometria da amostra envolvida, ao tamanho finito e a posição das pontas do sistema em relação amostra, assim, a expressão para resistividade de uma amostra real é dada por^{71,72}:

$$\rho = 2\pi s F \frac{V}{I} \quad (3.3)$$

Na eq. 3.3 a constante de correção “F” possui três componentes distintas, são elas:

F1: correção devido à espessura finita da amostra (t);

F2: correção devido às dimensões laterais serem finitas;

F3: correção relativa à posição das pontas de prova em relação às bordas.

Para filmes depositados sobre substrato isolante^{71,72}:

$$F_1 = \frac{\frac{t}{s}}{2 \cdot \ln\left\{\left[\sinh\left(\frac{t}{s}\right)\right] / \left[\sinh\left(\frac{t}{2s}\right)\right]\right\}} \quad (3.4)$$

como $t \ll S$ a equação 3.4, torna-se:

$$F_1 = \frac{\frac{t}{s}}{2 \cdot \ln(2)} \quad (3.5)$$

Nos casos em que $t \ll S$, os fatores geométricos de correção referente às dimensões finitas (F2) e posição das pontas de prova em relação às bordas (F3) podem ser considerados idênticos e iguais a um^{71,72}, ou seja:

Portanto, a resistividade é dada por:

$$\rho = \frac{\pi}{\ln 2} \cdot t \cdot \frac{V}{I} = 4,532 \cdot t \cdot \frac{V}{I} \quad (3.6)$$

Finalmente, dividindo o valor da resistividade pela espessura amostra, temos o valor da resistência de folha:

$$R_{folha} = \frac{\rho}{t} = 4,532 \frac{V}{I} \quad (3.7)$$

Tabela 3. 7 – Valores obtidos utilizando o sistema de quatro pontas.

Posição 1			Posição 2			Posição 3		
Potencial (mV)	Corrente (mA)	R (Ω)	Potencial (mV)	Corrente (mA)	R (Ω)	Potencial (mV)	Corrente (mA)	R (Ω)
3,10	1,50	2,07	3,04	1,54	1,97	3,08	1,56	1,97
4,13	1,99	2,07	4,28	2,18	1,96	4,02	2,03	1,98
5,35	2,55	2,10	5,56	2,83	1,96	6,04	3,05	1,98
6,43	3,05	2,11	6,68	3,40	1,96	7,47	3,79	1,97
7,76	3,73	2,08	8,07	4,11	1,96	8,68	4,31	2,01
8,87	4,27	2,08	9,98	5,08	1,96	10,00	5,07	1,97
$R_1 = \frac{\sum R}{6} = 2,08 \pm 0,12$			$R_2 = \frac{\sum R}{6} = 1,97 \pm 0,04$			$R_3 = \frac{\sum R}{6} = 1,98 \pm 0,11$		

A resistência de folha do filme fino de FTO é a média das medidas nas diferentes direções multiplicada pelo fator de correção devido à geometria da amostra, portanto:

$$\begin{aligned}
 R_{\square} &= \left(\frac{R_1 + R_2 + R_3}{3} \right) * 4,532 \\
 &= \left(\frac{2,08 \pm 0,12 + 1,97 \pm 0,04 + 1,98 \pm 0,11}{3} \right) * 4,532 \\
 &= 9,10 \pm 0,18 \Omega/\square
 \end{aligned}$$

3.1.2 Análise da morfologia superficial das amostras

Com a finalidade de investigar as características morfológicas do filme, optamos por realizar uma imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma amostra.

Figura 3. 9 – Imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície de uma amostra de FTO.

Na fig. 3. 1 temos a imagem via MEV feita da lateral de uma amostra de FTO. Da imagem pôde ser visualizada a altura da camada que compõe o filme de FTO depositado sobre o substrato de vidro. Esta espessura foi medida e apresenta aproximadamente 858 nanômetros. Nesta imagem a amostra estava posicionada formando um ângulo com a horizontal, portanto, a região onde pode se observar a espessura do filme separa a imagem em duas regiões: acima temos de fato a superfície do filme de FTO marcada com “a)” sobre a imagem e abaixo, em b), o que vemos é a região onde o substrato de vidro foi partido, formando ranhuras e trincos. Pôde também se notar em a) a homogeneidade da superfície formada pelo filme de FTO depositado.

Amostras com homogeneidade superficial já foram descritas como possuindo a característica de responderem rapidamente aos processos de adsorção e desadsorção de íons em sua superfície⁷⁰. A boa homogeneidade superficial e baixa resistência de folha encontradas caracterizam o filme de FTO como um bom candidato como camada sensível de sensores de pH embasados em EGFET.

3.1.3 Caracterização com medida V_{ds}

No gráfico 1 está representada a variação de resposta em corrente I_{ds} quando se faz a medida V_{ds} (seção 2.4) utilizando as soluções tampão comerciais com pH 2 a 12. Pudemos verificar o aumento da corrente de resposta I_{ds} com a diminuição do valor do pH no qual se realizava a medida. Quanto menor o valor do pH no qual a medida é realizada, maior é a concentração de íons H^+ presentes na solução, de maneira que uma maior quantidade de íons pôde ser adsorvido à superfície do filme, o que deu origem a uma maior contribuição dV para o potencial final aplicado a porta (V_{gs}) (eq. 1. 3). Assim, quanto menor o pH da solução, maior será o valor em que a corrente I_{ds} se estabiliza. Analogamente, conforme foi aumentado o valor do pH em que as medidas foram realizadas, diminuía-se oferta de íons H^+ em solução, dando origem a valores menores de dV , e assim, uma menor tensão final na porta (V_{gs}), que por sua vez acarreta em estabilizar a corrente I_{ds} em valores menores.

Gráfico 23 – Resposta do EGFET para medida V_{ds} . Encarte: zoom da região delimitada pelas linhas pontilhadas.

Na região contida entre os pontos $V_{ds} = 3$ e 5 volts do gráfico 1, temos o MOSFET operando em regime de saturação. Nesta região o potencial entre dreno e fonte (V_{ds}) é alto o suficiente para que todos os possíveis elétrons oriundos da polarização da tensão aplicada à porta (V_{gs}) contribuam para a corrente I_{ds} , de modo que ao aumentar a tensão V_{ds} , não há ganho significativo em corrente. Na região de saturação a corrente I_{ds} do MOSFET é dada pela equação²⁴:

$$I_{ds} = \frac{\mu_0 C_{ox}}{2} \frac{W}{L} (V_{gs} - V_T)^2 \cdot (1 + \lambda V_{ds}) \quad (3.8)$$

Onde:

μ_0 : mobilidade eletrônica no canal n do transistor;

C_{ox} : capacitância por unidade de área do oxido da porta;

W : espessura do canal;

L : comprimento do canal;

λ : fator de modulação do canal n do transistor.

Ao extrair a raiz quadrada de ambos os lados da equação 3. 8, torna-se evidente a relação linear entre a $\sqrt{I_{ds}}$ e a tensão entre porta e fonte (V_{gs}):

$$\sqrt{I_{ds}} = \left(\sqrt{\frac{\mu_0 C_{ox}}{2} \frac{W}{L} (1 + \lambda V_{ds})} \right) \cdot (V_{gs} - V_T) \quad (3. 9)$$

Gráfico 24 – Responsividade do EGFET em mA^{1/2}/pH.

Tomando os valores da corrente I_{ds} para cada pH à valor constante de V_{ds} contido na região de saturação, foi possível construir o gráfico 2. Foi escolhido o valor $V_{ds} = 4$ volts e traçado uma reta paralela ao eixo Y. Os ponto de intersecção desta reta com cada curva de pH nos gerou pontos de coordenadas $(V_{ds} = 4V; I_{ds_{pHx}})$. O gráfico 2 foi obtido plotando a raiz quadrada da corrente obtida através do gráfico 1 com $V_{ds} = 4$, pelo valor do pH em que foi realizada a medida, ou seja, os pontos do gráfico gráf. 2 possui coordenadas $(pH\ x; \sqrt{I_{ds_{pHx}}})$. A inclinação angular da reta que une os pontos do gráfico 2 nos mostra em quantas unidades varia a raiz quadrada da

corrente entre dreno e fonte ($\sqrt{I_{ds}}$) quando se varia o pH em uma unidade. A esta razão se dá o nome de responsividade do sensor de pH e seu valor tem unidades de $A^{1/2}/pH$.

Utilizando os procedimentos descritos acima, foi obtido para o FTO uma responsividade de $0,53mA^{1/2}/pH$.

3.1.4 Caracterização com medida V_{gs}

No gráfico 3 está representada a variação de resposta em corrente I_{ds} quando se faz a medida V_{gs} (seção 2.4) utilizando as soluções tampão comerciais com pH 2 a 12. Pudemos verificar um deslocamento para menores valores de V_{ref} , representado no eixo X, quanto menor o valor do pH em que se realizou a medida. Como anteriormente, quanto menor o valor do pH, maior é a concentração de íons H^+ presentes na solução onde se realizou a medida, e uma maior quantidade de íons foram adsorvidos na superfície do filme. Uma maior quantidade de íons está relacionada a um maior valor de dV , o que levou a um maior valor final de tensão na porta (V_{gs}) (eq. 1. 3). Assim, para um valor fixo de corrente I_{ds} no eixo das coordenadas, este valor foi alcançado para valores menores de V_{ref} quanto menor o pH em que a medida foi realizada. Analogamente, ao aumentar o valor do pH em que as medidas eram realizadas, se diminuía a oferta de íons H^+ presentes na solução, o que acarretava em dV menores, e, desta maneira, era necessário um maior o valor de V_{ref} aplicado pela fonte para que se atingisse o mesmo valor final de tensão V_{gs} e a mesma corrente I_{ds} pré-estabelecida.

Gráfico 25 – Resposta do EGFET para medida V_{gs} .

Para a construção do gráfico 4, foi tomado o valor de 2mA de corrente I_{ds} no gráfico 3, e, a partir desse valor, foi traçada uma reta paralela ao eixo X. A intersecção dessa reta com as curvas de corrente para cada pH nos gerou pontos cujas coordenadas são $(V_{ref_{pH\ x}}; I_{ds} = 2mA)$. O gráfico 4 foi obtido ao se plotar o valor obtido das intersecções da reta $I_{ds} = 2mA$ com as curvas de cada pH do gráfico 3, pelo próprio valor do pH em que se realizou a medida, isto é, os pontos do gráfico 4 tem coordenadas $(pH\ x; V_{ref_{pH\ x}})$. O coeficiente angular da reta de ajuste linear do gráfico 4 nos mostra em quantas unidades varia o valor do potencial na porta (V_{gs}) quando se varia o pH em uma unidade. Assim, obtivemos novamente a responsividade do sensor, mas agora em unidades de mV/pH.

Gráfico 26 – Responsividade em mV/pH.

Por este método, a responsividade média obtida a partir de 10 amostras de FTO adquirido da empresa Sigma Aldrich como filme sensível a íons no EGFET foi de 55mV/pH, valor maior daquele descrito na literatura vigente para o mesmo tipo de dispositivo utilizando filmes comerciais produzidos por outro fabricante⁴⁴. Este resultado está próximo do valor máximo teórico (59,15mV/pH) e, além disso, sua responsividade possui valor maior a dos materiais que foram utilizado nos biossensores de ureia nos quais este trabalho embasa os procedimentos de imobilização enzimática (seção 2. 2), onde o nitreto de silício (Si_3N_4) exibiu responsividade de 45mV/pH e o pentóxido de tântalo (Ta_2O_5) 51,8mV/pH.

3.2 Influência da ureia na resposta do sensor

Foi necessário determinar se a presença de ureia não catalisada afetaria a resposta do filme sensível a íons. Em diagnóstico clínico a concentração aceita de ureia no plasma sanguíneo para uma pessoa considerada saudável está entre 5 a 15 mg/dL.

Para análises laboratoriais feitas a partir de amostras de urina, uma pessoa é considerada saudável quando apresenta concentrações de ureia menores que 60mg/dL, havendo registros de pacientes com concentrações de até 500mg/dl. Resultados acima destes valores apontam problemas nos rins e o paciente é encaminhado para tratamento à base de diálise ou transplante renal. Por este motivo, as concentrações de ureia testadas estão no intervalo de 5 a 600 mg/dL, abrangendo toda faixa utilizada em diagnóstico clínico.

Gráfico 27 – Medida V_{gs} utilizando soluções com diferentes concentrações de ureia.

No gráfico 5, soluções aquosas com diferentes concentrações de ureia foram utilizadas para realizar uma medida V_{gs} . Não foi possível visualizar nenhuma influência entre a concentração de ureia e a resposta do sensor. Mesmo ao variar a concentração em 120 vezes, as curvas de resposta não apresentam separações características quanto a alteração da quantidade de carga na solução. Na presença de água a ureia sofre diluição, isto é, ela não se dissocia na forma de íons carregados, como acontece com o NaCl, por exemplo. Variações na resposta seriam esperadas caso a ureia fosse capaz de alterar a concentração, consumindo ou provendo, íons da solução. Como as únicas cargas capazes de serem adsorvidas pelo filme são oriundas da própria solução na qual a ureia

foi diluída, não houve variação da corrente I_{ds} no gráfico 5, independente da concentração de ureia utilizada, e, portanto, pode se concluir que a presença de ureia não catalisada em solução não acarreta em variação na resposta do EGFET.

3.3 Testes com hidróxido de amônio

Do balanceamento estequiométrico da catálise da ureia pela urease (eq. 1. 5) sabemos que para cada mol de ureia são gerados dois mols de hidróxido de amônio, portanto, a partir de uma quantidade inicial conhecida de ureia, é possível calcular a variação de pH que seria provocada pela dissociação do hidróxido de amônio no caso hipotético em que toda ureia presente em solução tenha sido catalisada. Nessa condição, teremos:

No equilíbrio:
$$K_{NH_4OH} = \frac{[NH_4^+]_{final}[OH^-]_{final}}{[NH_4OH]_{final}} \quad (3. 11)$$

Como $[NH_4^+]_{final} = [OH^-]_{final}$ e $[NH_4OH]_{final} = [NH_4OH]_{inicial} - [OH^-]_{final}$, podemos reescrever a equação 3. 11, como:

$$K_{NH_4OH} = \frac{([OH^-]_{final})^2}{([NH_4OH]_{inicial} - [OH^-]_{final})} \quad (3. 12)$$

Portanto, teremos uma equação de segundo grau em $[OH^-]_{final}$:

$$[OH^-]_{final} = \frac{-K_{NH_4OH} + \sqrt{(K_{NH_4OH})^2 + 4 \cdot [NH_4OH]_{inicial} \cdot K_{NH_4OH}}}{2} \quad (3. 13)$$

Sabemos também que o pH mais a soma do seu cologarítimo (pOH) é igual a 14, matematicamente:

$$pH = 14 - pOH = 14 - (-\log[OH^-]) \quad (3. 14)$$

Substituindo eq. 3. 13 na eq. 3. 14, temos:

$$pH = 14 + \log \left(\frac{-K_{NH_4OH} + \sqrt{(K_{NH_4OH})^2 + 4 \cdot [NH_4OH]_{inicial} \cdot K_{NH_4OH}}}{2} \right) \quad (3.15)$$

Tabela 3. 8 – Concentração máxima de hidróxido de amônio gerada a partir da ureia.

Ureia (mg/dL)	NH ₄ OH (mg/dL)	NH ₄ OH (mol/L)	pH	ΔV _{gs} (mV/pH)
5	5,83	1,66.10 ⁻¹	10,38	-
20	23,332	6,66.10 ⁻¹	10,68	16,5
100	116,66	3,32	11,03	19,5
150	174,99	4,99	11,12	4,95
300	349,99	9,99	11,27	8,25
450	524,98	1,49.10 ¹	11,36	4,95
600	699,98	1,99.10 ¹	11,42	3,30

Desta maneira, para cada uma das concentrações de ureia utilizadas na seção anterior, foi calculada a quantidade correspondente em hidróxido de amônio, a variação máxima de pH e o valor em termos da variação de resposta (ΔV_{gs}) esperado para essa variação, vide tabela 3. 2. Sabemos que na prática essa variação será sempre menor do que a calculada, devido ao fato do rendimento da reação de catálise ser controlado pelo pH, de maneira que o próprio produto da reação influenciaria no seu rendimento.

Gráfico 28 – Medida V_{gs} utilizando soluções de Hidróxido de amônio simulando a catálise total da ureia.

No gráfico 6 é possível observar a variação do comportamento da corrente de resposta obtida ao se realizar a medida V_{gs} (seção 2.4) com as soluções feitas a partir das concentrações de hidróxido de amônio contidas na tabela 3. 2. Era esperado que as curvas estivessem separadas respeitando a ordem esperada: para um mesmo valor de corrente I_{ds} , curvas com menores valores de pH estariam deslocadas a esquerda do eixo X, de acordo com os valores para pHs contidos na tabela 3. 2. Porém, a resposta do EGFET para essas soluções não exibem o padrão de comportamento esperado, seja no espaçamento entre as curvas, como na ordem aleatória em que constam no gráfico.

O EGFET não foi capaz de separar as curvas a partir das variações máximas de pH obtidas para concentrações iniciais de ureia entre 5 e 600mg/dl. No entanto, na janela de concentração estudada, a variação de resposta causada pelas diferentes concentrações de ureia utilizadas foi muito pequena. Os cálculos mostram que mesmo entre a maior e a menor concentração de ureia, a variação em resposta esperada era de somente 57,2mV, o que corresponde a uma variação de apenas uma unidade na escala

de pH. Portanto, foi possível concluir no gráfico 06 que o filme utilizado não era capaz de detectar variações de pH provocadas entre aquelas concentrações, mas não tínhamos informação suficiente para afirmar que o filme não responderia a variações maiores do valor do pH. Isto excluiria o EGFET de uma possível aplicação em diagnostico clínico, mas abria portas de sua aplicação em outros setores tecnológicos.

Para construção do gráfico 6, sabíamos a concentração de ureia e estimamos o valor do pH final a partir do quanto aquela quantidade de ureia poderia gerar de hidróxido de amônio. Seguindo o raciocínio inverso, a partir do valor do pH final, pôde ser calculada a quantidade inicial de hidróxido de amônio necessário para obter aquele valor de pH . A quantidade de hidróxido de amônio inicial ($[NH_4OH]_{inicial}$), o pH atingido a partir desta quantidade e o valor correspondente em mV/pH podem ser visto na tabela 3. 3. Assim pudemos testar a resposta do EGFET para uma janela mais ampla de variação do pH. Resolvendo a equação 3. 15 para $[NH_4OH]_{inicial}$, temos:

$$[NH_4OH]_{inicial} = \frac{(2.10^{(pH-14)} + K_{NH_4OH})^2 - (K_{NH_4OH})^2}{4.K_{NH_4OH}} \quad (3. 16)$$

Tabela 3. 9 – Concentrações de hidróxido de amônio necessárias para se obter diferentes pHs.

pH	$[NH_4OH]_{inicial}$ (mol.L-1)	ΔV_{gs} (mV/pH)
7,5	3,22E-07	27,5
8	1,06E-06	27,5
8,5	3,72E-06	27,5
9	1,56E-05	27,5
9,5	8,72E-05	27,5
10	6,58E-4	27,5
10,5	5,87E-3	27,5
11	5,66E-2	27,5
11,5	5,59E-1	27,5

Gráfico 29 – Medida V_{gs} utilizando concentrações de hidróxido de amônio necessárias para se obter os pHs desejados.

No gráfico 7 estão os resultados obtidos de uma medida V_{gs} utilizando soluções de NH_4OH nas concentrações apresentadas na Tabela 3. 3. Pode ser observado que apesar das linhas apresentarem alguma separação, ela se dá de maneira aleatória e não respeitando a ordem esperada: para uma mesma corrente I_{ds} curvas deslocadas para menores V_{ref} quanto menor o pH no qual foi realizada a medida. Portanto, o filme não foi capaz de distinguir a variação de cargas presentes em solução feitas a partir de hidróxido de amônio, mesmo para variações de pH entre 7,5 a 11,5.

O fato do sensor de pH utilizando filme de FTO não ter sido capaz de responder a variações de pHs provocadas pelo hidróxido de amônio nos levou a optar em não prosseguir com o experimento “Monitoramento do pH durante a catálise da ureia pela urease”, seção 2.6.

3.4 Testes dos métodos de imobilização utilizados

As rotas de imobilização descritas na seção 2.2 foram testadas para se determinar qual seria a mais adequada para filmes de óxido de estanho dopado com flúor (FTO), visto que tais rotas foram utilizadas para óxidos diferentes. Os procedimentos descritos na seção 2.2 estão esquematicamente representados nas figuras fig. 3. 2 e fig. 3. 3:

Figura 3. 10 – Ilustração esquemática do procedimento de imobilização proposto por Pijanowska⁴¹, descrito na seção 2. 2.

Figura 3. 11 – Ilustração esquemática do procedimento de imobilização proposto por Lue^{39,69}, descrito na seção 2. 2

Os procedimentos de imobilização foram testados realizando uma “medida em tempo corrente” (seção 2.4) em solução tampão 5mM e pH = 6. O gráfico 8 contém a resposta obtida utilizando o método descrito por Pijanowska. O gráfico 9 contém a resposta obtida quanto utilizado o procedimento descrito por Lee.

No início do experimento, os potenciais de ambas as fontes estavam ajustados em 5 Volts ($V_{ref} = V_{ds} = 5V$), portanto, a tensão de porta (V_{gs}) que define a resposta do biossensor, dada pela equação 1. 3 ($V_{gs} = V_{ref} + dV$), era constante. Ao se adicionar uma alíquota de ureia na solução tampão, era esperado um decréscimo de corrente em resposta ao produto gerado da catalise da ureia pela urease (eq. 1. 5), que alcaliniza a microrregião entre a camada de enzimas e a superfície do filme, acarretando a diminuição do potencial na porta (V_{gs}). Portanto, depois de adicionado a ureia, era esperado que o sinal sofresse um decréscimo, até que a quantidade de ureia sendo catalisada permanecesse constante, fazendo com que a corrente atingisse um patamar

estável. Pudemos observar claramente a separação das curvas, com maior variação na resposta do biossensor ao se utilizar concentrações maiores de ureia, como pode ser vistos nas curvas para $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $p(\text{ureia}) = -1,5$ do gráf. 8, que possuem patamares com grande distanciamento das demais.

Gráfico 30 – Resposta V_{gs} x Tempo frente a adição de alíquotas com diferentes concentrações de ureia em solução tampão 5mM e pH 6, utilizando o procedimento de imobilização enzimática descrito por Pijanowska et al.

Gráfico 31 – Resposta V_{gs} x Tempo frente a adição de alíquotas com diferentes concentrações de ureia em solução tampão 5mM e pH 6, utilizando o procedimento de imobilização enzimática descrito por Lue et al.

Analisando os gráficos, pudemos notar que o procedimento descrito por Lee não foi viável para realizar a imobilização sobre o FTO. As curvas no gráfico 9 não exibem o padrão de espaçamento com as concentrações de ureia esperado. Por sua vez, no procedimento descrito por Pijanowska (gráf. 8), pudemos observar que o EnFET fora capaz, mesmo que minimamente, em diferenciar as concentrações de ureia utilizadas no experimento.

No entanto, ainda não podíamos afirmar com as informações do gráfico 8 que a variação entre as curvas de resposta dos gráficos não era oriunda de algum processo de degradação sofrido pelas enzimas. Na tentativa de elucidar este comportamento, foi proposto realizar a mesma análise feita anteriormente, mantendo as mesmas condições do experimento acima, no entanto, utilizando uma amostra nova para cada concentração de ureia utilizada.

Gráfico 32 – Resposta V_{gs} x Tempo utilizando uma amostra nova para cada concentração de ureia. Medidas em solução tampão 5mM e pH 6.

Como pôde ser observado no gráfico 10, ao utilizar amostras distintas para cada concentração de ureia o gráfico não exibiu a separação esperada de acordo a quantidade de ureia utilizada. Tornou-se evidente que a resposta final do biossensor no equilíbrio tinha relação com a amostra utilizada, sugerindo a existência de variações entre as amostras, ou ainda, que pequenas alterações de parâmetros não controláveis durante os procedimentos de imobilização, como a temperatura ou humidade do ar, dariam origem a respostas distintas entre si, fazendo-se então necessário a utilização da mesma amostra para se realizar cada experimento e devendo as comparações, quando feitas, utilizando a variação entre dois valores de potencial (V_{gs}).

3.5 Procedimento de adição de ureia

Ao analisar os gráficos da seção anterior, pode ser observado muito ruído na resposta do biossensor ao longo do tempo. Tais variações foram atribuídas ao método

como às alíquotas de ureia que foram adicionadas para realizar as medidas, isto porque ao se adicionar os 200 μ L de solução de ureia no becker contendo 40ml de solução tampão, onde estavam contidos o eletrodo de referência e o filme, era gerado um gradiente de concentração devido a difusão da ureia no meio e, não podíamos garantir que este processo acontecia de maneira igual durante as medidas. Na tentativa de minimizar essas variações foi realizado um novo experimento no qual diluímos a ureia diretamente nos 40mL de solução tampão, eliminando as variações oriundas do processo de difusão causado pela adição de ureia no meio.

Gráfico 33 – Resposta V_{gs} x Tempo diluindo previamente a ureia em solução tampão 5mM e pH 6.

No gráfico 11 estão plotadas as curvas de corrente obtidas ao longo do tempo, onde o eletrodo de referência e a amostra foram inseridos dentro de um becker contendo ureia diluída em solução tampão 5mM com pH = 6. Comparando os dados obtidos no gráf. 11 com as curvas do gráf. 8, onde as condições ambientais do experimento são mantidas e foi mudada a maneira com a qual a ureia foi adicionada ao meio, fica

evidente que ao proceder as análises com a ureia diluída previamente na solução tampão se diminui os ruídos da resposta do biossensor.

Vale ressaltar ainda que os experimentos realizados onde eram adicionadas alíquotas de solução de ureia à solução tampão, podem levar ao mau entendimento do que estava acontecendo: as concentrações de ureia utilizadas nesses experimentos dizem respeito à concentração da alíquota que foi adicionada ao meio e, portanto, a concentração final de ureia presente no ambiente onde se realizou a medida não seria a mesma daquela adicionada. Portanto, deste ponto em diante do trabalho, todos os experimentos foram realizados diluindo previamente a ureia nas soluções tampão nas quais seriam realizadas as medidas, e ainda, as concentrações descritas daqui em diante referem-se ao volume total de solução, ou seja, sobre os 40 mL.

3.6 Otimizando o ambiente de medida

Como exposto anteriormente, a resposta do biossensor não depende somente das características do material biológico imobilizado, mas também das características do próprio filme sensível a íons utilizado no EGFET. Além disso, o processo de imobilização enzimática altera a mobilidade e a estrutura tridimensional das proteínas, de maneira que as condições ambientais ideais de seu funcionamento não são as mesmas que as apresentadas pela enzima livre e necessitaram ser investigadas. Foram avaliados os dois parâmetros principais que têm impacto direto sobre a responsividade do EnFET: a concentração e o pH da solução tampão em que são realizadas as medidas, enquanto parâmetros como pressão e temperatura foram mantidos constantes.

Gráfico 34 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia para diferentes concentrações de solução tampão com pH 6.

Para avaliar o efeito da concentração da solução tampão foram realizadas medidas em tempo corrente utilizando tampões com concentração de 1, 5, 10, 25 e 100 mM. O EnFET não exibiu separação frente as concentrações de ureia quando utilizado com tampões de concentrações menores que 5 mM, sendo estas descartadas das análises. O gráfico 12 foi feito a partir da média entre 50 pontos em regiões onde a derivada das curvas de $V \times t$ eram as menores possíveis. Nota-se no gráfico 12 que o aumento da concentração do tampão desloca as curvas resposta para valores mais elevados de potencial, este comportamento remete ao fato da força iônica e capacitância da solução variarem linearmente com a concentração dos sais, portanto, ao aumentar a concentração do tampão, aumenta-se também a capacidade tamponante da solução, de maneira que os produtos gerados pela reação entre a ureia e urease são neutralizados mais rapidamente pelo meio, ocasionando um decréscimo na resposta do biossensor. A concentração do tampão foi avaliada através da diferença de resposta do biossensor entre as concentrações mais alta e mais baixa de ureia, os resultados calculados podem ser visualizados na tabela 3. 4.

Tabela 3. 10 – Variação de resposta para diferentes concentrações de solução tampão.

Concentração em p(ureia)	Resposta (V_{gs}) pela concentração do tampão pH = 6			
	5mM	10mM	25mM	100mM
-0,5	4,78	4,79	4,82	4,82
-1,5	4,80	4,81	4,86	4,85
-2,5	4,83	4,87	4,89	4,88
-3,5	4,88	4,90	4,91	4,93
-4,5	4,90	4,92	4,93	4,95
p(-0,5) – p(-4,5)	0,12	0,13	0,10	0,13

A variação de resposta máxima foi obtida utilizando tampão com concentração de 100mM, no entanto, esta variação foi apenas 1% maior do que quando utilizado tampão com concentração de 10mM. Portanto, escolhemos utilizar a concentração de 10mM para as soluções tampões nos próximos experimentos.

Para avaliar o valor do pH ideal da solução tampão foram realizadas medidas em tempo corrente utilizando soluções tampões com concentração de 10mM e pHs iguais a 4,85, 5,3, 6, 7 e 8. Os dados obtidos das curvas de V_{gs} x tempo foram utilizados para a construção do gráfico 13.

Gráfico 35 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia para soluções tampão com diferentes pHs e concentração 10mM.

Consta na literatura que o valor de pH igual a 9,3 é o máximo em que a urease ainda é capaz de manter suas propriedades catalíticas. Como os produtos da hidrólise da ureia alcalinizam o ambiente de medida, quanto maior o pH inicial de medida, menor será a variação em resposta do EnFET, por isso a resposta do biossensor para pH = 8 foi tão suprimida. Além disso, a atividade catalítica da enzima também tem que ser considerada e, a alteração de apenas algumas unidades para valores menores do pH ideal, também podem suprimir drasticamente a resposta do sensor, como visto nas curvas para pHs 4,85 e 5,3. O pH ideal do tampão também foi avaliado a partir da diferença de resposta do biossensor entre os pHs utilizados, tabela 3.5.

Tabela 3. 11 – Variação de resposta para soluções tampão com diferentes pHs.

Concentração em p(ureia)	Resposta (V_{gs}) ao pH				
	4,85	5,30	6,00	7,00	8,00
-0,5	4,89	4,87	4,79	4,77	4,77
-1,5	4,91	4,87	4,81	4,77	4,77
-2,5	4,92	4,90	4,87	4,81	4,78
-3,5	4,93	4,95	4,89	4,86	4,81
-4,5	4,94	4,94	4,91	4,89	4,81
 p(-0,5) – p(-4,5) 	0,05	0,07	0,13	0,12	0,04

A variação de resposta máxima foi obtida utilizando solução tampão com concentração 10mM e pH 6. Portanto, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando as condições ambientais em que a resposta do biossensor foi máxima.

Baseando-se nos experimentos realizados, foi possível verificar que as condições ideais para se utilizar o biossensor de ureia era solução tampão com concentração de 10mM e $\text{pH} = 6$. As medidas em tempo corrente foram então replotadas para obter o gráfico 14.

Gráfico 36 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia para diversos instantes.

No gráfico 14 temos curvas da resposta do biossensor (V_{gs}) contra as concentrações utilizadas nos experimentos, plotadas para valores de tempo diferentes. Pudemos verificar que as curvas para os instantes $t = 250$ e 375 segundos mostram apenas uma pequena variação em respostas (V_{gs}) para concentrações entre $p(\text{ureia}) = -2,0$ e $-3,5$, assim inferimos que tomar a média dos pontos no intervalo entre estes instantes seria o ideal para se utilizar como parâmetro de medida do EnFET.

3.7 Reprodutibilidade e confiança

Nos experimentos descritos acima, sempre foram utilizadas cinco diferentes concentrações de ureia, diluindo a concentração inicial utilizada ($p(\text{ureia}) = -0,5$) a cada medida posterior. Todavia, foi observado que ao se reutilizar o biossensor para realizar novamente as mesmo cinco medidas consecutivas (gráf. 15), estas estavam deslocadas para maiores valores de V_{gs} , ou seja, a variação de potencial causada pela mesma concentração de ureia foi menor nas repetições subsequentes.

Gráfico 37 – Variação de resposta (V_{gs}) de uma mesma amostra quando reutilizada em duas séries de medidas.

Devido a este comportamento foi necessário estimar quanto dessa variação correspondia às diferentes concentrações utilizadas e quanto dessa variação era devido à perda ou mudança de responsividade do biossensor decorrente do próprio uso. Para tal estimativa, foram realizadas medidas sucessivas utilizando somente a maior concentração ($p(\text{ureia}) = -0,5$) (gráf. 16). A escolha em utilizar a maior concentração foi devido ao fato de caso a própria ureia degradasse o filme, ao utilizar a maior concentração garantiríamos que esse efeito seria máximo.

Com os dados obtidos no gráfico 15 pudemos comparar o quanto a variação em resposta do biossensor era produzida pelas diferentes concentrações com a diferença de resposta obtidas para maior concentração da primeira e segunda série de medidas. A variação de resposta da maior e menor concentração da primeira série de medidas (linha preta do gráf. 15) foi:

$$\Delta V_{gs}[(-0,5) - (-4,5)] = |(p(\text{ureia}) = -0,5) - (p(\text{ureia}) = -4,5)|$$

$$\Delta V_{gs[(-0,5)-(-4,5)]} = 108mV \quad (3.16)$$

Enquanto que a variação de resposta utilizando as maiores concentrações da primeira série de medidas e da segunda série de medidas ((p(ureia) = -0,5) para primeira serie de medidas representada por “a” e p(ureia) = -0,5 da segunda série de medidas representada por “b”) foi:

$$\begin{aligned} \Delta V_{gs[(-0,5)a-(-0,5)b]} &= |(p(ureia) = -0,5)a - (p(ureia) = -0,5)b| \\ \Delta V_{gs[(-0,5)a-(-0,5)b]} &= 15mV \end{aligned} \quad (3.17)$$

Assim, podemos inferir que a variação de resposta devido a variação de concentração ($\Delta V_{gs[(-0,5)-(-4,5)]}$) corresponde a 86% da resposta, enquanto os outros 14% são atribuídos à perda de resposta devido a uma possível degradação da amostra.

De maneira análoga, podemos calcular a variação entre as repostas da maior e menor concentração para a segunda série de medidas (linha vermelha do gráf. 15):

$$\begin{aligned} \Delta V_{gs[(-0,5)b-(-4,5)b]} &= |(p(ureia) = -0,5)b - (p(ureia) = -4,5)b| \\ \Delta V_{gs[(-0,5)b-(-4,5)b]} &= 99mV \end{aligned} \quad (3.18)$$

O resultado obtido para variação de resposta entre a maior e menor concentração da segunda série de medidas foi de 99 mV. Este valor é cerca de 10% inferior a variação ocorrida para primeira série de medidas, sugerindo que a amostra realmente perdeu aproximadamente 10% de resposta a cada ciclo de cinco medidas consecutivas.

Na tentativa de estimar a degradação máxima causada pelo uso de uma mesma amostra, realizamos medidas sucessivas utilizando somente a maior concentração (p(ureia = -0,5)) (gráf. 16). A escolha em utilizar a maior concentração foi devido ao fato de caso a própria ureia degradasse o filme, utilizando a maior concentração garantiríamos que esse efeito seria máximo.

Gráfico 38 – Variação de resposta (V_{gs}) de uma mesma amostra frente sucessivas medidas utilizando $p(\text{ureia}) = -0,5$.

O gráfico 16 deixou evidente a diminuição de resposta do biossensor quando a mesma amostra é reutilizada diversas vezes para uma mesma concentração. Com os valores obtidos, calculamos a perda de resposta de maneira análoga às realizadas com os dados obtidos do gráf. 15, no entanto, como utilizamos somente uma concentração, a variação foi calculada em relação ao número de medidas realizadas sucessivamente:

$$\Delta V_{gs} = |(1^{\text{a}} \text{ medida}) - (5^{\text{a}} \text{ medida})| = 11 \text{ mV} \quad (3.19)$$

A perda em resposta calculada entre a primeira e a quinta medida utilizando a mesma concentração de ureia foi de apenas 11 mV, valor equiparável ao encontrando realizando o mesmo número de medidas, mas com diferentes concentrações (14 mV).

Calculamos ainda a variação de resposta entre as 10 medidas subsequentes realizadas:

$$\Delta V_{gs} = |(1^{\text{a}} \text{ medida}) - (10^{\text{a}} \text{ medida})| = 28 \text{ mV} \quad (3.20)$$

A variação de resposta obtida entre a primeira e a décima medida foi de 28 mV, o que corresponde a uma variação de 0,61% do valor obtido para o potencial V_{gs} da primeira medida.

3.8 Caracterização com MEV

Optamos por fazer imagens via microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de amostras novas com o intuito de verificar a presença de aglomerados proteicos ligados à superfície das amostras de FTO. Não obstante, realizamos também imagens de amostras que já haviam sido utilizadas em experimentos anteriores, o que possibilitou investigar possíveis alterações na morfologia superficial das amostras decorrentes ao uso.

Abaixo, podemos visualizar duas imagens de MEV das amostras novas, com diferentes magnificações:

Figura 3. 12 – Imagem de MEV de uma amostra nova com 1000x de magnificação.

Na fig. 3. 4 podemos visualizar a presença de três partes distintas, onde a) seria a própria superfície do FTO sem modificações, b) uma possível região onde se encontram ligados grandes aglomerados formados por glutaraldeído e em c) aglomerados proteicos.

Figura 3. 13 – Imagem de MEV de uma amostra nova com 10000x de magnificação.

Na fig. 3. 5 foi dado maior magnificação na região central da fig. 3. 4, podendo então ser melhores visualizadas estruturas semelhantes àsquelas assinaladas na imagem anterior.

As imagens seguintes foram obtidas utilizando amostras que já haviam sido utilizadas em experimentos onde se realizaram cinco medidas com diferentes concentrações de ureia.

Figura 3. 14 – Imagem de MEV de uma amostra usada com 1000x de magnificação.

Na fig. 3. 6 podem ser visualizadas estruturas semelhantes às encontradas nas amostras novas, sugerindo não existir remoção de aglomerados ligados causados pelo uso da amostra em experimentos. Este resultado já era esperado uma vez que tanto a proteína quanto o glutaraldeído se ligam por meio de ligação covalente, que é uma ligação forte, sendo necessário um grande gasto energético para que seja desfeita.

Figura 3. 15 – Imagem de MEV de uma amostra usada com 10000x de magnificação.

À imagem fig. 3. 7 foi dado uma maior ampliação na mesma região registrada na fig. 3. 6. Apesar de visualizar os aglomerados proteicos (fig. 3.7 – c), não é possível visualizar que eles estavam ligados diretamente a superfície do FTO, podendo estar ligados sobre outra estrutura, ou ainda, sobre um possível contaminante. Foi então realizada uma nova imagem com a amostra fazendo um ângulo com o plano horizontal (fig. 3. 8), onde pode ser visto que os aglomerados estão em contato direto com a superfície do FTO.

Figura 3. 16 – Imagem de MEV com a amostra inclinada e 10000x de magnificação.

3.9 Determinação da região linear de resposta e cálculo da responsividade

Após inferir os parâmetros ambientais ideais para utilização do biossensor, ainda se fez necessário investigar para qual janela de concentração ele deveria ser utilizado. É comumente descrito na literatura que para uma grande janela de concentrações de ureia as respostas de urea-ENFETs apresentam forma sigmoideal^{65,73}. No entanto, existe uma região em que sua resposta varia linearmente com a concentração utilizada. Nos experimentos anteriores a partir da concentração inicial ($p(\text{ureia}) = -0,5$), as soluções estavam diluídas em 10 vezes a cada medida subsequente (1,0 em termos de $p(\text{ureia})$). Realizamos outro experimento utilizando a mesma janela de concentração, no entanto, mais concentrações diferentes de ureia foram utilizadas (gráf. 17).

Gráfico 39 – Resposta V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.

No gráf. 17 foi plotado o sinal de resposta (V_{gs}) em função do tempo para diferentes concentrações de ureia em solução tampão 10mM pH = 6. As concentrações utilizadas variam entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ a $-5,0$, variando de $-0,5$ (em unidades de $p(\text{ureia})$) a cada medida. Pudemos observar três regiões com comportamentos distintos no gráf. 17: a primeira delas para as maiores concentrações de ureia utilizadas, denominada região de saturação, onde há separação das linhas, mas a variação em resposta é menor do que para as concentrações contidas na região linear, onde para uma mesma variação na concentração gerou-se uma maior variação de resposta. Finalmente, há ainda uma terceira região, onde ainda existe uma pequena variação entre as linhas de resposta às diferentes concentrações utilizadas, mas muito inferiores às demais regiões do gráfico.

Os dados do experimento que compõem o gráf. 17 foram usados na construção de outros dois gráficos. No primeiro deles (gráf. 18), temos a variação de resposta (V_{gs}) contra a concentração utilizada, onde podemos observar a forma sigmoideal descrita na literatura^{65,73} e inferir que a região de resposta linear estava contida entre as concentrações $p(\text{ureia}) = -1,5$ e $-3,5$ ($3,2 \cdot 10^{-4}$ a $3,2 \cdot 10^{-2}$). Na literatura pode ser

encontrado biossensores que apresentam linearidade de resposta no mesmo intervalo de concentração que o descrito nesse trabalho⁷⁴, no entanto, pode se encontrar também trabalhos cuja região linear esta deslocada para menores ou a maiores concentrações, como pode ser visto na tabela 3. 6, abaixo:

Tabela 3. 12 – Região de linearidade de alguns biossensores.

Método de imobilização	Tipo de Transdutor	Região linear (mol/L)	Ano de publicação	Referência
Encapsulamento	Amperométrico	10^{-5} a 10^{-4}	1996	⁷⁵
Aprisionamento	Óptico	10^{-2} a $5 \cdot 10^{-1}$	2003	⁷⁶
Adsorção	Potenciométrico	10^{-4} a $10^{-1,5}$	2005	⁷⁷
Ligação Covalente	Potenciométrico	10^{-4} a 10^{-2}	2007	⁷⁴

Gráfico 40 – Resposta V_{gs} x Concentração de ureia entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.

No gráf. 19 estão plotadas as derivadas das curvas de resposta do biossensor contra o tempo (gráf. 17), priorizando a região onde a resposta ainda não havia atingido

um patamar estável e, no encarte, as curvas ao longo de todo experimento. A derivada representa a taxa de variação instantânea da resposta do biossensor. Pôde-se notar do gráf. 19 que as derivadas da resposta do biossensor formam dois grandes grupos que são separados pela curva azul claro ($p(\text{ureia}) = -2,5$), valor este na região linear de resposta. As linhas à esquerda e à direita da curva azul claro formam grupos que têm o valor de suas derivadas semelhantes.

Gráfico 41 – Derivada de V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -0,5$ e $-5,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.

Utilizando novamente as condições onde a resposta do biossensor é máxima, foi realizada medidas com concentrações variando de $-0,1$ dentro da faixa linear ($p(\text{ureia}) = -2,1$ a $-3,0$). Pôde ser observado dos resultados (gráf. 20) que as variações de resposta (V_{gs}) obtidas entre as concentrações de ureia utilizadas formam intervalos mais homogêneos, sugerindo que de fato para este intervalo de concentrações de ureia o biossensor responde linearmente.

Gráfico 42 – Resposta V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ e $-3,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.

Plotando as respostas (V_{gs}) contra as concentrações obtivemos o gráfico 21, onde fica evidente a linearidade obtida. Fazendo um fit dos pontos contidos no gráf. 21 é possível inferir de quantas unidades varia a resposta (V_{gs}) do biossensor quando se altera em uma unidade o valor da concentração de ureia (em unidade de $p(\text{ureia})$) e, de maneira análoga a utilizada para sensores de pH, temos a responsividade do urea-EnFET na região linear. O valor obtido para responsividade foi de 114,5 mV/ $p(\text{ureia})$. No trabalho descrito por Lue et al (2011), consta que a responsividade na região linear para o biossensor feito a partir de Ni_3O_4 foi de 57,1 mV/ $p(\text{ureia})$ e de 59,2 mV/ $p(\text{ureia})$ para o biossensor construído com Ta_2O_5 . Estes valores tão discrepantes foram atribuídos a diferença de área superficial da região onde foram imobilizadas as enzimas. A literatura carece de estudos que abordam a variação da área da amostra e sua influência na resposta do biossensor.

Gráfico 43 – Resposta V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ e $-3,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.

No gráf. 22 estão plotadas as derivadas das curvas de resposta do biossensor na região linear contra o tempo, priorizando, novamente, a região onde a resposta ainda não havia atingido um patamar e, no encarte, as curvas ao longo de todo experimento. Pôde-se notar que diferentemente do resultado obtido para uma grande janela de concentrações (graf. 19), as taxas de variação para as curvas na região linear de funcionamento do EnFET não formam grupos com taxas semelhantes, mas exibem comportamento mais distintos entre si, fato que corrobora que o biossensor está funcionando de maneira linear frente as concentrações utilizadas.

Gráfico 44 – Derivada de V_{gs} x Tempo frente concentrações de ureia entre $p(\text{ureia}) = -2,1$ e $-3,0$. Medidas em solução tampão 10mM e pH 6.

4 – Conclusões e Perspectivas

Nesta dissertação, filmes finos comerciais de FTO foram utilizados como camada sensível a íons em dispositivos EGFET. O dispositivo construído apresentou responsividade de 55mV/pH, enquanto o valor máximo previsto pela teoria vigente é 59mV/pH, caracterizando o FTO como alternativa viável e de baixo custo aos demais materiais empregados neste tipo de sensor de pH.

Através de técnicas de imobilização enzimática foi possível utilizar compostos bifuncionais capazes de se ligar covalentemente com grupos hidroxilas presentes na superfície do óxido e aminas presentes nas cadeias laterais de aminoácidos expostos da proteína urease, transformando o dispositivo que antes era um sensor de íons em biossensor de ureia.

O processo de imobilização enzimática diminui a mobilidade da enzima, fazendo com que suas propriedades catalíticas sejam distintas daquelas conhecidas para a proteína livre e necessitaram ser investigadas. Foram determinadas as condições ambientais ideais para utilização do biossensor, bem como a região linear de operação. Nestas condições, o dispositivo exibiu responsividade de 115 mV/p(ureia) na janela de concentração tida como linear, compreendida entre $p(\text{ureia}) = -1,5$ e $-3,5$.

Outros tipos de medidas além das que foram apresentadas neste trabalho necessitam ser estudadas e analisadas cautelosamente. Espera-se que as mesmas possam ser estudadas em trabalhos futuros. Sugestões:

- Determinar precisamente os limites de detecção característicos do biossensor;
- O tempo de estocagem do biossensor depois de realizado o procedimento de imobilização enzimática;
- A otimização e miniaturização do circuito eletrônico utilizado, bem como o software para coleta de dados;
- Testar o dispositivo frente a amostras de fluídos biológicos reais, como urina, saliva ou plasma sanguíneo;

Finalmente, espera-se que este trabalho tenha sido apenas mais um passo em direção a construção de diferentes tipos de biossensores utilizando a tecnologia pH-EGFET. A utilização bem sucedida de filmes semicondutores comerciais empregados neste tipo de dispositivo abre perspectivas para que grupos de pesquisas que não

possuam aparelhagem para deposição de filmes finos também possam desenvolver e estudar novos biossensores.

5 – Referências bibliográficas

1. Hulanicki A, Glab S, Ingman F. Chemical sensors: definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* 1991;63(9):1247–50.
2. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* janeiro de 2001;16(1-2):121–31.
3. Eggins BR. *Biosensors: an introduction.* Wiley-Teubner; 1996.
4. Zhao Z, Jiang H. Enzyme-based Electrochemical Biosensors. In: Andrea P, organizador. *Biosensors.* InTech.
5. Ganjali MR, Norouzi P, Faribod F. *Electrochemical sensors.* Kerala, India: Transworld Research Network; 2010.
6. Ligler FS, Taitt CAR. *Optical biosensors: present and future.* Gulf Professional Publishing; 2002.
7. Lec RM. Piezoelectric biosensors: recent advances and applications. *Freq. Control Symp. Pda Exhib. 2001 Proc. 2001 Ieee Int. 2001.* p. 419–29.
8. Marrows CH. *Magnetic Biosensor Techniques.* Handb. Biosens. Biochips. John Wiley & Sons, Ltd; 2008.
9. Danielsson B. Calorimetric biosensors. *J. Biotechnol.* 1 de agosto de 1990;15(3):187–200.
10. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM.* abril de 2008;29(2–3):171–80.
11. Updike SJ, Hicks GP. The Enzyme Electrode. *Nature.* 3 de junho de 1967;214(5092):986–8.
12. Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962;102(1):29–45.
13. Koncki R. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Anal. Chim. Acta.* 5 de setembro de 2007;599(1):7–15.
14. Sörenson S P L. Enzyme Studies II. The Measurement and Meaning of Hydrogen Ion Concentration in Enzymatic Processes. *Biochem Z.* 1909; 21: 131-200 .
15. Nelson DL, Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry.* New York: W.H. Freeman; 2008.

16. Buck RP, Rondinini S, Covington AK, Baucke FGK, Brett CMA, Camoes MF, et al. Measurement of pH. Definition, standards, and procedures (IUPAC Recommendations 2002). *Pure Appl. Chem.* 2002;74(11):2169–200.
17. Yuqing M, Jianrong C, Keming F. New technology for the detection of pH. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 29 de abril de 2005;63(1):1–9.
18. Bergveld P. Development of an Ion-Sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements. *Ieee Trans. Biomed. Eng.* 1970;BME-17(1):70–1.
19. Bergveld P. Development, Operation, and Application of the Ion-Sensitive Field-Effect Transistor as a Tool for Electrophysiology. *Ieee Trans. Biomed. Eng.* 1972;BME-19(5):342–51.
20. Bergveld P. Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors Actuators B Chem.* 1 de janeiro de 2003;88(1):1–20.
21. Hierlemann A, Baltes H. CMOS-based chemical microsensors. *Analyst.* 23 de dezembro de 2003;128(1):15–28.
22. James R. Sandifer JJV. A Review of Biosensor and Industrial Applications of pH-ISFETs and an Evaluation of Honeywell's "DuraFET". 1999;131(1):91–8.
23. Van der spiegel J, Lauks I, Chan P, Babic D. The extended gate chemically sensitive field effect transistor as multi-species microprobe. *Sensors Actuators.* 1983;4:291–8.
24. Chi L-L, Chou J-C, Chung W-Y, Sun T-P, Hsiung S-K. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. *Mater. Chem. Phys.* 14 de fevereiro de 2000;63(1):19–23.
25. Fernandes EGR, Vieira NCS, de Queiroz AAA, Guimarães FEG, Zucolotto V. Immobilization of Poly(propylene imine) Dendrimer/Nickel Phtalocyanine as Nanostructured Multilayer Films To Be Used as Gate Membranes for SEG-FET pH Sensors. *J. Phys. Chem. C.* 15 de abril de 2010;114(14):6478–83.
26. Pan C-W, Chou J-C, Sun T-P, Hsiung S-K. Development of the tin oxide pH electrode by the sputtering method. *Sensors Actuators B Chem.* 22 de julho de 2005;108(1–2):863–9.
27. Guerra EM, Silva GR, Mulato M. Extended gate field effect transistor using V2O5 xerogel sensing membrane by sol–gel method. *Solid State Sci.* fevereiro de 2009;11(2):456–60.
28. Batista PD, Mulato M. ZnO extended-gate field-effect transistors as pH sensors. *Appl. Phys. Lett.* 29 de setembro de 2005;87(14):143508–143508–3.

29. Lin J-L, Chu Y-M, Hsaio S-H, Chin Y-L, Sun T-P. Structures of Anodized Aluminum Oxide Extended-Gate Field-Effect Transistors on pH Sensors. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2006;45(10A):7999–8004.
30. Rocher V, Poyard S, Jaffrezic-Renault N, Ajoux C, Lemiti M, Sibai A. Photo-CVD silicon nitride thin layers as pH-ISFET sensitive membrane. *Sensors Actuators B Chem.* abril de 1994;19(1–3):342–7.
31. Yang W, Wang J, Zhao S, Sun Y, Sun C. Multilayered construction of glucose oxidase and gold nanoparticles on Au electrodes based on layer-by-layer covalent attachment. *Electrochem. Commun.* abril de 2006;8(4):665–72.
32. Guidelli EJ, Guerra EM, Mulato M. Ion sensing properties of vanadium/tungsten mixed oxides. *Mater. Chem. Phys.* 15 de fevereiro de 2011;125(3):833–7.
33. Liao Y-H, Chou J-C. Preparation and characterization of the titanium dioxide thin films used for pH electrode and procaine drug sensor by sol–gel method. *Mater. Chem. Phys.* 15 de abril de 2009;114(2–3):542–8.
34. Y-L C, J-C C, Z-C L, T-P S, W-Y C, S-K H. Titanium Nitride Membrane Application to Extended Gate Field Effect Transistor pH Sensor Using VLSI Technology. *Jpn J Appl Phys Part 1.* 2001;40(11):6311–5.
35. Liao Y-H, Chou J-C. Fabrication and Characterization of a Ruthenium Nitride Membrane for Electrochemical pH Sensors. *Sensors.* 9 de abril de 2009;9(4):2478–90.
36. Chou J-C, Weng C-Y. Sensitivity and hysteresis effect in Al₂O₃ gate pH-ISFET. *Mater. Chem. Phys.* 15 de agosto de 2001;71(2):120–4.
37. Batista PD, Mulato M, Graeff CF de O, Fernandez FJR, Marques F das C. SnO₂ extended gate field-effect transistor as pH sensor. *Braz. J. Phys.* junho de 2006;36(2A):478–81.
38. Bousse L, Bergveld P. The role of buried OH sites in the response mechanism of inorganic-gate pH-sensitive ISFETs. *Sensors Actuators.* setembro de 1984;6(1):65–78.
39. Lue C-E, Yu T-C, Yang C-M, Pijanowska DG, Lai C-S. Optimization of Urea-EnFET Based on Ta₂O₅ Layer with Post Annealing. *Sensors.* 27 de abril de 2011;11(12):4562–71.
40. Lai C-S, Yang C-M, Lu T-F. pH Sensitivity Improvement on 8 nm Thick Hafnium Oxide by Post Deposition Annealing. *Electrochem. Solid-State Lett.* 3 de janeiro de 2006;9(3):G90–G92.
41. Pijanowska DG, Torbicz W. pH-ISFET based urea biosensor. *Sensors Actuators B Chem.* outubro de 1997;44(1–3):370–6.

42. Pan T-M, Lin C-W. Structural and Sensing Properties of High-k Lu₂O₃ Electrolyte-Insulator-Semiconductor pH Sensors. *J. Electrochem. Soc.* 4 de janeiro de 2011;158(4):J96–J99.
43. Yin L-T, Chou J-C, Chung W-Y, Sun T-P, Hsiung S-K. Study of indium tin oxide thin film for separative extended gate ISFET. *Mater. Chem. Phys.* 2 de abril de 2001;70(1):12–6.
44. Batista PD, Mulato M. Polycrystalline fluorine-doped tin oxide as sensing thin film in EGFET pH sensor. *J. Mater. Sci.* 1 de outubro de 2010;45(20):5478–81.
45. Caras S, Janata J. Field effect transistor sensitive to penicillin. *Anal. Chem.* 1 de outubro de 1980;52(12):1935–7.
46. Dzyadevich SV, Korpan YI, Arkhipova VN, Alesina MY, Martelet C, El'Skaya AV, et al. Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum. *Biosens. Bioelectron.* 15 de março de 1999;14(3):283–7.
47. Soldatkin AP, Montoriol J, Sant W, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane. *Talanta.* 23 de agosto de 2002;58(2):351–7.
48. Vijayalakshmi A, Tarunashree Y, Baruwati B, Manorama SV, Narayana BL, Johnson REC, et al. Enzyme field effect transistor (ENFET) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 15 de junho de 2008;23(11):1708–14.
49. Wan K, Chovelon J., Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A. Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method. *Sensors Actuators B Chem.* 21 de setembro de 1999;58(1–3):399–408.
50. Goeyens L, Kindermans N, Abu Yusuf M, Elskens M. A Room Temperature Procedure for the Manual Determination of Urea in Seawater. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* outubro de 1998;47(4):415–8.
51. Lima JLFC, Delerue-Matos C, Vaz MCVF. Flow Injection System with Potentiometric Detection for the Determination of Urea Content in Milks. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46(4):1386–9.
52. Taylor AJ, Vadgama P. Analytical reviews in clinical biochemistry: The estimation of urea. *Ann. Clin. Biochem.* 1992;29(3):245–64.
53. Malhotra BD, Chaubey A, Singh SP. Prospects of conducting polymers in biosensors. *Anal. Chim. Acta.* 18 de setembro de 2006;578(1):59–74.
54. Park K-Y, Choi S-B, Lee M, Sohn B-K, Choi S-Y. ISFET glucose sensor system with fast recovery characteristics by employing electrolysis. *Sensors Actuators B Chem.* 2002;83(1-3):90–7.

55. Weber J, Jeedigunta S, Kumar A. Fabrication and Characterization of ZnO Nanowire Arrays with an Investigation into Electrochemical Sensing Capabilities. *J. Nanomater.* [Internet]. 2 de fevereiro de 2009 [citado 23 de abril de 2013];2008. Recuperado de: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2008/638523/abs/>
56. Zang J, Li CM, Cui X, Wang J, Sun X, Dong H, et al. Tailoring Zinc Oxide Nanowires for High Performance Amperometric Glucose Sensor. *Electroanalysis*. maio de 2007;19(9):1008–14.
57. Manso J, Mena ML, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón J. Electrochemical biosensors based on colloidal gold–carbon nanotubes composite electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 1 de maio de 2007;603(1):1–7.
58. Wu B-Y, Hou S-H, Yin F, Li J, Zhao Z-X, Huang J-D, et al. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer assembly of multilayer films composed of chitosan, gold nanoparticles and glucose oxidase modified Pt electrode. *Biosens. Bioelectron.* 15 de janeiro de 2007;22(6):838–44.
59. Khan R, Kaushik A, Solanki PR, Ansari AA, Pandey MK, Malhotra BD. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. *Anal. Chim. Acta.* 2 de junho de 2008;616(2):207–13.
60. Li Y-F, Liu Z-M, Liu Y-L, Yang Y-H, Shen G-L, Yu R-Q. A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. *Anal. Biochem.* 1 de fevereiro de 2006;349(1):33–40.
61. Zhang Y, Zhang Y, Wang H, Yan B, Shen G, Yu R. An enzyme immobilization platform for biosensor designs of direct electrochemistry using flower-like ZnO crystals and nano-sized gold particles. *J. Electroanal. Chem.* 1 de março de 2009;627(1–2):9–14.
62. Zhang S, Wang N, Yu H, Niu Y, Sun C. Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. *Bioelectrochemistry*. setembro de 2005;67(1):15–22.
63. Tkac J, Whittaker JW, Ruzgas T. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 15 de março de 2007;22(8):1820–4.
64. Pereira AC, Aguiar MR, Kisner A, Macedo DV, Kubota LT. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sensors Actuators B Chem.* 124(1):269–76.
65. Dhawan G, Sumana G, Malhotra BD. Recent developments in urea biosensors. *Biochem. Eng. J.* 15 de abril de 2009;44(1):42–52.
66. Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*. junho de 2007;8(6):1775–89.

67. Granqvist CG, Hultåker A. Transparent and conducting ITO films: new developments and applications. *Thin Solid Films*. 22 de maio de 2002;411(1):1–5.
68. Geraldo V, Scalvi LV de A, Moraes EA de, Santilli CV, Pulcinelli SH. Sb doping effects and oxygen adsorption in SnO₂ thin films deposited via sol-gel. *Mater. Res.* dezembro de 2003;6(4):451–6.
69. Bijanowska DG, Dawgul M, Torbicz W. Comparison of Urea Determination in Biological Samples by EnFETs Based on pH and pNH₄ Detection. *Sensors*. 29 de junho de 2003;3(6):160–5.
70. Nascimento RAS. Análise dos procedimentos de medida de dispositivos EGFET utilizando filmes de FTO. Ribeirão Preto; 2010.
71. Runyan WR. Semiconductor measurements and instrumentation. New York: McGraw-Hill; 1975.
72. Sze SM. Physics of semiconductor devices. New York: Wiley; 1981.
73. Chen J-C, Chou J-C, Sun T-P, Hsiung S-K. Portable urea biosensor based on the extended-gate field effect transistor. *Sensors Actuators B Chem*. 1 de junho de 2003;91(1–3):180–6.
74. Gutiérrez M, Alegret S, del Valle M. Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples. *Biosens. Bioelectron*. 15 de abril de 2007;22(9-10):2171–8.
75. Bertocchi P, Compagnone D, Palleschi G. Amperometric ammonium ion and urea determination with enzyme-based probes. *Biosens. Bioelectron*. 1996;11(1-2):1–10.
76. Krysteva M, Al Hallak M. Optical Enzyme Sensor for Urea Determination via Immobilized pH Indicator and Urease onto Transparent Membranes. *Sci. World J*. 2003;3:585–92.
77. Barhoumi H, Maaref A, Rammah M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Mousty C, et al. Insulator semiconductor structures coated with biodegradable latexes as encapsulation matrix for urease. *Biosens. Bioelectron*. 15 de maio de 2005;20(11):2318–23.