UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA

**Sensores e biossensores baseados em
transistores de efeito de campo utilizando
filmes automontados nanoestruturados**

São Carlos

2012

NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA

**Sensores e biossensores baseados em
transistores de efeito de campo utilizando
filmes automontados nanoestruturados**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto
de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada

Orientador: Prof. Francisco Eduardo
Gontijo Guimarães

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2012

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 elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vieira, Nirton Cristi Silva

Sensores e biossensores baseados em transistores de efeito de campo utilizando filmes automontados nanoestruturados / Nirton Cristi Silva Vieira; orientador Francisco Eduardo Gontijo Guimarães - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
120 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Física de materiais e dispositivos semicondutores. 2. Biossensores. 3. Filmes automontados. I. Guimarães, Francisco Eduardo Gontijo, orient. II. Título.

Dedico esta tese aos meus pais: Antônio E. Vieira (Toninho) e Leila A. S. Vieira. Dois grandes guerreiros e incentivadores de todos os meus sonhos!

AGRADECIMENTOS

Aproveito a oportunidade para agradecer aqueles que, passando por minha vida, tornaram possível a realização deste trabalho. A todos, meu muito obrigado!

A Exu, senhor e guardião dos caminhos, que os abriu para que tudo começasse, sobretudo esse trabalho.

A todos os Orixás: Ogum, Oxóssi, Omolu, Ossain, Osumaré, Nanã, Oxum, Obá, Iyewá, Oyá, Logun, Ayrá, Iemanjá, Xango, Ibeji, Irôko, Oxalá (e a outros que possa ter esquecido) por me terem saúde e força de vontade para vencer todos os meus obstáculos.

Ao Ser Supremo, cheio de bondade que me deu vida.

À minha avó que sempre me deu carinho e amor, e nada me cobrou a não ser um dia o retorno para casa.

Ao meu pai Toninho, exemplo de caráter e dedicação, que desde cedo me mostrou a nobreza do trabalho. Você pode não ter estudado como muitos, mas o senhor sempre será meu doutor na arte da vida!

À minha mãe Leila, por toda a sua dedicação e carinho. Mãe, a senhora sem dúvida se esforçou o máximo para nos criar, sempre lutando para nos proporcionar as melhores oportunidades.

À minha irmã Vanessa, pelo carinho, amor e compreensão. Valeu mana! Nunca me esquecerei de que em dias difíceis você abdicou de um ano de sua vida escolar em prol de meus estudos.

À minha Tia Lillian pelo amor, carinho e paciência em minha criação, principalmente na infância.

À Késsia e Rosângela pelo carinho, paciência e por participar de minha criação.

A todos os meus familiares, sobretudo a Kelly, Ketinha, Kimberly, Manu, Júlia, Cheron, Tio João, pelo carinho e grande apoio.

À Minha namorada Maria Gabriela, pelo amor, carinho e compreensão nos momentos difíceis. Valeu linda!

Ao grande amigo José dos Reis que teve a coragem (rsrsrs) de ser meu fiador durante a graduação. Cara, sem você tudo ia parar ali. Valeu mesmo!

Aos todos os meus professores, desde as “Tias” Beatriz e Ana Maria, minhas primeiras professoras.

Aos colegas do ensino fundamental, médio, graduação e pós-graduação pelos momentos agradáveis que nunca mais voltarão, a não ser na lembrança.

Aos professores e amigos Carlos Bernardes e Piotr Trzesniak, pelo incentivo, amizade e por todos os conselhos desde a graduação. Valeu pessoal! Tudo começou com incentivo de vocês.

Ao professor Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães. Muito obrigado por sua orientação acadêmica, amizade, paciência e por dividir comigo essa jornada. Apreendi muito nesse período.

Aos demais professores do IFSC que contribuíram direta ou indiretamente com esse trabalho, em especial ao professor Dr. Valtencir Zucolotto, pela paciência nas discussões sobre a tese e trabalhos científicos, o que contribui muito com minha formação.

Ao professor Dr. Valmor Mastelaro e seu aluno de Dr. Waldir Avansi do grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do IFSC-USP, por ceder as amostras de pentóxido de vanádio.

Ao professor Dr. Ernesto Chaves Pereira da UFSCAR por permitir a utilização de seu laboratório.

Aos amigos da república Nego Teia ou Casa das lamentações (hehehe!): Vivas, Edson, Alfredo, Aldo, Douglas e DJ J, por dividirem momentos inesquecíveis de convivência. Quantas histórias esse convívio nos proporcionou e ainda proporcionará. Foi um prazer fazer parte da vida de vocês!

Aos colegas de sala que se tornaram grandes amigos: Mike, Angelo, Fernando, Gustavo, Moema e Kleber, pela grande amizade e por dividirem comigo o conhecimento e várias histórias durante todo esse tempo.

À minha primeira aluna de iniciação, Alessandra Figueiredo, exemplo de dedicação, presteza, colaboração, amizade e boa convivência.

Aos colegas do IFSC: Washington, Alexandre Maciel, Bruno, Chicão, Waldir, Gabriela, Rodrigo (Jesus), Dilleys e outros que possa ter esquecido.

Aos amigos do Grupo de Fotônica, Jonathas e pH (Paulo Henrique). Medi você muito nessa tese cara (rsrsrs)!

Aos demais colegas do grupo de alunos e ex-alunos do professor Chico: Tsutae, Danilo, Regina, Vitor, Aroldo, Francisco, Celio Borges, Patrícia, Dani e Borrero, que compartilharam comigo aprendizado e diversas comemorações.

Ao Gustavo “nunca vai, quando vai não toca” por me ajudar a terminar a tese colocando o ponto final (kkkkk).

Aos técnicos do grupo de Semicondutores, Aroldo e Carlão e aos técnicos do grupo Polímeros Níbio e Bertho, que sempre estiveram dispostos a ajudar, ensinar e contribuir de forma significativa para esse trabalho. Também pelas discussões futebolísticas ao longo desses anos.

À secretaria de pós-graduação do IFSC, pela competência, bom atendimento e cordialidade.

Ao secretário do grupo de Semicondutores, Daniel, e às secretárias do grupo de Polímeros Rô e Simone pela cordialidade e auxílio.

Às bibliotecárias do IFSC, principalmente a Neusa, pela cordialidade e pelo grande auxílio na correção da tese de forma rápida e eficiente.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Por fim, a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

Valeu!

“O Candomblé sobrevive até hoje porque não quer convencer as pessoas de uma verdade absoluta, ao contrário da maioria das religiões.”

(Pierre Fatumbi Verger)

RESUMO

NIRTON, N. C. S. *Sensores e biossensores baseados em transistores de efeito de campo utilizando filmes automontados nanoestruturados*. 2011. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.

O transistor de efeito de campo de porta estendida e separada (SEGFET) é um dispositivo alternativo ao tradicional transistor de efeito de campo seletivo a íons (ISFET). A grande vantagem desse dispositivo se refere ao seu fácil processamento, ou seja, se restringe somente a manipulação do eletrodo de porta, evitando processos convencionais de microeletrônica. Neste sentido, sensores iônicos e biossensores podem ser facilmente implementados combinando materiais de reconhecimento químico e/ou biológico. Por sua vez, a técnica de fabricação de filmes finos camada por camada (*layer-by-layer*, LbL) se mostra versátil para manipulação de diversos tipos de materiais em nível molecular. Materiais orgânicos e inorgânicos podem ser automontados em substratos sólidos por meio da simples adsorção eletrostática formando compósitos com propriedades únicas com o objetivo de serem aplicados em sensores ou biossensores. Neste trabalho, o conceito de dispositivo SEGFET foi combinado com a técnica LbL por meio da manipulação de materiais orgânicos (polieletrólitos, dendrímeros e polianilina) e inorgânicos (TiO_2 e V_2O_5) nanoparticulados a fim de se obter novos sensores de pH e biossensores para a detecção de glicose e uréia, dois importantes analitos de interesse clínico. Numa primeira etapa, diferentes filmes LbL foram produzidos, caracterizados e testados como camada sensível (porta estendida) em dispositivos SEGFETs. Todos os sistemas estudados se mostraram promissores como sensores de pH, ou seja, com uma sensibilidade próxima do valor teórico sugerido pela equação de Nernst (59,15 mV.pH⁻¹). Esses resultados podem ser atribuídos à natureza anfotérica do material da última camada no filme LbL. Numa segunda etapa, as enzima glicose oxidase (GOx) e urease foram convenientemente imobilizadas nos filmes LbL. Pelo fato dessas enzimas gerarem ou consumirem prótons durante a catálise da reação, os filmes LbL modificados enzimaticamente foram utilizados em biossensores de glicose e uréia, apresentando eficiente detecção. Assim, a união de dispositivos SEGFET com a técnica de automontagem se mostrou promissora para construção de sensores e biossensores eficientes e de baixo custo.

Palavras chave: Transistor de efeito de campo. Filmes automontados. SEGFET Nanopartículas. Biossensor.

ABSTRACT

NIRTON, N. C. S. *Sensors and biosensors based on field-effect transistors using nanostructured self-assembled films*. 2011. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2011.

Separative extended gate field-effect transistor (SEGFET) device is an alternative to the conventional ion-sensitive field-effect transistor (ISFET). The great advantage of SEGFET refers to its easy processing, i.e., it is limited under only manipulation of the gate electrode, avoiding the conventional microelectronic processes. In this way, ion sensors and biosensors can be easily implemented combining chemical and/or biological recognition materials. In turn, the layer-by-layer (LbL) technique shows be versatile for handling various types of materials at molecular level. In this thesis, the concept of SEGFET device was combined with the LbL technique through the manipulation of organic (polyelectrolytes, dendrimers and poly (aniline)) and inorganic materials (TiO_2 and V_2O_5 nanoparticles) in order to get new pH sensors and biosensors for the detection of glucose and urea, two important analytes of clinical interest. In a first step, different LbL films were produced, characterized and tested as the sensitive layer (extended gate) in SEGFETs devices. All studied systems were promising as pH sensors, i.e., with a sensitivity close to the theoretical value suggested by Nernst equation (59.15 mV.pH^{-1}). These results can be attributed to the amphoteric nature of the material in the last layer of the LbL films. In a second step, glucose oxidase (GOx) and urease enzymes were conveniently immobilized onto LbL films. Because these enzymes generate or consume protons during catalysis of the reaction, the enzymatically modified LbL films were used in biosensors for glucose and urea, with efficient detection. Thus, the union of SEGFET devices with the LbL technique is promising to building up efficient and low-cost sensors and biosensors.

Keywords: Field-effect transistor. Self-assembled films. SEGFET. Nanoparticles. Biosensor.

SUMÁRIO

1	Introdução	19
1.1	Proposta da tese	24
2	Sensores baseados no conceito de efeito de campo	27
2.1	O MOSFET e o ISFET	27
2.2	O EGFET e o SEGFET	32
2.3	O EnFET	35
3	Filmes automontados camada por camada (LbL)	39
3.1	Técnica de automontagem camada por camada (LbL).....	39
3.2	Técnica de automontagem assistida por spin (SA-LbL).....	41
3.3	Sensores e biossensores de efeito de campo utilizando automontagem.....	42
4	Materiais e métodos	45
4.1	Materiais sensíveis a íons	45
4.1.1	Óxido de índio dopado com estanho (ITO).....	45
4.1.2	Polianilina nanoparticulada (PANI-N)	46
4.1.3	Nanopartículas de dióxido de titânio (TiO ₂ -Np).....	48
4.1.4	Nanoestruturas (1D) de pentóxido de vanádio (V ₂ O ₅)	48
4.2	Materiais utilizados como contra íons.....	49
4.3	Crescimento dos filmes automontados.....	50
4.4	As enzimas glicose oxidase e urease.....	52
4.4.1	Método de imobilização enzimática.....	53
4.5	Limpeza dos substratos	54
4.6	Técnicas de caracterização utilizadas	54
4.7	Configuração experimental do dispositivo SEGFET	55
4.7.1	Calibração do sistema de medida	57
5	SEGFET funcionalizado com (PPID/NiTSPc)	61
5.1	Caracterização dos filmes (PPID/NiTSPc)	61
5.2	Aplicação em sensores de pH.....	64
5.3	Aplicação em biossensores de glicose	66
5.4	Considerações finais do capítulo.....	73
6	SEGFET (PVS/PANI-N)	75

6.1	Caracterização da polianilina.....	75
6.2	Caracterização dos filmes (PVS/PANI-N)	77
6.3	Aplicação em sensores de pH	79
6.4	Aplicação em biossensores de uréia	82
6.5	Considerações finais do capítulo	84
7	SEGFET (PPID/TiO₂-Np).....	85
7.1	Caracterização dos filmes (PPID/TiO ₂ -Np)	85
7.2	Aplicação em sensores de pH	87
7.3	Aplicação em biossensores de glicose	90
7.4	Considerações finais do capítulo	91
8	SEGFET composto por nanoestruturas 1D de pentóxido de vanádio.....	93
8.1	Caracterização das nanoestruturas	93
8.2	Aplicação em sensores de pH	95
8.3	Filmes automontados (PAH/V ₂ O ₅ -nanobastões).....	97
8.3.1	Aplicação dos filmes (PAH/V ₂ O ₅ -nanobastões) em sensores de pH.....	99
8.3.2	Aplicação dos filmes (PAH/V ₂ O ₅ -Ne) em biossensores de uréia	101
8.4	Considerações finais do capítulo	102
9	Considerações finais e perspectivas	103
	Referências	105
	APÊNDICE A – Produção científica e tecnológica	119

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa em sensores e biossensores possui um forte caráter multidisciplinar, envolvendo áreas da Física, Química, Ciência dos Materiais e Biologia. Um sensor é um dispositivo que mede certa grandeza física ou química e a converte em um sinal mensurável (1). Por outro lado, segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), um biossensor é definido com um “dispositivo integrado transdutor-receptor, que é capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico”(2).

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lions em 1962, o qual ficou conhecido como "eletrodo enzimático" (3). Desde então, um notável progresso foi alcançado quanto ao desenvolvimento de biossensores para a determinação e análise de diversas substâncias (4). Em especial, destaca-se o desenvolvimento e aprimoramento dos biossensores amperométricos, potenciométricos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos (4).

Biossensores amperométricos baseiam-se em reações de transferência de elétrons (oxi-redução) entre o material biocatalítico e o analito, com um eletrodo de trabalho (o qual contém o material biológico imobilizado) polarizado a uma tensão pré-determinada em relação a um eletrodo de referência (5). O primeiro biossensor amperométrico foi desenvolvido por Updike e Hicks (6) em 1967 para a medida de glicose, onde se fazia uso do eletrodo enzimático desenvolvido por Clark e Lions (3).

Por sua vez, os biossensores ópticos baseiam-se na determinação das mudanças de absorção de luz entre os reagentes e produtos da reação biologicamente catalisada, ou na medida da emissão de luz por um processo luminescente (7). A forma mais comum envolve o uso de tiras colorimétricas, as quais contêm enzimas oxi-redutases (um tipo de material de reconhecimento biológico) e uma substância capaz de mudar suas propriedades ópticas em resposta a uma mudança nas condições do meio (cromóforo). O produto gerado na reação entre a enzima e o analito (na maioria das vezes H_2O_2) oxida o cromógeno e a absorbância do composto formado é proporcional à concentração do analito a ser determinada (7).

Os biossensores piezoelétricos contêm materiais biológicos imobilizados em cristais que dão origem a uma tensão em resposta a uma vibração externa. Dessa forma, funcionam como transdutores do sinal elétrico produzido em sua interface (8). Como a variação da frequência é proporcional à variação de massa do material adsorvido, tal variação pode ser determinada por circuitos eletrônicos e relacionada com a concentração de um determinado analito. O principal inconveniente dos biossensores piezoelétricos é a interferência da umidade atmosférica na medida e a dificuldade em usá-los para a determinação de analitos em solução. Entretanto, biossensores piezoelétricos são relativamente baratos, pequenos e proporcionam uma resposta rápida (8).

Muitas reações que são catalisadas enzimaticamente são exotérmicas, ou seja, geram calor. Dessa forma, os biossensores calorimétricos baseiam-se na medida da variação de temperatura entre a entrada e a saída de uma pequena coluna contendo um biocatalisador imobilizado (9). Tal medida é efetuada através de termistores, um tipo de resistor usado para medir mudanças de temperatura baseado em variações de sua resistência. A principal vantagem de um biossensor calorimétrico é sua ampla aplicabilidade em processos biotecnológicos ou de interesse clínico. Porém, existe a dificuldade de se manter a temperatura do biocatalisador constante, fato que pode levar à desnaturação do mesmo, afetando assim o funcionamento do biossensor (9).

Os biossensores potenciométricos são dispositivos que compreendem eletrodos de vidro, sensores baseados na interface metal-óxido ou eletrodos íon-seletivos nos quais são imobilizados os biocatalisadores (10). Nesse tipo de biossensor, a geração de prótons altera o potencial do meio reacional, criando uma diferença de potencial entre o eletrodo biologicamente modificado e um eletrodo de referência (10).

Como já exposto anteriormente, em sensores ou biossensores, uma grandeza física ou química está relacionada direta ou indiretamente com a concentração da substância a qual se deseja determinar (analito). Entre as grandezas utilizadas para quantificar analitos em sensores ou biossensores, destaca-se o potencial hidrogeniônico (pH), uma vez que diversos processos bioquímicos dependem do seu valor ou resultam na liberação ou consumo de prótons (10). O pH é uma grandeza físico-química que indica a acidez ou alcalinidade de uma solução aquosa. Matematicamente, é definido como sendo o cologarítimo decimal da atividade de íons hidrogênio (α_{H^+}), ou seja (11):

$$pH = -\log_{10}[\alpha_{H^+}] \quad (1.1)$$

Para soluções diluídas (menores que 0,1 M), o valor do coeficiente de atividade se aproxima de 1, ou seja, os valores da atividade se aproximam dos valores da concentração, assim, a equação 1.1 pode ser escrita como (11):

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (1.2)$$

A determinação clássica do valor do pH é realizada de duas maneiras distintas: (I) adição de um cromóforo ou tira indicativa contendo uma substância imobilizada que muda de coloração conforme o pH da solução; (II) através de potenciometria utilizando-se o eletrodo padrão de hidrogênio ou o eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência, este último, conhecido também como pH-metro (11).

Os métodos supracitados são frequentemente utilizados em laboratórios de pesquisa e ensino, principalmente o pH-metro. Contudo, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a determinação do pH (11). Dentre essas tecnologias, Bergveld introduziu o conceito de efeito de campo para a determinação da atividade iônica em ambiente químico, apresentando à comunidade científica o transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET, do inglês *ion-sensitive field-effect transistor*) (12-13). Um ISFET é um sensor iônico muito semelhante a um dispositivo MOSFET (transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor, do inglês *metal oxide semiconductor field-effect transistor*). A diferença básica entre os dispositivos se refere a não existência do eletrodo metálico de porta (ou *gate*) no ISFET, sendo este substituído por um eletrodo de referência contido em uma solução (14). A Figura 1.1 ilustra o diagrama esquemático de um MOSFET e de um ISFET (14). No MOSFET a quantidade de portadores no canal entre os eletrodos fonte e dreno é controlada por uma pequena tensão aplicada à porta. Por outro lado, no ISFET, o potencial na superfície do filme óxido se altera devido à concentração iônica da solução, modulando a quantidade de portadores no canal do dispositivo.

Utilizado amplamente como sensor iônico, principalmente para a determinação de íons H^+ , o ISFET também pode ser utilizado como plataforma ativa em biossensores. A combinação da deposição de filmes ultrafinos e a posterior imobilização de materiais de origem biológica (enzimas, por exemplo) sobre o material que compõe a porta de um ISFET permite esta opção (15). Neste caso, a reação catalisada pelo material biológico é responsável pela alteração do potencial na porta do dispositivo via mudança de pH local, sendo esta alteração proporcional à concentração do analito a ser determinado.

Figura 1.1 – Diagrama esquemático de um MOSFET (a) e de um ISFET (b). Adaptado da referência (14).

A grande vantagem da aplicação de ISFETs como sensores ou biossensores é a possibilidade do uso da microeletrônica na sua produção, o que possibilita sua confecção e miniaturização em larga escala. Em contrapartida, um inconveniente em ISFETs é a dificuldade de isolamento do FET do meio reacional, o que pode influenciar no desempenho do dispositivo em virtude de alguma contaminação iônica e a dificuldade de imobilização de biomoléculas em um suporte de dimensões bastante reduzidas.

Neste sentido, um sistema elegante para isolamento do FET foi proposto por Van der Spiegel et. al. (16) e aprimorado por Chi e colaboradores (17). Trata-se do transistor de efeito de campo de porta estendida (EGFET, do inglês *extended gate field-effect transistor*), que é formado por uma camada sensível estendida ou conectada a um dispositivo de alta impedância, geralmente um MOSFET, amplificador operacional (OP) ou ainda amplificador de instrumentação (AI) (16-18). Vale ressaltar que, algumas vezes, o EGFET recebe a denominação de transistor de efeito de campo de porta estendida e separada (SEGFET, *separative extended gate field-effect transistor*). Essa nova denominação advém do fato de a camada sensível (ou porta estendida) estar separada do chip que contém o MOSFET (19). A Figura 1.2 ilustra a configuração de um SEGNET. De forma análoga a um ISFET, uma alteração do potencial na superfície da membrana ou camada sensível, modula o sinal de saída do dispositivo; que pode ser a corrente dreno-fonte de um MOSFET ou a tensão de saída de um amplificador operacional ou de instrumentação (17-19).

Figura 1.2 – Diagrama esquemático de um SEG-FET. G, S e D representam, respectivamente, os eletrodos porta, fonte e dreno, de um MOSFET comercial.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a obtenção de filmes finos sensíveis ao pH. Óxidos ou nitretos metálicos têm sido sintetizados com esse objetivo por *sputtering* (17, 20), sol-gel (21-22), oxidação anódica (23) e deposição química a partir do vapor (CVD) (24). Neste contexto, as técnicas de construção de filmes por *spin coating* ou via deposição camada por camada, LbL (*layer by layer*), representam metodologias simples e de baixo custo que têm como propriedade combinar e controlar a deposição de diversos tipos de materiais em nível molecular (25). Materiais orgânicos (19, 26), inorgânicos (26) e até mesmo biomoléculas (27) podem ser combinados, resultando em muticompósitos com propriedades distintas, automontados em diferentes tipos e tamanhos de substratos (25). Através da união de técnicas de deposição de filmes ultrafinos por automontagem com o conceito de SEG-FET, novos sistemas podem ser facilmente implementados como sensores de pH e posteriormente como biossensores.

Neste sentido, no presente trabalho, sensores e biossensores baseados em um dispositivo SEG-FET foram obtidos através da construção de filmes automontados sensíveis a variações de pH. Materiais nanoestruturados foram combinados e depositados na forma de filmes finos automontados a fim de melhorar o desempenho do dispositivo. A proposta ou objetivo da tese bem como sua organização é descrita a seguir.

1.1 PROPOSTA DA TESE

Os principais objetivos dessa tese são:

- I. **Construção de um dispositivo SEGFET universal:** construir um dispositivo SEGFET simples que seja adequado a diferentes plataformas de sensoriamento e que permita a aquisição rápida e precisa do sinal através de um computador.
- II. **Fabricação e caracterização de filmes automontados nanoestruturados:** preparar filmes automontados contendo materiais nanoestruturados sensíveis ao pH, funcionalizar a superfície de substratos de ITO (óxido de índio dopado com estanho, *indium tin-doped oxide*) com filmes automontados e caracterizar os sistemas automontados por técnicas espectroscópicas e de microscopia eletrônica.
- III. **Aplicação dos filmes automontados como sensores de pH:** Aplicar os filmes automontados como porta estendida em dispositivos SEGFETs a fim de se obter novos sensores de pH.
- IV. **Imobilização de enzimas nos filmes automontados:** imobilizar as enzimas glicose oxidase (GOx) e urease, que são específicas na catálise de glicose e uréia, respectivamente, nos filmes automontados visando à obtenção de biossensores baseados em dispositivos SEGFETs.

Quatro sistemas foram propostos e implementados ora como sensores de pH, ora como biossensores de glicose ou uréia. No primeiro sistema, filmes comerciais de ITO foram funcionalizados com filmes automontados contendo dendrímeros de poli(propileno imina) (PPID), uma macromolécula porosa, e metaloftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc), um composto organometálico amplamente utilizado em sensores. O sistema ITO- (PPID/NiTsPc) foi aplicado como SEGFET sensor de pH e, através da imobilização da enzima GOx, como biossensor para determinação de glicose.

No segundo sistema, a polianilina foi sintetizada em sua forma nanoparticulada (PANI-N) visando melhorar a solubilidade do polímero. Filmes automontados de PANI-N em conjunto com o polímero poli (ácido vinil sulfônico) (PVS) foram fabricados em substratos de vidro recoberto com ouro (Au) e empregados como membranas sensíveis ao pH em SEGFETs. Através da imobilização da enzima urease, o mesmo sistema foi empregado como biossensor para detecção de uréia.

O terceiro sistema é baseado em filmes automontados contendo nanopartículas comerciais de dióxido de titânio ($\text{TiO}_2\text{-Np}$) e dendrímeros PPID. Automontados em substratos de vidro recoberto com Au, o sistema (PPID/ $\text{TiO}_2\text{-Np}$) foi implementado como sensor de pH e biossensor de glicose através da imobilização da enzima GOx.

Por fim, numa primeira etapa, nanoestruturas unidimensionais (1D) de pentóxido de vanádio, com diferentes formas, foram depositadas diretamente em substratos de Au por spin-coating e utilizadas como sensores de pH. Ainda, as nanoestruturas foram combinadas na forma de filmes automontados utilizando o polímero poli (alilamina hidroclorada) (PAH) como contra-íon e também aplicadas como sensores de pH. Biossensores para determinação de uréia foram construídos utilizando a nova plataforma automontada como suporte para imobilização da enzima urease.

A tese está organizada da seguinte forma: o **Capítulo 2** exibe uma revisão sobre sensores baseados em transistores de efeito de campo, enfatizando sua operação. Em especial o ISFET, o SEGFET e o EnFET (FET enzimático) são descritos em detalhes. O **Capítulo 3** descreve a técnica de automontagem convencional e a técnica de automontagem assistida por spin, ambas utilizadas nesse trabalho. Sensores e biossensores de efeito de campo baseados na técnica LbL também são abordados no **Capítulo 3**. Os materiais utilizados no trabalho, bem como as técnicas de caracterização e a configuração experimental do dispositivo SEGFET são apresentados no **Capítulo 4**. Os **Capítulos de 5 a 8** são destinados aos resultados e discussões dos quatro sistemas estudados. Vale ressaltar que esses capítulos foram escritos como trabalhos individuais. Por fim, as considerações finais e sugestões para possíveis trabalhos futuros são apresentadas no **Capítulo 9**.

2 **SENSORES BASEADOS NO CONCEITO DE EFEITO DE CAMPO**

A idéia de se controlar a condutividade em semicondutores via campo elétrico, proposta e patenteada por Lilienfeld em 1928, abriu caminho para a fabricação do MOSFET nos laboratórios Bell em 1960 (28). Este fato revolucionou a indústria eletrônica tornando possível o desenvolvimento dos demais circuitos integrados. Um pouco mais tarde, Bergveld expandiu o conceito de MOSFET para o campo bioquímico apresentando à comunidade científica o ISFET. Tal dispositivo permitia monitorar a atividade iônica em meio fisiológico devido ao campo elétrico produzido na porta do dispositivo pelos íons em solução (12-13).

A proposta de Bergveld levou ao desenvolvimento de uma série de dispositivos baseados em efeito de campo (FED, *field effect devices*) (14-15, 29). Seja com o intuito de medir a atividade de íons em ambientes químicos ou para aplicação como biossensores baseados em efeito de campo (BioFEDs) (14-15, 29). Dentre esses dispositivos, destaca-se o próprio (ISFET) (14), sua derivação, isto é, o SEGFET (19) e o sensor capacitivo eletrólito-isolante-semicondutor (EIS, *electrolyte-insulator-semiconductor*) (30). Nesses dispositivos, o potencial na superfície do material isolante (camada ou membrana sensível) da porta é alterado pela concentração iônica da solução, controlando assim o sinal de saída do mesmo.

O princípio de funcionamento de um FED ou BioFED é norteado por vários conceitos básicos de Física e Química. Os aspectos relevantes referentes a esses sistemas, bem como o princípio de operação de alguns FEDs, objetivo de estudo desse trabalho, é abordado na sequência.

2.1 **O MOSFET E O ISFET**

O transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor ou simplesmente transistor MOS, é composto por um substrato semicondutor dopado (geralmente silício, Si)

com regiões denominadas fonte e dreno (31). Essas regiões são dopadas com portadores de carga contrária à carga do substrato e a região entre a fonte e o dreno é denominada canal do transistor. O portador de carga majoritário do canal (elétrons ou buracos) classifica o tipo do transistor MOS (31). Quando os portadores do canal são elétrons (dopagem negativa), o MOSFET recebe a denominação de N-MOS. Em contrapartida, se os portadores do canal forem buracos (dopagem positiva), o MOSFET é denominado P-MOS (31). A Figura 2.1 ilustra esquematicamente a estrutura de um MOSFET tipo N.

Figura 2.1 – Corte em secção transversal de um transistor N-MOS.

A operação do MOSFET é baseada no controle da corrente elétrica entre os eletrodos dreno e fonte (I_{DS}) em função de uma tensão aplicada no eletrodo de porta (V_{GS}). Uma diferença de potencial entre a fonte e o dreno (V_{DS}) cria uma corrente de elétrons no canal. Essa corrente depende da resistência do canal, a qual varia de acordo com a quantidade de impurezas nos eletrodos fonte e dreno (31). O comprimento do canal (L), sua largura (W), a capacitância do óxido de porta (C_{ox}) e a mobilidade dos portadores do canal (μ), também são parâmetros que influenciam I_{DS} (31). Outra característica do MOSFET é a altíssima impedância da porta devido à presença de uma camada isolante entre o eletrodo metálico e o canal, o que impossibilita qualquer drenagem de corrente via porta.

Uma tensão V_{GS} positiva atrairá elétrons para a região do canal uma vez que o substrato está dopado positivamente, ou seja, a variação de V_{GS} modula a quantidade de portadores (nesse caso, elétrons) no canal. Quando a quantidade de portadores ditadas por V_{GS} for suficiente, uma tensão V_{DS} levará ao escoamento de uma corrente no canal. Esse valor de

V_{GS} necessário que haja corrente no canal recebe o nome de tensão de limiar (V_T) e é expressa segundo a equação abaixo (14):

$$V_T = \frac{\Theta_M - \Theta_{Si}}{q} - \frac{Q_{SS} + Q_{Ox} + Q_B}{C_{Ox}} + 2\phi_f \quad (2.1)$$

O primeiro termo reflete a diferença de função trabalho entre o metal do eletrodo de porta Φ_M e a função trabalho do silício Φ_{Si} , sendo q a carga elementar. O segundo termo, por sua vez, se refere ao acúmulo de cargas na superfície do silício Q_{SS} , na interface óxido-silício Q_{Ox} e na região de depleção do silício Q_B . O terceiro termo $2\phi_f$ é o potencial de Fermi, sendo dependente do nível de dopagem do silício (14).

Variando-se o valor de V_{DS} , I_{DS} aumenta segundo a equação (14, 31):

$$I_{DS} = \mu C_{Ox} \frac{W}{L} \left[(V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad (2.2)$$

A equação 2.2 é válida para $V_{DS} \leq V_{GS} - V_T$, conhecida como região de triodo (31). Ainda, aumentando-se V_{DS} , o MOSFET passa a operar em uma região conhecida como região de saturação. Nessa condição, ocorre o estrangulamento do canal, ou seja, atinge-se um ponto de máxima corrente. Na região de saturação, I_{DS} varia segundo a equação (31):

$$I_{DS} = \mu C_{Ox} \frac{W}{L} \frac{(V_{GS} - V_T)^2}{2} \quad (2.3)$$

Em suma, pode-se concluir que V_{GS} modula a quantidade de portadores no canal e V_{DS} é responsável pela operação do MOSFET na região de triodo ou na região de saturação. A Figura 2.2 ilustra as curvas características de um MOSFET. A Figura 2.2a ilustra como a corrente I_{DS} de um MOSFET tipo N varia em função da tensão entre os eletrodos dreno e fonte (V_{DS}) para $V_{GS} > V_T$. Já a Figura 2.2b ilustra como I_{DS} varia em função de V_{GS} para $V_{DS} \geq V_{GS} - V_T$. Nessa curva, a tensão de limiar V_T é obtida a partir da extrapolação no eixo das abscissas (31).

Figura 2.2 – Família de curvas características $I_{DS} \times V_{DS}$ de um MOSFET tipo N (a) e curva $I_{DS} \times V_{GS}$ para um pequeno valor de V_{DS} (b).

Um ISFET, por sua vez, consiste na modificação ou adaptação de um MOSFET. O processo de fabricação de ambos os dispositivos é o mesmo, ou seja, as etapas de processamento de circuitos integrados. Contudo, o eletrodo de porta não existe mais no ISFET, sendo substituído por um eletrodo de referência contido em uma solução eletrolítica e em contato com o óxido da região de porta (14). Figura 2.3 ilustra esquematicamente a estrutura de um ISFET.

Figura 2.3 – Esquema ilustrativo da estrutura de um ISFET. O eletrodo porta de um MOSFET é substituído por um eletrodo de referência contido na solução eletrolítica que está em contato com o material isolante.

O princípio de operação de um ISFET é o mesmo de um MOSFET. Porém, o efeito de campo não é mais causado por um potencial externo no eletrodo de porta, e sim devido a uma mudança de concentração iônica da solução, geralmente concentração de íons H^+ , o que causa a alteração do potencial na interface eletrólito-óxido. Essa alteração do potencial é regida pelo modelo de sítio de ligação (*site binding*) (32-33). O modelo sugere que a superfície dos óxidos anfotéricos (A) apresentam espécies químicas em três formas distintas: negativas (AO^-), neutras (AOH) e positivas (AOH_2^+). Dessa forma, as seguintes reações de ligação ocorrem da superfície do óxido (membrana sensível). (32-33):

A corrente entre os eletrodos dreno-fonte do ISFET é modulada pelo potencial na superfície (ψ) do óxido, sendo a relação deste e o pH da solução dada pela seguinte equação (14, 22):

$$\psi = \frac{2,3kT}{q} \frac{\beta}{\beta+1} (p_{pzc} - pH) \quad (2.6)$$

onde q é a carga elementar, k a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, β um parâmetro que reflete a sensibilidade química do material da porta sendo dependente da densidade superficial de grupos hidroxilas (OH) e da reatividade de superfície e pH_{pzc} o valor de pH de carga zero.

Baseando-se nas equações do MOSFET, o comportamento de V_T de um ISFET será dependente também do potencial no eletrodo de referência ($E_{Ref.}$), do potencial superficial de dipolo em virtude da solução ($\chi_{Sol.}$), e do potencial de superfície na interface óxido-eletrólito (ψ). Dessa forma, V_T varia não mais como a equação 2.1 e sim segundo a equação abaixo (14):

$$V_T = E_{Ref.} - \psi + \chi_{Sol.} - \frac{\Theta_{Si}}{q} - \frac{Q_{ss} + Q_{ox} + Q_B}{C_{ox}} + 2\phi_f \quad (2.7)$$

O óxido de silício (SiO_2) foi o primeiro material utilizado como camada sensível a íons em dispositivos ISFETs (12-13). Contudo, o SiO_2 apresenta uma sensibilidade em torno de 38 mV.pH^{-1} (14, 34), ou seja, aquém do valor teórico sugerido pela equação de Nernst ($59,15 \text{ mV.pH}^{-1}$, a 25°C) (14). Após o SiO_2 , diversos óxidos ou nitretos metálicos foram introduzidos como materiais sensíveis ao pH. Dentre eles, destacam-se o nitreto de silício (Si_3N_4) (35), o óxido de alumínio (Al_2O_3) (36), o óxido de tântalo (Ta_2O_5) (37) e o óxido de estanho (SnO_2) (38), materiais que geralmente apresentarem uma sensibilidade Nernstiana à variações de pH.

2.2 O EGFET E O SEGKET

O EGFET foi proposto primeiramente por Van der Spiegel e colaboradores em 1983 e trata-se de uma modificação do ISFET convencional (16). O EGFET é formado por uma camada ou membrana sensível, a qual é estendida até o eletrodo de porta de um MOSFET ou conectada a um amplificador operacional (16). No primeiro caso, tanto a membrana sensível quanto o MOSFET são construídas no mesmo substrato ou chip (Figura 2.4) (16). Por outro

lado, o aprimoramento do dispositivo EGFET proposto por Chi et. al., utiliza uma membrana sensível conectada a um MOSFET comercial (Figura 2.5) (17). Agora, a membrana e o MOSFET não estão contidos no mesmo chip, sendo mais conveniente, denominar o dispositivo de SEGFET (EGFET com membrana separada) (17).

O funcionamento de um dispositivo EGFET/SEGFET é o mesmo de um ISFET, ou seja, modulação da corrente dreno-fonte via alteração do potencial de superfície na camada sensível. Portanto, as equações que descrevem o comportamento elétrico de um ISFET são as mesmas para o EGFET/SEGFET (17, 19, 22).

Figura 2.4 – Estrutura do dispositivo EGFET proposto por Van der Spiegel. A membrana sensível e o MOSFET estão contidos no mesmo substrato ou chip (16).

Figura 2.5 – Estrutura do dispositivo SEGFET proposto por Chi. A membrana sensível é conectada a um MOSFET comercial (17).

A configuração de um SEGFET possui algumas vantagens em relação a dispositivos ISFETs: o processo de medida é simples, a imobilização de biomoléculas é facilitada e o dispositivo comercial pode ser reaproveitado para a aplicação em dispositivos descartáveis (17, 19). Tais vantagens permitem que novos materiais possam ser testados como membranas sensíveis ao pH de maneira simples e rápida. Assim, a pesquisa em dispositivos SEGFETs se concentra no teste de novos materiais e na otimização do processo de fabricação dos mesmos visando obter novas membranas sensíveis. A Tabela 2.1 resume os materiais comumente utilizados como camada sensível em dispositivos SEGFETs. Observa-se que existe uma gama de materiais utilizados obtidos por diferentes técnicas.

Devido à alta sensibilidade ao pH apresentada por ISFETs e SEGFETs, esses dispositivos têm sido utilizados como biossensores. Neste caso, um material biológico (geralmente uma enzima) é imobilizado na camada sensível, dando forma a um transistor de efeito de campo enzimático (EnFET, do inglês *enzyme field-effect transistor*) (39). Neste contexto, novos biossensores baseados no conceito de efeito de campo podem ser facilmente construídos.

A fácil manipulação de um SEGFET, comparativamente a um ISFET, torna esse tipo de dispositivo mais atrativo para a aplicação em biossensores, tendo em vista que a manipulação do dispositivo se restringe somente na modificação do *gate* estendido com o material biológico sem a necessidade de etapas de microprocessamento. Uma abordagem acerca dos FETs enzimáticos, especialmente aqueles baseados na configuração SEGFET é abordado em sequência.

Tabela 2.1 – Materiais comumente utilizados como camada sensível em dispositivos SEG-FETs.

Material	Fórmula	Método de	Sensibilidade	Referência	Ano
	Química	Fabricação	(mV.pH ⁻¹)		
Óxido Misto de Vanádio/ Tungstênio	V ₂ O ₅ /WO ₃	Sol-gel	68	(40)	2011
Óxido de Estanho dopado com Flúor	SnO ₂ :F	Comercial	50	(41)	2010
Óxido de Vanádio	V ₂ O ₅	Sol-gel	58,1	(21)	2009
Óxido de Titânio	TiO ₂	Sol-gel	58,73	(42)	2009
Nitreto de Rutênio	RuN		58,03	(43)	2009
Óxido de Alumínio	Al ₂ O ₃	Anodização	56	(23)	2006
Óxido de Zinco	ZnO	Sol-gel	38	(22)	2005
Nanotubos de silício	Si	CVD	58,3	(44)	2005
Óxido de índio dopado com estanho	In ₂ O ₃ :Sn	Comercial	58	(18)	2001
Nitreto de titânio	TiN	Sputtering	57	(45)	2001
Óxido de estanho	SnO ₂	Sputtering	58	(17)	2000

2.3 O ENFET

A união entre a especificidade de sistemas biológicos com transistores de efeito de campo deu origem a uma ferramenta versátil para ser utilizada em análises clínicas. O transistor de efeito de campo enzimático é baseado na imobilização de uma enzima que produz ou consome prótons durante a catálise de um analito específico, alterando assim o pH próximo da camada sensível que está acoplada a um dispositivo de efeito de campo (46).

A idéia de união entre enzimas e ISFETs foi proposta pela primeira vez em 1976 por Janata e Moss (47). Contudo, a realização prática de um EnFET veio quatro anos mais tarde, quando Caras e Janata construíram um EnFET para a determinação de penicilina (48). A

partir de então, uma série de EnFETs foram produzidos para determinação de diversas substâncias (39). Tanto substâncias de interesse clínico como glicose (49), uréia (50), creatinina (51) e acetilcolina (52), bem como substâncias de interesse ambiental como fenóis (53) e pesticidas (54), podem ser determinadas por EnFETs. Ainda, a combinação de enzimas com o conceito de efeito de campo abriu caminho para o desenvolvimento de uma série de dispositivos biológicos de efeito de campo para diversas aplicações tecnológicas (29, 55). Um EnFET clássico, ou seja, o qual utiliza a configuração de um ISFET, é ilustrado esquematicamente na Figura 2.6.

Figura 2.6 – Estrutura de dispositivo EnFET clássico. Enzimas são imobilizadas na camada sensível ao pH.

Como em qualquer biossensor, o método de imobilização da enzima constitui uma etapa fundamental na construção de um EnFET. Diversos métodos para imobilização enzimática estão presentes na literatura (56). Os métodos mais utilizados se dão através do encapsulamento da enzima em matrizes ou microcápsulas poliméricas ou através de ligações físicas ou químicas da enzima ao suporte (56).

A imobilização de uma enzima via encapsulamento consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula polimérica. Neste sistema é criada uma membrana seletiva que impede que as enzimas (moléculas grandes) se difundam através da membrana, enquanto que moléculas pequenas como analitos e produtos podem difundir facilmente.

Soldatkin et. al. desenvolveram um EnFET para determinação de creatinina imobilizando a enzima creatinina deiminase (CD) em uma matriz de poli (álcool vinílico) depositada na camada sensível de um ISFET composta por Si_3N_4 (51). A vantagem desse método é que a enzima não reage quimicamente com o suporte, não comprometendo assim

seu sítio ativo. Porém, a difusão dos elementos através da membrana pode ser um problema, visto que a velocidade de difusão pode comprometer o tempo de resposta do biossensor.

A adsorção de uma enzima é método de imobilização mais utilizado devido a sua simplicidade. Além disso, é o método que menos inibe a atividade ou causa desnaturação da proteína (57). Neste caso, a enzima é imobilizada em um suporte sólido, onde estão envolvidas ligações de baixa energia como ligações de hidrogênio, iônicas ou forças de van der Waals (57). Siqueira Junior e colaboradores construíram um biossensor para detecção de penicilina baseado em uma estrutura de efeito de campo capacitiva funcionalizada com filmes multicamadas de dendrímeros e nanotubos de carbono (58). Assim, um elegante BioFED foi obtido através da simples adsorção da enzima penicilinase nas multicamadas dendrímero/nanotubos (58). Apesar da simplicidade, a adsorção de proteínas para o projeto de biossensores pode levar a uma baixa estabilidade operacional, uma vez que o biocatalisador pode ser lixiviado do eletrodo com o tempo, comprometendo assim, o bom funcionamento do dispositivo (57).

A imobilização covalente de uma enzima envolve a ligação efetiva entre a enzima e o suporte através da ativação prévia de grupos reativos presentes no mesmo. Desta forma, os suportes devem possuir grupos funcionais que possam ser ativados. A ativação do suporte, na maioria das vezes, consiste em silanização, reações com carbodiiminas e glutaraldeído. As enzimas são ligadas à matriz através de grupos funcionais presentes em seus aminoácidos (56). Contudo, deve-se ter o cuidado para não se comprometer o sítio ativo da enzima ao se efetivar a ligação, pois isto comprometeria sua atividade catalítica. O emprego do método de ligação covalente para o preparo de biossensores pode levar a uma melhor estabilidade operacional, uma vez que a enzima é ligada irreversivelmente à matriz.

Em EnFETs, observa-se uma preferência pela modificação da camada sensível com agentes silanos, principalmente o 3-aminopropiltrietoxissilano (3-ATPS), tendo em vista que a camada não possui grupos funcionais para a ligação covalente direta da enzima (52, 59-63). Neste caso, o óxido da camada sensível é primeiramente modificado com 3-ATPS e o acoplamento da enzima se dá então com o auxílio do glutaraldeído (GA), um agente de entrecruzamento amplamente utilizado em processos de imobilização enzimática (52, 59-63). A Figura 2.7 ilustra detalhadamente o processo de modificação da superfície de um óxido com 3 ATPS e GA seguido do processo de imobilização enzimática.

Alternativamente à silanização, a técnica de preparação de filmes por automontagem camada por camada pode ser utilizada para a modificação ou a funcionalização de superfícies

e/ou substratos condutores visando a imobilização de enzimas. Detalhes dessa técnica bem como a uma adaptação da mesma com a técnica de *spin-coating* são detalhados na sequência.

Figura 2.7 – Ilustração do processo de modificação da camada sensível de um ISFET com 3 ATPS (a) e ativação com GA (b) seguido do processo de imobilização covalente na enzima (c).

3 FILMES AUTOMONTADOS CAMADA POR CAMADA (LBL)

No presente trabalho, utilizamos filmes automontados como porta estendida em dispositivos SEGFETs. Os filmes foram automontados alternando-se as camadas de materiais diferentes por *dipping* ou *spin coating*. Detalhes das técnicas bem como a diferença entre elas são apresentados neste capítulo.

3.1 TÉCNICA DE AUTOMONTAGEM CAMADA POR CAMADA (LBL)

A técnica de automontagem camada por camada via *dipping coating* ou simplesmente LbL se caracteriza pela simplicidade do aparato experimental utilizado na construção dos filmes. A princípio, necessita-se apenas de béqueres e soluções contendo os materiais a serem automontados. Diversos materiais carregados com cargas opostas podem ser combinados, resultando em filmes multicamadas com propriedades que podem ser distintas e únicas quando comparados aos materiais precursores (25).

Baseado na automontagem através de ligações químicas (26), Iler et. al. propuseram construir filmes multicamadas por adsorção física em 1966 quando automontaram multicamadas de partículas coloidais (26). Entretanto, a técnica LbL ganhou notoriedade com os trabalhos de Decher, Lvov e colaboradores (64-66). A partir de então, a técnica LbL passou a ser empregada em diversos ramos da ciência (25), incluindo a manipulação de materiais em escala nanométrica (67-69), a construção de sensores (69-70) e biossensores (71-72). A Figura 3.1 ilustra o esquema de um filme LbL na qual as cores diferentes correspondem à materiais carregados com cargas opostas. As etapas do processo de fabricação do mesmo filme são ilustradas na Figura 3.2.

Figura 3.1 – Representação esquemática de um filme obtido pela técnica de automontagem camada por camada.

Figura 3.2 – Representação esquemática da técnica de automontagem camada por camada.

Um substrato sólido convenientemente carregado é inserido por certo período de tempo em uma solução contendo o material carregado positivamente (policación), por exemplo, que adsorve ao substrato (etapa 1). O substrato passa por um processo de lavagem para remoção do excesso de material ou material fracamente adsorvido (etapa 2). Uma monocamada automontada é então formada. Em seguida, o substrato pré-recoberto positivamente é inserido na solução contendo o material negativo ou poliânion (etapa 3). De forma semelhante à etapa de lavagem anterior, o material em excesso ou não absorvido é removido (etapa 4), resultando em uma bicamada policación/poliânion. Vale ressaltar, que etapas intermediárias de secagem no ambiente ou com fluxo de gás nitrogênio (N_2) podem

estar presentes no processamento de filmes LbL. A repetição do processo descrito anteriormente permite a obtenção de filmes com o número de bicamadas desejadas (25).

O monitoramento clássico do processo de crescimento de um filme LbL é realizado por espectroscopia de absorção UV-Vis (25) medindo-se a banda de absorção de um dos eletrólitos (19) ou por meio da medida da massa do material adsorvido com auxílio de uma microbalança de cristal de quartzo (73). Condições como o tempo de adsorção, pH da solução, concentração do polieletrólito e força iônica, influenciam as propriedades de deposição e as características do filme. Dessa forma, essas condições devem ser cuidadosamente estudadas a fim de se otimizar o processo de automontagem (19).

3.2 TÉCNICA DE AUTOMONTAGEM ASSISTIDA POR SPIN (SA-LbL)

Apesar das vantagens potenciais oferecidas pela técnica LbL convencional via *dipping*, a técnica se limita a soluções aquosas e a dependência de solubilidade dos materiais envolvidos no processo e no controle preciso dos parâmetros utilizados no crescimento do filme. Neste sentido, Cho e colaboradores propuseram uma alternativa à técnica LbL combinando a mesma com a técnica de *spin-coating* (74). Trata-se da técnica de automontagem camada por camada assistida por spin (SA-LbL, do inglês *spin-assisted layer by layer*) (74-75). Essa técnica de obtenção de filmes consiste na deposição de algumas gotas da solução policationica sobre o substrato e na subsequente rotação por determinado período de tempo suficiente para secagem. O mesmo procedimento é repetido para a deposição da camada de poliânion, resultado assim em uma bicamada (Figura 3.3). O processo é repetido para o número de bicamadas desejado (74-75).

De acordo com a literatura (75), filmes fabricados com a técnica SA-LbL são mais espessos, porém menos rugosos que filmes produzidos pela técnica convencional, em virtude da rápida eliminação do solvente (água) no processo de rotação. Moléculas de água podem pré-adsorver ao substrato no caso da técnica convencional, bloqueando o polieletrólito; fato que compromete o recobrimento total da superfície (75).

Figura 3.3 – Representação esquemática da técnica de automontagem camada por camada assistida por spin (SA-LbL). A repetição do processo permite obter filmes multicamadas.

A diferença básica entre a técnica convencional LbL e a técnica SA-LbL se refere aos mecanismos de adsorção do material ao substrato. No caso convencional, as cadeias do polieletrólito se difundem para o substrato via interações eletrostáticas ou através de interações secundárias (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de Van der Waals), organizando-se sobre o substrato. A retirada do excesso de material se passa na etapa de lavagem. Por outro lado, no processo SA-LbL, ocorre a adsorção de material sobre o substrato enquanto a solução está sobre o mesmo e também durante a sua eliminação devido ao processo *spin* através da alta velocidade de rotação em um curto período de tempo. O rápido processo de secagem da solução faz aumentar a concentração do polieletrólito na superfície de deposição e, conseqüentemente, a sua adsorção (74).

3.3 SENSORES E BIOSENSORES DE EFEITO DE CAMPO UTILIZANDO AUTOMONTAGEM

Livov e colaboradores demonstraram que biomoléculas podem ser automontadas pela técnica LbL preservando uma alta atividade após a imobilização (27, 76). Neste contexto, filmes LbL contendo materiais biológicos podem ser facilmente aplicados em biossensores. Além disso, a técnica LbL permite funcionalização de substratos de modo que sistemas adequados possam ser construídos na última camada para a imobilização covalente de enzimas (77). A fácil combinação de diversos materiais permitida pela técnica LbL abre então caminho para um vasto campo de aplicações tecnológicas. Logo, a união da técnica LbL com

o conceito de efeito de campo é promissora para a obtenção de MOSFETs e circuitos integrados.

Cui e colaboradores aplicaram métodos convencionais de microeletrônica combinados com automontagem de nanopartículas de SnO_2 ou In_2O_3 e SiO_2 para obter a camada ativa e a camada isolante, respectivamente, de um MOSFET (78-79). Apesar da baixa mobilidade de portadores quando comparados aos transistores convencionais, a abordagem apresentada por Cui se mostrou promissora para fabricação de MOSFETs a baixo custo (78, 79).

Filmes finos de PANI e nanopartículas de SiO_2 foram combinados via LbL por Liu et. al. e aplicados como ISFET e EnFET para detecção do neurotransmissor acetilcolina (80). Devido as suas propriedades semicondutoras, a PANI atua como o material semicondutor do canal do transistor, enquanto que as nanopartículas de SiO_2 como dielétrico de porta. Em uma estratégia semelhante, Xue, trabalhando no mesmo grupo de Liu, utilizaram nanotubos de carbono alternativamente à PANI (81). O último sistema apresentou uma maior mobilidade dos portadores e da mesma forma foi aplicado como EnFET para a detecção de acetilcolina (82).

Com os trabalhos citados anteriormente, cerca de quarenta dispositivos ISFETs foram construídos no mesmo substrato (80). Contudo, a técnica LbL parece ser mais adequada para aplicação em dispositivos de efeito de campo que operam com estruturas separadas, como o SEGFET e o EIS, em virtude de etapas de microprocessamento não estarem presentes durante a fabricação do dispositivo. Portanto, o processo de fabricação se restringe a simples manipulação da camada sensível (19, 69, 83). Neste sentido, Siqueira Junior e colaboradores funcionalizaram uma estrutura EIS formada por Ta_2O_5 com dendrímeros PAMAM e nanotubos de carbono (84). Altamente sensível a variações de pH ($54,5 \text{ mV.pH}^{-1}$) o sistema foi aplicado como biossensor para detecção de penicilina (58). Por sua vez, Fernandes et. al. funcionalizaram a superfície de ITO com filmes LbL contendo dendrímeros PPID e ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc). O sistema PPID/NiTsPc foi aplicado como SEGFET sensor de pH com potencial aplicação em biossensores (EnFETs) (19).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais utilizados no trabalho, a técnica de síntese e automontagem dos mesmos, bem como as técnicas de caracterização dos filmes LbL. A configuração experimental do dispositivo SEGFET utilizado como sensor de pH e biossensor ou EnFET para detecção de glicose e uréia também é descrita em detalhes.

4.1 MATERIAIS SENSÍVEIS A ÍONS

Quatro materiais diferentes foram utilizados como camada sensível nos dispositivos SEGFET: o óxido de índio dopado com estanho (ITO), nanopartículas de polianilina (PANI-N), nanopartículas esféricas de dióxido de titânio (TiO₂-Np) e nanoestruturas unidimensionais de pentóxido de vanádio. A escolha dos materiais foi baseada em suas propriedades anfotéricas, ou seja, propriedade de doar ou aceitar prótons, princípio básico para detecção de pH. Devido à grande área superficial, materiais obtidos em escala nanométrica podem potencializar o desempenho do dispositivo sob o ponto de vista de suas propriedades físico-químicas quando as mesmas são comparadas ao volume.

4.1.1 ÓXIDO DE ÍNDIO DOPADO COM ESTANHO (ITO)

O óxido de índio dopado com estanho (ITO) é o óxido condutor transparente mais utilizado e relatado na literatura como eletrodo (85). Ele é constituído de uma mistura de óxido de índio (In₂O₃) e óxido de estanho (SnO₂), geralmente em proporções de 90% e 10%, respectivamente. O ITO exibe uma baixa resistividade elétrica (10^{-4} - 10^{-6} Ω.cm), lacuna de

energia relativamente pequena ($E_g = 3,3$ eV), além de apresentar boa estabilidade físico-química e morfologia superficial.

Por ser um óxido anfótero (ou anfiprótico), o ITO pode se comportar como ácido ou base dependendo do meio reacional. Este fato levou a aplicação desse material como camada sensível em dispositivos EGFETs (18). Devido a sua alta condutividade, o ITO também pode atuar como um “metal” nesses dispositivos, fazendo parte, neste caso, da interface metálica da junção metal-óxido da porta estendida do dispositivo em substituição ao alumínio (59). Ainda, no que tange a aplicação em biossensores, trabalhos indicam que proteínas podem ser covalentemente imobilizadas na superfície do óxido através de reações de esterificação entre o grupo OH da superfície do ITO e os grupos carboxílicos presentes nas moléculas proteicas (86, 87). A presença de grupos OH na superfície do ITO também facilita a adsorção dos grupos carboxílicos e/ou grupos amina através de ligações de hidrogênio ou podem ser ativados através de reações com cloreto cianúrico, ligando covalentemente as enzimas ao ITO (86, 87).

4.1.2 POLIANILINA NANOPARTICULADA (PANI-N)

A polianilina (PANI) é o polímero semicondutor mais conhecido e utilizado pela comunidade científica. Devido à sua estabilidade química, baixo custo de processamento, fácil síntese e possibilidade de controle sobre propriedades elétricas via dopagem reversível da cadeia polimérica (88), a PANI tem sido aplicada em um vasto campo da ciência (89) especialmente em sensores químicos (90), diodos emissores de luz (91) e biossensores (92).

A fórmula química geral da PANI é ilustrada na Figura 4.1 na qual Y representa o estado de oxidação e X o grau de polimerização. Através de uma reação reversível redox, a estrutura da PANI pode apresentar três estados de oxidação distintos: *pernigranilina*, onde a PANI se encontra totalmente oxidada ($y = 0$); *esmeraldina* onde a cadeia polimérica está parcialmente oxidada ($Y = 0,5$) ou *leucoesmeraldina*, com o polímero totalmente reduzido $y = 1$ (93). A PANI pode existir na forma condutora, como sal de esmeraldina. Neste caso, a alteração da cadeia se dá pela protonação da estrutura de esmeraldina ou pela oxidação parcial da leucoesmeraldina (93).

Figura 4.1 – Formula química geral da polianilina (PANI).

Uma das aplicações mais interessantes da polianilina se refere à sua aplicação como material ativo em sensores (94-96). No caso específico de sensores de pH, o mecanismo referente a sensibilidade se deve à afinidade dos íons H^+ do eletrólito com os grupamentos amina presentes na estrutura da PANI, o que altera a densidade de carga na superfície do polímero (97). No entanto, o processamento da polianilina na forma de filmes finos para a aplicação em sensores é limitada devido à baixa solubilidade apresentada pelo polímero em meio aquoso. Visando melhorar o processamento, a PANI vem sendo sintetizada sua forma nanoparticulada via polimerização interfacial (98-99). A técnica consiste na polimerização dos reagentes na interface entre duas fases líquidas imiscíveis. Para obtenção da PANI em sua forma condutora, geralmente opta-se por solubilizar a anilina em um solvente orgânico e o dopante juntamente com o agente oxidante em água (98-99).

A estratégia descrita anteriormente foi utilizada nesse trabalho com o intuito de melhorar a solubilidade do polímero visando a formação de filmes automontados. Para tal, antes da síntese, os monômeros de anilina (Sigma Aldrich) foram duplamente destilados, armazenados a baixa temperatura ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) e protegidos da luz. O processamento via polimerização interfacial (98-100) se deu na reação do monômero (1 mL) dissolvido em clorofórmio (50 mL) (fase orgânica) com o oxidante (persulfato de amônio) e o dopante (HCl) misturados em uma fase aquosa (285 mg de persulfato de amônio dissolvidos em 50 mL de HCl a 1M). A fase aquosa foi cuidadosamente adicionada à fase orgânica com o auxílio de um bastão de vidro. Com o passar do tempo observa-se a formação de uma coloração verde escura na interface entre as duas fases indicando a formação da polianilina no seu estado dopado. Depois de três horas, a síntese se deu por completa. A PANI-N formada foi filtrada e lavada com HCl (1 M) a fim de se remover o excesso de reagentes. O produto final foi seco à vácuo por 24 h a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por fim, A PANI-N foi solubilizada/dispersada a 1 g.L^{-1} em solução aquosa, ajustando-se o valor do pH para 5 com adição de HCl (1M).

4.1.3 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO ($\text{TiO}_2\text{-Np}$)

O dióxido de titânio ou titânia (TiO_2) é um óxido metálico de transição muito interessante devido à alta estabilidade química e fácil preparação (101). O TiO_2 pode existir em três formas alotrópicas: bruquita, rutila e anatase (101), sendo as duas últimas as mais aplicadas no campo tecnológico, seja em fotocatalise, células solares ou dispositivos eletrocromicos (102).

Devido as suas propriedades anfotéricas, o TiO_2 também tem sido utilizado como camada sensível em sensores de pH (42, 103-104). Para esse propósito, técnicas como o sputtering (103), sol-gel (42) e deposição química a partir da fase vapor (CVD) (104) geralmente são utilizadas. Como dito anteriormente, a técnica LbL permite a combinação de matérias orgânicos e inorgânicos e neste sentido, nanopartículas de TiO_2 podem ser automontadas via LbL (67-68,105). Kommireddy e colaboradores automontaram nanopartículas de TiO_2 com poli(estireno sulfonado) e aplicaram o sistema PSS/ TiO_2 para fixação de células tronco (106). Priya et. al. automontaram um sistema semelhante e aplicaram o sistema para a fotodegradação de rodamina B sob ação de luz ultravioleta (107).

O TiO_2 possui ponto isoelétrico em torno de pH 6 (107), dessa forma, fica fácil a construção de filmes LbL utilizando tanto polieletrólitos positivos quanto negativos. Assim, optamos neste trabalho por fabricar filmes LbL contendo nanopartículas comerciais de TiO_2 ($\text{TiO}_2\text{-Np}$) (Sigma Aldrich, 100% anatase) utilizando o dendrímero poli (propileno imina) (PPID) como polycation no processo de automontagem.

4.1.4 NANOESTRUTURAS 1D DE PENTÓXIDO DE VANÁDIO (V_2O_5)

O pentóxido de vanádio, um composto químico com a fórmula V_2O_5 é o composto mais estável e comum de vanádio. No estado sólido possui coloração marrom/amarelo. Ao contrário da maioria dos óxidos metálicos, o V_2O_5 exibe uma boa solubilidade em água. Com propriedades físico-químicas interessantes, o V_2O_5 exibe um vasto potencial de aplicação tecnológica e neste sentido tem sido aplicado como material catalítico (108), em dispositivos eletrocromicos (109), catodo para baterias (110) e sensores (21, 111).

Recentemente, materiais nanoestruturados unidimensionais (1D), como nanofios,

nanofitas e nanotubos, têm atraído o interesse de diversos pesquisadores devido às suas propriedades não convencionais quando comparados ao mesmo material em volume (112). Não obstante, diversas estratégias são utilizadas para síntese do V_2O_5 1D. Recentemente, Avansi et. al. descreveram uma rota de síntese hidrotermal, com apenas um passo para síntese de nanoestruturas de $V_2O_5 \cdot nH_2O$ (113). Tal técnica permite um rigoroso controle da morfologia, da dopagem e da estrutura cristalina do óxido pela modificação das condições de síntese hidrotermal (113).

Visando aplicações tecnológicas, nanoestruturas de $V_2O_5 \cdot nH_2O$ sintetizadas sob condições hidrotermais nos foram cedidas pelo Prof. Valmor Mastelaro e seu ex-aluno de doutorado Dr. Waldir Avansi do grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do IFSC-USP. A síntese hidrotermal foi baseada na dissolução do pó micrométrico de V_2O_5 (Alfa Aesar, 99.995% de pureza) em água deionizada com a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A solução formada foi então submetida ao tratamento hidrotermal.

Visando obter diferentes tipos de nanoestruturas de $V_2O_5 \cdot nH_2O$, o tratamento foi realizado em diferentes temperaturas (160° , 180° e 200°) durante o mesmo tempo de síntese (24h) (113). Mais detalhes dessa síntese e uma caracterização completa dos materiais podem ser obtidos nas referências de Avansi e colaboradores (113, 114).

4.2 MATERIAIS UTILIZADOS COMO CONTRA ÍONS

Polímeros com cargas positivas ou negativas são chamados polieletrólitos (ou ainda macroíons ou poliíons). Polieletrólitos podem ser poliânions ou policátions e geralmente são solúveis em água. Muitos são os materiais que podem ser empregados na construção de filmes automontados (25). Entre os policátions mais utilizados destacam-se o poli(cloreto de alilamina) ou poli (alilamina hidrocloreto) (PAH), o poli(etileno imina) (PEI) e poli(cloreto de dialildimetilamônia) (PDAC). Por sua vez, os poliânions mais utilizados compreendem o poli(ácido vinil sulfônico) (PVS), o poli estireno sulfonado (PSS) e o poli(ácido acrílico) (PAA) (25).

Utilizamos nesse trabalho, o PVS como poliânion e o PAH como policátion para obtenção de filmes automontados com a polianilina nanoparticulada e com as nanoestruturas de pentóxido de vanádio, respectivamente. Contudo, alternativamente ao convencional,

utilizamos o dendrímero poli(propileno imina) (PPID) para a fabricação de filmes LbL com nanopartículas de TiO_2 ou com metaloftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc). Esta última escolhida devido às suas propriedades de detecção, uma vez que NiTsPc pode atuar como uma enzima artificial devido às suas propriedades catalíticas (115), além de apresentar seletividade iônica (116). Por sua vez, macromoléculas com arquitetura dendrítica representaram um recente avanço da química nanoscópica (117). O emprego de tais materiais para o projeto de sistemas nanotecnológicos tem atraído a atenção da comunidade científica pelo fato desses materiais apresentarem propriedades não convencionais quando comparados aos polímeros lineares ou ramificados, como, elevada área superficial e um grande número de grupos funcionais na periferia da macromolécula, ideais para imobilização de proteínas (77, 118). O dendrímero PPID nos foi cedido pelo professor Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz da Universidade Federal de Itajubá e detalhes da síntese desse polímero estão relatados na literatura (19).

4.3 CRESCIMENTO DOS FILMES AUTOMONTADOS

Quatro sistemas distintos foram automontados e utilizados como membranas sensíveis ao pH. Abaixo são descritos os procedimentos para o crescimentos das bicamadas dos sistemas estudados

ITO-(PPID/NiTsPc)

Utilizamos substratos de ITO obtidos da empresa Delta-technologies como substrato sensor de pH. Os filmes de ITO foram funcionalizados a estrutura automontada PPID/NiTsPc visando a imobilização de enzimas e uma superfície mais ativa. Para tal, os substratos de ITO (ou quartzo para estudo espectroscópico do crescimento dos filmes) foram imersos por 5 minutos em uma solução policatiônica de PPID a 1 g.L^{-1} , imersos em água ultrapura para remoção do excesso de material e secos com fluxo de N_2 . Em seguida, os substratos previamente recobertos com uma monocamada positiva de PPID foram imersos em uma solução aniônica de NiTsPc a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ durante 3 minutos, imersos em água ultrapura e secos da mesma maneira com fluxo de N_2 . O número desejado de bicamadas de (PPID/NiTsPc) é alcançado repetindo-se o ciclo descrito acima.

Au-(PVS/PANI-N)

Para a formação dos filmes automontados (PVS/PANI-N), os substratos (quartzo ou vidro recoberto com Au) foram imersos na solução policatiônica de PANI-N (1 g.L^{-1}) por 5 minutos, lavados em solução de pH 5 e secos com N_2 . Após formação de uma monocamada de PANI-N, os substratos foram imersos na solução polianiônica de PVS (1 g.L^{-1}) lavados em água-ultrapura e secos também com N_2 . Os filmes automontados contendo PANI-N foram aplicados como sensores de pH e posteriormente como biossensores para a determinação de uréia através da funcionalização dos mesmos com a enzima urease.

Au-(PPID/TiO₂-Np)

As multicamadas de (PPID/TiO₂-Np) foram depositadas sobre substratos de quartzo para o monitoramento espectroscópico do crescimento ou sobre filmes de vidro recoberto com Au para aplicação como sensores ou biossensores. O crescimento se deu através da imersão dos substratos na solução policatiônica de PPID (1 mg.mL^{-1} , pH = 8,0) durante 5 min, seguido de lavagem em solução aquosa de mesmo pH e secagem com fluxo de N_2 . Em seguida os substratos já recobertos com uma monocamada de PPID foram imersos na dispersão aniônica de TiO₂-Np (0.25 mg.mL^{-1} , pH = 8) durante 10 min, imersos na solução de lavagem e por fim secos com fluxo de N_2 . O sistema (PPID/ TiO₂-Np) foi utilizado como camada sensível em um SEGFET sensor de pH e como biossensor para detecção de glicose através da imobilização da enzima glicose oxidase nos mesmos.

Au-V₂O₅.nH₂O e Au-(PAH/V₂O₅-nanobastões)

Diferentes nanoestruturas 1D de V₂O₅.nH₂O foram depositadas via *spin coating* em substratos de vidro recoberto com Au e aplicadas diretamente com camada sensível ao pH. Uma parte da solução (100 μL) das nanoestruturas solubilizadas a 1 mg.mL^{-1} foram diretamente depositadas sobre os substratos utilizando uma rotação de 3000 rpm durante um tempo de 1 min.

Nanobastões de V₂O₅.nH₂O também foram automontados utilizando o polímero PAH como contra-íon. A técnica de automontagem utilizada nessa parte do trabalho consistiu em deposições alternadas de PAH e nanobastões de V₂O₅ pela técnica SA-LbL descrita na

secção 3.2. Para esse propósito, 100 μL da solução de PAH e da solução de nanobastões de $\text{V}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, ambas a $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, foram alternadamente depositadas em substratos de vidro recoberto com Au. O tempo de 1 min a uma rotação de 3000 rpm foram utilizados para secagem das camadas. Para um número desejado de bicamadas (PAH/ V_2O_5 -nanobastões), repete-se o procedimento descrito acima. Por fim, o sistema (PAH/ V_2O_5 -nanobastões) foi ativado com urease e aplicado como biossensor para detecção de uréia.

4.4 AS ENZIMAS GLICOSE OXIDASE E UREASE

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações químicas sendo fundamentais para qualquer processo bioquímico a nível fisiológico ou biotecnológico (119). Apresentando uma extraordinária eficiência catalítica e um alto grau de especificidade por seus substratos, tais biocatalisadores são utilizadas imobilizadas em suportes adequados em dispositivos biossensores. Neste trabalho, foram construídos biossensores para detecção de glicose e uréia, dois importantes hemometabólitos de interesse clínico a partir da imobilização dessas enzimas na porta estendida de dispositivos SEGFETs.

Especificamente, a glicose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4) é uma enzima da classe das oxi-redutases que catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- δ -lactona, o qual subsequente e espontaneamente, se hidrolisa em gluconato, gerando nessa hidrólise peróxido de hidrogênio e prótons, segundo a reação abaixo (49):

Os prótons resultantes da oxidação da glicose provocam uma alteração do pH local, podendo então ser utilizados como parâmetro de medida para biossensores baseados na detecção de mudanças de pH (EnFETs), como o SEGFET.

Por sua vez, a urease (EC 3.5.1.5) é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) em dióxido de carbono e amônia, gerando hidroxilas OH^- como produto reacional, segundo a reação (120):

Baseado na reação acima, observa-se uma variação de pH em virtude dos produtos da reação catalisada pela enzima urease. Isto é, haverá uma diminuição na concentração de íons de H^+ da solução de medida devido ao equilíbrio ácido-base com os produtos da reação enzimática, especificamente hidroxilas OH^- , portanto, ao contrário de EnFET de glicose, haverá um aumento no valor do pH local.

4.4.1 MÉTODO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, aumentar a estabilidade, reduzir custos e aumentar, em alguns casos, a atividade enzimática. Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização (56).

O glutaraldeído, em função de suas propriedades bifuncionais, tem sido um dos reagentes mais empregados na imobilização de enzimas devido à formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, conferindo à enzima maior estabilidade (121). Por sua vez, dendrímero PPID bem como o polímero linear PAH, podem ser considerados suportes ideais para imobilização de enzimas em virtude do grande percentual de grupos amina disponíveis em suas estruturas, particularmente na periferia da macromolécula (77, 118). Neste sentido, optou-se pelo método de imobilização através de entrecruzamento da enzima com o suporte, baseado em trabalhos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa (121).

Para a GOx, uma mistura de 50 mg dessa enzima, 20 mg de albumina do soro bovino (BSA) e 400 μ L de GA (2,5% em água) foram diluídos em 1 mL de tampão fosfato (pH 7.0). No caso da urease, a mistura enzimática continha 25 mg de urease, 10 mg de BSA e 400 μ L de GA (2,5% em água) também diluídas em 1 mL de tampão fosfato (pH 6.5). O processo de imobilização se completa a partir da adição de 10 μ L da solução enzimática sobre uma área de 5 mm x 5 mm da porta estendida do SEGFET. Após a adição solução, o eletrodo foi seco a vácuo por 1 hora a 25°C. As medidas de biossensoriamento foram realizadas no mesmo dia em que se processava a imobilização das enzimas, a não ser em casos do estudo operacional do biossensor ao longo do tempo.

4.5 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS

Os filmes utilizados como porta estendida em dispositivos SEGFET foram automontados em substratos de quartzo para estudo do crescimento e em substratos condutores (ITO e vidro recoberto Au) para utilização com sensores de pH e biossensores. Filmes de Au com espessura de 120 nm foram preparados pela técnica de evaporação em substratos de vidro BK7. Antes da deposição do Au, 30 nm de Cr foi evaporado a fim de se conferir maior aderência para o filme de Au.

A limpeza dos substratos de quartzo foi realizada a partir da imersão dos mesmos em uma solução de permanganato de potássio (KMnO_4) a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ por 24 horas seguido de lavagem em água ultrapura em abundância. Após a lavagem, os substratos foram imersos em uma solução de H_2O_2 (1:20, v/v) por 2 horas, novamente lavados os com água ultrapura e secos com fluxo de N_2 . O procedimento descrito anteriormente proporciona condições favoráveis de hidrofilição da superfície do quartzo para deposição da primeira monocamada automontada.

Para a limpeza dos substratos condutores, foi utilizada a estratégia proposta por Kim e colaboradores (122) com algumas adaptações. Para tal, os substratos de ITO foram imersos em acetona e agitados em ultra-som por 15 min. Após serem lavados com água ultrapura, os substratos de ITO foram mergulhados em uma solução de HNO_3 : HCl : H_2O (1:3:20) (água régia diluída) por 10 min e em seguida num béquer contendo água ultrapura novamente. O procedimento para limpeza dos substratos de Au foi o mesmo, contudo, o tempo de tratamento em água régia diluída foi de apenas 1 minuto. O procedimento de Kim et. al (122) proporciona a formação de ilhas e um aumento da rugosidade dos substratos, proporcionando uma melhor adesão de filmes poliméricos sobre os mesmos.

4.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO UTILIZADAS

Diversas técnicas de caracterização foram utilizadas nesse trabalho. O crescimento dos filmes automontados foi caracterizado por espectroscopia ultravioleta- visível (UV-Vis). Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier foi utilizada para

confirmar a estrutura dos materiais sintetizados. A morfologia das amostras e dos filmes obtidos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura com ganho de emissão de campo (MEV-FEG) (em parceria com Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira da UFSCAR) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (em parceria com o Prof. Dr. Valmor Mastelaro e seu ex-aluno de doutorado Dr. Waldir Avansi). A Tabela 4.1 resume as técnicas utilizadas para caracterização dos materiais, a análise envolvida e o modelo dos equipamentos.

Tabela 4.1 – Técnicas utilizadas para caracterização dos materiais sintetizados e/ou dos filmes LbL.

Técnica	Equipamento	Análise
Microscopia eletrônica de Varredura com canhão de emissão de campo (MEV-FEG)	Microscópio Zeiss VP Supra 35	Caracterização morfológica dos filmes LbL e da PANI-N
Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	Microscópio JEOL JEM 3010 URP	Tamanho médio e morfologia das nanoestruturas de V_2O_5
Difração de raios-X (XRD)	Difratômetro Rigaku DMax 2500 PC	Caracterização cristalográfica das nanoestruturas de V_2O_5
Espectroscopia eletrônica UV-Vis	Espectrofotômetro Hitachi U-2900	Monitoramento do crescimento dos filmes LbL
Espectroscopia vibracional FTIR	Espectrômetro Nicolet Nexus 470	Caracterização estrutura da polianilina
Perfilometria	Perfilômetro VEECO Dektak 150	Espessura dos filmes LbL

4.7 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL DO DISPOSITIVO SEGFET

No presente trabalho, SEGFETs foram construídos a partir de três dispositivos comerciais distintos, mas que possuem uma alta impedância de entrada: um MOSFET (17, 19), um amplificador operacional (AO) (17, 69) ou ainda um amplificador de instrumentação

(18) (AI). A alta impedância de entrada é um requisito necessário para que o sistema não gere nem drene corrente do pequeno sinal a ser medido.

Após experimentar todas as possíveis configurações de um SEGFET, optou-se por utilizar a configuração baseada no amplificador de instrumentação AD620 por duas razões: evitar o uso de uma fonte adicional de corrente para medidas dinâmicas em um SEGFET à base de MOSFET e, a maior estabilidade operacional desse dispositivo quando comparado como amplificador operacional. Além disso, o dispositivo AD620 requer apenas um resistor externo para ampliar o sinal em até mil vezes, caso fosse necessário. Portanto, sistema de medida (SEGFET) utilizado é constituído de um AI AD620 operando como um seguidor de tensão de altíssima impedância de entrada e de um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) utilizado para manter uma tensão de referência constante. Dessa maneira, a tensão de entrada é igual à tensão de saída no AI.

Apesar de a literatura sugerir que um SEGFET pode ser formado por uma camada sensível conectada a um amplificador operacional (17) ou a um amplificador de instrumentação (18), vale ressaltar que essa configuração pode não ser interpretada como um SEGFET, uma vez que o eletrodo não está conectado diretamente a um MOSFET, mas basicamente a um circuito de leitura que naturalmente contém FETs. Essa configuração é semelhante a um potencial de circuito aberto (OCP, *open circuit potential*). Contudo, baseado na literatura (17-18), optou-se por denominar o dispositivo utilizado no presente trabalho de SEGFET.

O eletrodo de trabalho e camada sensível ao pH foram imersos em diferentes soluções tampão. Medidas da tensão de saída no AI em função do tempo foram realizadas utilizando um multímetro Keithley 195A a fim de determinar a sensibilidade ao pH dos filmes obtidos. A Figura 4.2 ilustra o amplificador AD620 e o multímetro Keithley utilizado. A Figura 4.3 apresenta o esquema utilizado nas medidas do SEGFET e dos biossensores.

Os dados experimentais (tensão de saída do AI) foram coletados automaticamente em função do tempo através do multímetro Keithley comandado por computador via porta USB/GPIB. Para tal finalidade, um programa foi desenvolvido na plataforma LabVIEW 7.1.

Figura 4.2 – Multímetro Keithley 195A (a) utilizado para medir a tensão e amplificador de instrumentação AD620 (b) e seu diagrama de conexão ou pinagem (c).

Figura 4.3 – Esquema ilustrativo do dispositivo SEGKET.

4.7.1 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA DE MEDIDA

Com o intuito de se estabelecer um padrão nas medidas do dispositivo SEGKET, optamos por calibrar o sistema de medida verificando a operação do AI AD620 como seguidor de tensão, bem como a estabilidade operacional do eletrodo de referência de Ag/AgCl ao longo do tempo. A Figura 4.4 mostra como varia a tensão de saída quando se aplica uma tensão no pino de entrada (pino 3) do AD620. Observa-se que nas condições estabelecidas para o sistema, ou seja, sem amplificação do sinal, o AI opera como seguidor de tensão (*buffer*) de ganho unitário. Observa-se ainda, que o erro do sistema está na ordem de 10^{-3} mV, muito pequeno quando comparado com tensões comumente medidas em dispositivos SEGKETs.

Figura 4.4 – Tensão de saída (medida no pino 6) em função da tensão de entrada (aplicada no pino 3) do amplificador de instrumentação AD620.

A Figura 4.5 mostra a variação da tensão do eletrodo de referência comercial R682/A (Analion) em um intervalo longo de tempo medida em relação a um eletrodo de referência de calomelano (Hg/HgCl) construído em nosso laboratório. Os eletrodos foram imersos em uma solução saturada de KCl durante o experimento. Observa-se uma boa estabilidade operacional do sistema de referência utilizado, com um deslocamento (*drift*) de tensão de 0,16 mV quando se considera os valores de máximo e mínimo. Contudo, raramente as medidas excederam 30 min, intervalo de tempo em que o sistema de referência praticamente não apresenta deslocamento de tensão. Considerando que o potencial do eletrodo de Ag/AgCl em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio é +197 mV e do eletrodo de Hg/HgCl é de + 244 mV, a diferença de potencial entre os dois eletrodos de referência está em excelente concordância com a literatura (123).

Figura 4.5 – Tensão medida entre o eletrodo de referência comercial Ag/AgCl R682/A e um eletrodo de calomelano construído em laboratório ao longo do tempo. Para a medida, ambos os eletrodos foram imersos em solução saturada de KCl.

Por fim, testamos o dispositivo através do uso de um filme comercial de ITO (5 mm x 5 mm de área) como camada sensível do SEGFET. Este sistema já foi bastante estudado e apresenta sensibilidade em torno de $57\text{-}59\text{ mV.pH}^{-1}$ quando se usa o AI AD620 como seguidor de tensão (18). A resposta dinâmica ao pH desse filme utilizado como porta estendida é mostrada na Figura 4.6a. Da relação entre tensão em um determinado período de tempo e o valor do pH se obtém uma sensibilidade $58,15\text{ mV.pH}^{-1}$, com um excelente coeficiente de correlação (R^2). Os resultados obtidos estão em excelente concordância com os valores reportados por Yin e colaboradores que utilizaram filmes de ITO provenientes de outra empresa (18).

Vale ressaltar que o sistema de medida era calibrado quando houvesse necessidade, ou seja, era verificado se o filme de ITO apresentava sensibilidade próxima ao valor encontrado. Caso contrário, media-se a estabilidade operacional tanto do AI AD620, quanto do eletrodo de referência.

Figura 4.6 – Resposta típica ao pH de filmes de ITO utilizados como camada sensível (porta estendida) em um dispositivo SEG-FET (a) e sensibilidade dos filmes de ITO (b).

5 SEGFET FUNCIONALIZADO COM (PPID/NiTsPc)

Filmes de ITO comerciais apresentam excelente sensibilidade ao pH (18) e dessa forma, são amplamente utilizados como eletrodos em sensores (70) e biossensores (71, 77). Contudo, os mesmos não apresentam reatividade química, como propriedades de catálise, ou grupos funcionais que proporcionem a imobilização covalente de enzimas diretamente no substrato. Neste sentido, filmes de PPID e NiTsPc foram automontados em substratos de ITO a fim de se obter uma plataforma que não alterasse as propriedades de sensibilidade ao pH do ITO e ao mesmo tempo possuisse grupos funcionais para imobilização de enzimas. Dessa forma, o sistema ITO-(PPID/NiTsPc) foi aplicado como SEGFET sensor de pH e a enzima glicose oxidase (GOx) foi imobilizada na plataforma ITO-(PPID/NiTsPc) a fim de se obter um EnFET para determinação de glicose. Parâmetros relevantes do biossensor como método de imobilização, pH e força iônica foram estudados e otimizados.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES (PPID/NiTsPc)

Depositados em substratos de quartzo, o crescimento dos filmes (PPID/NiTsPc)_n, n representando o número de bicamadas, foi monitorado por espectroscopia UV-Vis a cada camada depositada. A Figura 5.1 mostra o espectro de absorção da solução de NiTsPc juntamente com o espectro da NiTsPc na forma de filme automontado (PPID/NiTsPc)₁₀. Ftalocianinas apresentam bandas de absorção entre 600 nm e 700 nm que são características da banda Q correspondente a transições eletrônicas entre estados π - π^* envolvendo o anel da molécula (124). A banda em torno de 660 nm observada na Figura 5.1 corresponde a espécies monoméricas da NiTsPc e a forte absorção em 623 nm corresponde à espécies diméricas da molécula (124). Observa-se que a banda em 623 nm está deslocada para o azul quando na forma de filme automontado, sugerindo a formação de agregados tipo H (125). Ainda, o

espectro do filme (PPID/NiTsPc)₁₀ sugere que as moléculas de NiTsPc estão em sua maioria na forma de dímeros, uma vez que o ombro em 660 nm não é evidente no espectro do filme LbL. Resultados similares foram encontrados na literatura, nos quais membranas eletroativas nanoestruturadas foram construídas utilizando-se outro tipo de dendrímero (PAMAM) e NiTsPc (70).

Figura 5.1 – Espectros de absorvância da solução aquosa de NiTsPc (azul) e de filmes (PPID/NiTsPc)₁₀ (preto).

A Figura 5.2 mostra como a intensidade da banda de absorvância em 610 nm aumenta com o número de bicamadas para o sistema (PPID/NiTsPc). No encarte da Figura 5.2 é mostrado o espectro de absorvância para diferentes bicamadas. Ao contrário do comportamento linear esperado para a maioria dos filmes automontados (25), observa-se um crescimento exponencial para as primeiras dez bicamadas, passando para o comportamento linear para as camadas posteriores. O resultado sugere que as primeiras etapas de formação dos filmes podem apresentar perturbações devido à interação com o substrato. Por outro lado, moléculas de NiTsPc podem estar interpenetrando nas camadas de PPID, uma vez que dendrímeros são macromoléculas que apresentam alto espaçamento intermolecular ou poros. Efeitos de porosidade podem estar acontecendo à medida que a espessura dos filmes aumenta. Resultados similares foram obtidos por Siqueira Junior et. al. em filmes automontados de dendrímeros PAMAM complexados com nanotubos de carbono e NiTsPc (126). O dendrímero PPID apresenta os mesmos grupos superficiais que o dendrímero PAMAM. Portanto, a forte interação entre os componentes do filme está associada à interação eletrostática entre grupos NH_3^+ do dendrímero e grupos SO_3^- presentes na NiTsPc, semelhante

ao sistema proposto por Siqueira Junior e colaboradores, onde medidas de FTIR confirmaram tal interação (126).

Figura 5.2 – Absorbância em 610 nm em função do número de bicamadas de (PPID/NiTsPc). Encarte: espectro de absorção para diferentes bicamadas de (PPID/NiTsPc).

A espessura dos filmes foi determinada usando-se um perfilômetro, onde um sulco foi feito no filme, criando-se um desnível entre o substrato e o filme automontado. A espessura para diferentes bicamadas é mostrada na Figura 5.3. Verifica-se o mesmo comportamento exponencial observado nas medidas espectroscópicas, corroborando o resultado anterior. Uma avaliação da taxa de crescimento para as primeiras dez bicamadas foi de aproximadamente 2-3 nm/bicamada e de 4-5 nm/bicamada para as camadas restantes. Esta taxa de crescimento é verdadeira, entretanto, os dados de perfilometria não vão a zero quando se extrapola o gráfico da Figura 5.3. Esse fato pode estar relacionado a um erro sistemático nas medidas de perfilometria, em virtude de um erro de calibração do perfilômetro. Ainda, pode ser que o aparelho não consiga avaliar espessuras pequenas. Dos resultados apresentados a seguir referentes a sensores de pH e biossensores, os filmes com espessuras menores que 10 bicamadas apresentam propriedades estruturais suficientes para a preparação de SEGFETS com plataformas de ITO.

Figura 5.3 – Espessura dos filmes (PPID/NiTsPc) em função do número de bicamadas.

5.2 APLICAÇÃO EM SENSORES DE PH

Os filmes automontados (PPID/NiTsPc) geralmente não são estáveis em toda escala de pH. Observa-se uma instabilidade para valores de pH maiores que 10 devido à inversão de carga no dendrímero, acarretando em desorção de material no filme LbL (19). Visando a aplicação desses filmes em biossensores, estamos interessados em mudanças discretas de pH em decorrência de uma reação catalisada por uma enzima. Neste sentido, avaliou-se a sensibilidade ao pH dos filmes (PPID/NiTsPc) em uma escala de 2 a 10, ou seja, evitando valores de pH extremamente básicos.

A Figura 5.4 mostra como varia o sinal de saída do dispositivo SEGFET ITO-(PPID/NiTsPc) ao longo do tempo. A sensibilidade ao pH encontrada para esse sistema é apresentada na Figura 5.5 e a mesma sensibilidade em função do número de bicamadas pode ser vista no encarte da mesma Figura. Observa-se pela Figura 5.5 que a sensibilidade ao pH dos filmes (PPID/NiTsPc) não é afetada de forma significativa com o aumento das bicamadas, situando-se próximo ao valor encontrado para o filme de ITO sem funcionalização. Um ligeiro aumento, tendendo a um comportamento super-Nernstiano, proporcional ao número de bicamadas é observado. Este fato pode estar relacionado à contribuição do dendrímero PPID com sítios de ligação adicionais ao substrato de ITO (material sensível ao pH) devido a fácil

protonação/desprotonação dos grupos amino terminais presentes na periferia da macromolécula.

Figura 5.4 – Resposta dinâmica ao pH dos substratos de ITO funcionalizados com (PPID/NiTsPc)_n.

Figura 5.5 – Sensibilidade dos filmes de ITO funcionalizados com (PPID/NiTsPc)_n. Encarte sensibilidade para diferentes números de bicamadas de (PPID/NiTsPc).

Um sistema alternativo – PAH/NiTsPc – também foi automontado em substratos de ITO e testado como sensor de pH para efeito de comparação como o sistema (PPID/NiTsPc). Observa-se, pela Figura 5.6, que quando se utiliza o PAH, a sensibilidade cai 35% (de 60 mV.pH⁻¹ para 39 mV.pH⁻¹). Este fato está relacionado à estrutura do polication. Apesar de ambos os polímeros PPID e PAH possuírem os mesmos grupos terminais, dendrímeros, são

macromoléculas globulares e porosas, o que facilita a difusão de prótons até a superfície do ITO, diferentemente de polímeros lineares como o PAH, o qual pode estar bloqueando essa difusão. Assim, o sistema ITO-(PPID/NiTsPc) se mostra interessante para aplicação como biossensores, ou seja, com a funcionalização do ITO temos ao mesmo tempo uma superfície sensível a variações de pH e com grupos funcionais adequados para imobilização de enzimas.

Figura 5.6 – Sensibilidade ao pH para o sistema alternativo (PAH/NiTsPc) composto por 5 bicamadas automontadas sobre substratos de ITO.

5.3 APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES DE GLICOSE

Para a aplicação dos filmes (PPD/NiTsPc) como biossensores ou EnFETs de glicose, os filmes foram previamente ativados com a enzima GOx como descrito na subseção 4.4.1. Primeiramente, analisou-se a resposta ao analito com relação à presença e ausência de albumina de soro bovino (BSA) no processo de imobilização enzimática adicionando-se uma alíquota de solução de glicose (0,5 mM) no béquer de medida. A Figura 5.7 mostra como varia a tensão de saída após adição de glicose para o sistema ITO--(PPD/NiTsPc)-GOx com e sem BSA na solução enzimática durante a imobilização. Observa-se que a resposta é potencializada com a adição de BSA. A adição de BSA acelera o processo de entrecruzamento por também conter resíduos de lisina expostos, proporcionando maior eficiência e atividade catalítica para a enzima de interesse se comparado com o entrecruzamento direto com a GOx (121). Logo, a enzima fica fortemente presa ao suporte,

com a maioria dos sítios ativos disponíveis, uma vez que o entrecruzamento ocorre preferencialmente entre o GA e a BSA.

Figura 5.7 – Sinal do biossensor na presença (preto) e na ausência (vermelho) de BSA no processo de imobilização enzimática. Condições experimentais: 0,5 mM de glicose em tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

Realizou-se também o estudo para filmes automontados de (PPID/NiTsPc) com 1, 3 e 5 bicamadas adicionando-se a mesma alíquota de solução de glicose (0,5 mM) no béquer de medida. A Figura 5.8 mostra a variação da tensão (obtida quando se alcançava um patamar de estabilização no sinal) com o número de bicamadas de (PPID/NiTsPc). Observa-se que o melhor resultado se dá para 5 bicamadas, fato que pode ser atribuído a uma maior sensibilidade ao pH apresentada por esse filme quando comparado aos filmes de 1 e 3 bicamadas. Logo, optou-se por utilizar esses filmes nas medidas de biossensoriamento.

Figura 5.8 – Sinal do biossensor em função do número de bicamadas de (PPID/NiTsPc). Condições experimentais: 0,5 mM de glicose em tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

Segui-se analisando os parâmetros relacionados com a resposta do EnFET em questão à glicose. Investigou-se a ação da concentração do tampão fosfato, em um intervalo de 2,5 mM a 30 mM para um filme composto de 5 bicamadas. É esperado alterações de pH mais favoráveis em tampões com baixa força iônica, devido à grande mobilidade de H^+ na solução. Na Figura 5.9 observa-se que o valor ótimo obtido foi de 2.5 mM, uma concentração pequena, como esperado. Porém, visando manter uma maior força iônica da solução, mantivemos as medidas em tampão 10 mM. O circuito do SEGFET se fecha através da solução, portanto, uma força iônica mínima é necessária para seu funcionamento. Ainda, um tampão com baixa força iônica poderia não manter o pH com o valor constante, o que aumentaria o erro nas medidas subsequentes com o aumento da concentração de glicose.

Figura 5.9 – Influência da concentração do tampão na resposta do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)₅-GOx frente a 0,5 mM de glicose.

A atividade enzimática é estritamente dependente de algumas condições, como por exemplo, temperatura e pH. No caso da GOx, o valor de pH ótimo, segundo o fabricante (Sigma Aldrich), é pH 5,5 para a enzima livre à temperatura ambiente. Visando melhorar o ambiente de medida, a resposta do biossensor foi verificada em um intervalo de pH de 5,5 a 8. Observa-se pela Figura 5.10 que o sinal do EnFET varia apenas 10 % no intervalo de pH considerado, alcançando um máximo para valor de pH igual a 7,5. Este comportamento inesperado em comparação com a enzima livre pode ser atribuído à estabilidade do filme automontado (PPID/NiTsPc)₅, tendo em vista que esses filmes são mais estáveis em valores de pH neutro (19). Determinou-se, então, as condições experimentais do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)-GOx como sendo pH 7,5 e tampão fosfato 10 mM, valores que refletem proximidade com as condições fisiológicas.

Figura 5.10 – Influência do pH na para a resposta do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)₅-GOx frente a 0,5 mM de glicose.

Finalmente, a dependência da resposta do biossensor em relação à concentração de glicose, ou curva de analítica, foi realizada com o objetivo de se determinar a escala dinâmica de operação do dispositivo e o limite de detecção (Ld). Define-se Ld através da relação abaixo:

$$Ld = \frac{3.Sb}{m} \quad (5.1)$$

sendo Sb o desvio padrão do branco (sinal sem adição de glicose) obtido a partir de no mínimo 10 medidas e m a inclinação da curva na parte linear (sensibilidade analítica) (127). Observa-se na Figura 5.11 que a escala dinâmica chega até 1 mM com limite de detecção de 0,027 mM na região (de 0,1 a 0,5 mM), determinado de acordo com a literatura (127). O valor do limite de detecção encontrado está condizente com valores comumente encontrados na literatura para biossensores de glicose baseados em transistores de efeito de campo. Luo e colaboradores encontram valores similares de Ld para EnFETs que utilizavam a especificidade adicional de nanopartículas de MnO₂ (0,02 mM) (128) e SiO₂ (0,025 mM) (129). Porém, ambos os dispositivos apresentaram um ampla escala dinâmica, o que é desejável em biossensores.

Figura 5.11 – Curva de analítica do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)₅-GOx medida em tampão fosfato 10mM, pH 7,5.

O maior obstáculo no desenvolvimento de EnFETs de glicose é a limitação do intervalo ou escala dinâmica devido a baixa concentração de oxigênio em amostras reais (sangue humano). Tentativas de resolver este problema foram realizadas através do uso de moléculas orgânicas (130) e inorgânicas (59, 128) que atuam como agente oxidante, ou através da eletrólise direta de H_2O_2 em um eletrodo de platina (61, 131). A quebra do peróxido de hidrogênio produz dois prótons e uma molécula de oxigênio, elevando o sinal e a concentração de O_2 , aumentando assim a escala dinâmica do dispositivo. A literatura relata que NiTsPc pode agir como uma enzima artificial, ou seja, na catálise ou oxi-redução de moléculas H_2O_2 (132-133). Porém, os resultados acima mostram que, ao contrário do esperado, a escala dinâmica do EnFET ainda é pequena, sugerindo que a ação da NiTsPc pode estar sendo limitada. Este fato pode estar relacionado à dificuldade de difusão das moléculas de H_2O_2 através do filme LbL devido ao seu tamanho, de modo que a ação da NiTsPc é inibida, reduzindo assim sua ação catalítica. Por isso, acreditamos que a NiTsPc participada no EnFET proposto apenas como contra-íon para construção do filme LbL. No entanto, o biossensor proposto é capaz de detectar quantidades em amostras reais diluídas como sugerido na literatura para biossensores de glicose que apresentam baixo limite de detecção e uma faixa de operação fora da concentração encontrada em amostras reais (134). Usando tal estratégia, os biossensores ITO-(PPID/NiTsPc)-GOx poderiam ser utilizados clinicamente.

Biossensores geralmente também são avaliados em termos de características associados à sua reprodutibilidade em termos de múltiplos usos e de sua estabilidade

operacional ao longo do tempo. Aqui, o tempo de recuperação é um parâmetro fundamental. A Figura 5.12 apresenta a resposta do EnFET após sucessivas imersões no tampão seguidas de imersões em solução contendo 0,5 mM de glicose. Um tempo de recuperação de aproximadamente 25 min foi observado com nenhuma perda significativa de sinal, indicando que o EnFET pode ser utilizado novamente em pelo menos 3 medidas diferentes.

Figura 5.12 – Tempo de recuperação após sucessivas adições de glicose do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)₅-GOx, medido em tampão PBS 10mM, pH 7,5.

Para estimar a estabilidade temporal, os EnFETs foram estocados no mesmo tampão em que as medidas foram realizadas a 4 °C, de acordo com os estudos previamente realizados. Medidas do sinal do biossensor foram realizadas ao longo de 20 dias. De acordo com a Figura 5.13, observa-se um decréscimo do sinal do EnFET em cerca de 19 % no intervalo de tempo, indicando que o EnFET pode ser estocado por um período de até 20 dias sem perda significativa de sensibilidade.

Figura 5.13 – Estabilidade do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)₅-GOx ao longo do tempo estocado no mesmo tampão da solução de medida (10 mM, pH 7,5) a 4 °C.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

Filmes de ITO foram funcionalizados com multicamadas de PPID e NiTsPc e se mostraram sensíveis às variações de pH mesmo após a funcionalização. Esses filmes foram utilizados como suporte para imobilização da enzima GOx de modo a obter um EnFET para determinação de glicose. A adição de BSA no processo de imobilização potencializa o sinal e não interfere com a atividade da enzima já que apenas poucas moléculas proteicas são envolvidas no processo de imobilização. Ao contrário do esperado, os resultados relativos à catálise de H₂O₂ demonstraram que a NiTsPc age apenas como um contra-íon para a automontagem do filme LbL. Além disso, o uso de dendrímeros como suporte permite uma imobilização enzimática efetiva devido aos grupos funcionais periféricos da macromolécula e uma difusão iônica controlada através das bicamadas. O sistema em questão apresentou sensibilidade a variações de glicose em um intervalo de até 1 mM com limite de detecção de 0,027 mM.

6 SEGFET (PVS/PANI-N)

A polianilina é um polímero amplamente utilizado em sensores devido às suas propriedades morfológicas e elétricas (90, 92). No entanto, o processamento da polianilina na forma de filmes finos pode ser muitas vezes limitado devido à sua baixa solubilidade em água. Neste sentido, sintetizamos a polianilina em uma forma nanoparticulada (PANI-N) a fim de melhorar sua solubilidade e a formação de filmes automontados. Dessa forma, filmes automontados em conjunto com o polímero poli (vinil ácido sulfônico) (PVS) foram fabricados. A PANI-N foi caracterizada através de medidas espectroscópicas e por imagens de MEV-FEG. Automontados em substratos de vidro recoberto com Au , o sistema (PVS/PANI-N) foi empregado como camada sensível ao pH em dispositivos SEGFETs. Finalmente, a enzima urease foi imobilizada nos filmes PVS/PANI-N para construção de um EnFET visando à detecção de uréia.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POLIANILINA

A Figura 6.1 exibe a morfologia do pó da polianilina sintetizada obtida por MEV-FEG. Observa-se que o diâmetro médio das nanopartículas situa-se entre 50-100 nm. A alta razão área/volume, apresentada pela PANI obtida em nanoescala via polimerização interfacial, pode aumentar a sensibilidade de dispositivos quando comparado com materiais sintetizados por polimerização oxidativa comum (98).

Figura 6.1 – Microscopia MEV-FEG do pó de polianilina obtida via polimerização interfacial.

O espectro de absorbância UV-Vis da solução de PANI-N é mostrado na Figura 6.2. A PANI-N sintetizada exibiu uma forte absorção em 740 nm característica da banda polarônica da polianilina no seu estado dopado (135). A banda em 340 nm é atribuída às transições π - π^* dos anéis benzênicos presentes na estrutura do polímero e o ombro em 430 nm está associado à transições ópticas entre estados relacionados à oxidação parcial da PANI (88, 136).

Figura 6.2 – Espectro de absorbância UV-Vis da solução aquosa de PANI-N.

As características estruturais da PANI-N foram confirmadas por espectroscopia FTIR. Todos os picos principais, característicos desse polímero, foram observados no espectro FTIR (136, 137), como mostrado na Figura 6.3. As bandas de absorção em 1562 cm^{-1}

1600 e 1480 cm^{-1} estão relacionadas com a deformação simétrica das ligações C=C dos anéis quinóides e benzenóides, respectivamente. A banda em 1302 cm^{-1} está relacionada com a deformação assimétrica das ligações C-N de aminas aromáticas secundárias e a banda em 1244 cm^{-1} à vibração das ligações C-N. Absorções entre 805 e 450 cm^{-1} são características de anéis benzênicos com substituições. A absorção em 805 cm^{-1} é atribuída ao modo de deformação simétrico C-H fora do plano, e a absorção em 510 cm^{-1} pode ser relacionada à deformações fora do plano do anel benzênico (136, 137).

Figura 6.3 – Espectro FTIR da PANI-N.

6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES (PVS/PANI-N)

Espectroscopia UV-Vis foi utilizada para monitorar o processo de deposição dos filmes multicamadas (PVS/PANI-N) sendo que a banda polarônica (600-900 nm) foi utilizada como parâmetro de crescimento dos filmes LbL. A Figura 6.4 mostra que a banda polarônica da PANI aumenta linearmente como o número de bicamadas (PVS/PANI), indicando que a quantidade de PANI-N adsorvida ao filme é a mesma em cada etapa do processo de deposição. Vale ainda notar que a banda polarônica da PANI-N está deslocada para o vermelho (800 nm) nos filmes LbL quando comparado à PANI em solução (740 nm). Este fato pode estar relacionado à protonação da PANI-N imobilizada, e a ausência da interação entre o polímero e o solvente. A interação entre a PANI-N e o PVS nos filmes LbL pode

ocorrer tanto por interações eletrostáticas quanto por ligações de hidrogênio, já que em pH 5, a polianilina se encontra ligeiramente dopada (138). A espessura de um filme composto por 5 bicamadas de (PVS/PANI-N) filmes foi medida por perfilometria. O valor encontrado foi 70 nm, ou seja, cerca de 14 nm por bicamada depositada.

Figura 6.4 – Intensidade da absorvância em 800 nm da banda polarônica da PAN-N em função do número de bicamadas (PVS/PANI-N). Encarte: Espectro de absorvância para diferentes bicamadas (PVS/PANI-N).

A imagem de microscopia MEV-FEG dos filmes (PVS/N-PANI) composto por 3 bicamadas é mostrada na Figura 6.5. Uma distribuição homogênea de nanopartículas com alguns agregados é observada. Esse resultado pode estar associado ao fato de estruturas menores se difundirem mais facilmente pela solução tendendo assim, a adsorver mais facilmente ao substrato do que as estruturas maiores. A baixa agregação das estruturas maiores podem estar relacionado também ao processo de secagem aplicado na técnica LbL, ou seja, fluxo de N_2 .

Figura 6.5 – Microscopia MEV-FEG dos filmes LbL (PVS-PANI-N)₃.

6.3 APLICAÇÃO EM SENSORES DE pH

O filmes (PVS/PANI-N) foram depositados em substratos de Au e empregados como camadas sensíveis ao pH em dispositivos SEGFETs. É interessante notar que filmes de Au são estáveis, porém não apresentam resposta elétrica ao pH, servindo apenas como plataforma condutora para os filmes LbL (PVS/PANI-N). Durante as medidas, podia-se observar uma coloração azul sobre o filme de ouro, indicando que esses filmes (PVS/PANI-N) podem ser crescidos perfeitamente sobre uma superfície que geralmente é hidrofóbica.

A Figura 6.6 mostra a resposta dinâmica ao pH para o sistema composto por 3 bicamadas de (PVS/PANI-N). A estrutura de degraus indica uma resposta instantânea do detector e a sua estabilidade temporal na faixa de pH com valores entre 2 e 12. Uma sensibilidade em torno de 59 mV.pH^{-1} foi obtida para estes filmes através da variação da resposta do sensor (Figura 6.7). A sensibilidade ao pH para 1, 3 e 5 bicamadas de (PVS/PANI-N) bicamadas é mostrada no encarte da Figura 6.7. A sensibilidade observada para o sistema (PVS/PANI) não muda significativamente como o número de bicamadas e está em concordância com o valor esperado para as materiais sensíveis ao pH ($59,15 \text{ mV.pH}^{-1}$), sugerindo que a superfície de Au está totalmente recoberta com a PANI-N e que esta é suficientemente sensível a variações de pH. Além disso, a adsorção da PANI-N-aumenta a rugosidade da superfície, o que aumenta a área efetiva do eletrodo.

Figura 6.6 – Resposta dinâmica ao pH do sistema $(PVS/PANI-N)_3$.

Figura 6.7 – Sensibilidade ao pH para o sistema $(PVS/PANI-N)$. Encarte: sensibilidade ao pH em função do número de bicamadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ge e colaboradores, em que a PANI comercial foi automontada em conjunto poli(ácido acrílico) (PAA) sobre substratos de ITO (139). Contudo, o sistema proposto por Ge apresentou resposta Nernstiana em uma faixa menor de pH, ou seja, entre pH 3 e 9 (139). Sensores potenciométricos compostos por polianilina e polipirrol (outro tipo de polímero condutor) obtidos via eletropolimerização apresentam sensibilidade de 52 mV.pH^{-1} e 48 mV.pH^{-1} , respectivamente. Entretanto um

desvio de linearidade é observado no primeiro caso (97). Salientamos novamente, que a alta relação área/volume potencializa o desempenho da resposta dinâmica do nosso dispositivo.

A capacidade de recuperação e estabilidade também são características importantes em sensores de pH. Alguns filmes orgânicos e inorgânicos apresentam instabilidade em meios extremamente ácidos ou alcalinos (19, 21). Para avaliar a estabilidade do filme LbL (PVS/PANI-N) a resposta do sensor foi medida para um filme composto por 3 bicamadas, imergindo o mesmo em soluções tampão distintas através do seguinte ciclo de valores de pH: 7, 4, 7, 10 e novamente 7. Como mostrado na Figura. 6.8, o filme (PVS/PANI-N) apresentou um desvio de cerca de 10 mV na resposta medida para pH = 7 no ciclo indicado. O resultado está em boa concordância com aqueles encontrados para filmes inorgânicos utilizados como sensor de pH (18, 140), confirmando a estabilidade do filme na escala de pH estudado. Além disso, a recuperação da resposta do dispositivo com a mudança de pH é praticamente instantânea. Portanto, parece não ocorrer desorção de material no filme LbL, uma vez que o sinal do dispositivo é recuperado para um mesmo valor de pH.

Figura 6.8 – Características de recuperação do filme (PVS/PANI) em um ciclo de soluções tampão.

Outra característica importante em filmes sensíveis ao pH é o desvio na tensão de saída do dispositivo ao longo do tempo. Esse desvio, que é uma característica intrínseca do sistema, é resultado de reações redox na interface filme-solução (141). Filmes convencionais de óxidos de metálicos participam de reações redox devido à sua natureza anfotérica (141). Para avaliar o desvio da resposta do dispositivo, o filme (PVS/PANI-N)₃ foi imerso em uma solução tampão de pH 7 por 60 min (Figura 6.9). Observa-se um pequeno desvio de 2,2 mV e

uma estabilização da tensão por volta de 25 min. Este desvio é muito pequeno em relação às variações do valor da resposta do dispositivo com o pH (ver Figura 6.7).

Figura 6.9 – Desvio no sinal do dispositivo (PVS/PANI-N)₃ ao longo do tempo.

6.4 APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES DE URÉIA

Por dispormos de pouca enzima no período da confecção deste trabalho, optamos em deixar para o futuro o estudo mais aprofundado acerca de parâmetros operacionais do biossensores de uréia como pH, força iônica, tempo de vida, etc. Dessa forma, fixamos um padrão de medida próximo das condições fisiológicas. Assim, a biomembrana (PVS/PANI-N)-urease foi imersa em solução tampão fosfato 10 mM (pH 7,5) e alíquotas de uréia foram adicionados à solução para determinar as características sensoras do EnFET.

A resposta dinâmica típica do EnFET (PVS/PANI-N)-urease frente a diferentes adições de uréia é apresentada na Figura 6.10. A tensão no biossensor cai conforme o esperado e de forma acumulativa. Acreditamos que este comportamento se deve ao acúmulo de cargas na superfície do filme de (PVS/PANI-N), de grande área superficial. O tempo de resposta até a estabilização foi avaliado em aproximadamente 80s após cada adição e se deve à alta impedância do SEGFET contendo um AI de boa qualidade na configuração de seguidor de tensão e que limita o processo de carga do capacitor formado entre a superfície do sensor e a solução. A constante de carga $\tau = RC$ pode ser avaliada se considerarmos $R = 10^{14} \Omega$ como

a impedância de entrada típica do AI e $C \sim \text{pF}$ (capacitância típica da bicamada de contato meta/óxido) como a capacitância da bicamada formada entre superfície e solução, ou seja, $\tau \sim 100 \text{ s}$, que é da mesma ordem do valor encontrado para o tempo de estabilização do biossensor. A estabilidade em termos de razão sinal/ruído se deve a alta constante de tempo τ . Esses resultados estão também em boa concordância com a literatura para biossensores de uréia baseados em ISFETs convencionais compostos de Si_3N_4 como camada sensível (120) e biossensores baseados em SEGFETs de SnO_2 (142). A resposta destes biossensores depende muito mais da carga superficial acumulada na superfície do filme (PVS/PANI-N)-urease do que da difusão de carga através do filme.

Figura 6.11 – Resposta dinâmica típica do EnFET (PVS/PANI-N)-urease frente a diferentes adições de uréia na solução de medida. Condições de medida: tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

A curva analítica correspondente é apresentada na Figura 6.11 e possui um comportamento sigmodal em uma faixa de operação ampla de duas ordens de grandeza para concentração de uréia. Como dito anteriormente, é esperado que o sinal de saída fosse diferente do biossensor de glicose, uma vez que os íons responsáveis pela alteração do pH (sinal) são hidroxilas, o que causa um aumento do valor do pH. A resposta dinâmica do biossensor pode ser alterada para valores menores de τ (resposta mais rápida) se o AI for utilizado como amplificador, pois R agora depende da amplificação utilizada. Nesse caso, pequenas variações da resposta do biossensor para menores concentrações poderão ser detectadas. A única limitação seria nesse caso a razão sinal/ruído.

Figura 6.10 – Curva analítica do EnFET (PVS/PANI-N)-urease. Condições de medida: tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

Nanopartículas de PANI foram preparadas pelo método de polimerização interfacial, o qual permite a fácil manipulação de polímero pela técnica LbL. Filmes automontados de PANI-N foram alternados com PVS, caracterizados e aplicados como filmes sensíveis ao pH em dispositivos SEGfETs. Os filmes (PVS/PANI-N) apresentaram um comportamento Nernstiano na faixa de pH 2-12, com uma sensibilidade em torno 59 mV.pH^{-1} e um pequeno deslocamento na tensão. Visando outras aplicações, a enzima urease foi imobilizada nesses filmes e o sistema aplicado como biossensor de uréia. O EnFET (PVS/PANI-N)-urease se mostrou eficiente na detecção de uréia em uma faixa de operação 0,01 a 10 mM.

7 SEGFET (PPID/TiO₂-NP)

O dióxido de titânio é um óxido metálico bastante interessante para aplicação em sensores de pH devido à sua alta estabilidade química e fácil preparação. Dessa forma, filmes de TiO₂ têm sido sintetizados por diferentes métodos para tal finalidade, como *sputtering* (103), processo sol-gel (42) e deposição química a partir da fase vapor (CVD) (104). Visando uma alternativa as técnicas citadas acima, esta parte do trabalho apresenta a obtenção de filmes LbL constituídos por nanopartículas TiO₂ (TiO₂-Np) e sua aplicação como sensores de pH. O dendrímero poli (propileno imina) (PPID) foi utilizado como contra-íon no processo de automontagem. O crescimento dos filmes foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis e sua morfologia por MEV-FEG. Adicionalmente, a enzima glicose oxidase (GOx) foi imobilizada na plataforma PPID/TiO₂-Np dando origem a um EnFET para determinação de glicose.

7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES (PPID/TiO₂-NP)

A adsorção das bicamadas (PPID/TiO₂-Np) foi monitorada por espectroscopia de absorvância na faixa do UV-Vis. Os espectros de absorvância para números de bicamadas variando de 1 a 5 são mostrados na Figura 7.1a. O deslocamento vertical dos espectros se deve ao espalhamento de luz pelas nanopartículas de TiO₂ e demonstra que estas partículas são incorporadas sobre a superfície de PPID após cada camada nos filmes LbL. Dessa forma, os dados de espalhamento de luz foram utilizados para monitorar o crescimento dos filmes, que neste caso, é proporcional a quantidade de material no substrato que aumenta linearmente com o número de bicamadas, melhor visualizado na Figura 7.1b. Aumentando-se o número de bicamadas, os filmes PPID/TiO₂-Np adquirem um aspecto leitoso o que aumenta o espalhamento de luz. Resultados similares foram obtidos por outros autores utilizando polieletrólitos negativos e condições experimentais diferentes (67, 105).

Figura 7.1 – Espectro de absorvância para diferentes bicamadas de PPID/TiO₂-Np_n (a) e aumento da absorvância em 400 nm (espalhamento de luz) em função do número de bicamadas depositadas (b).

Já para filmes depositados sobre Au, a morfologia superficial dos filmes LbL (PPID/TiO₂-Np) foi analisada por microscopia MEV-FEG. As imagens de MEV-FEG para um filme de 3 bicamadas são apresentadas na Figura 7.2 em diferentes aumentos. As imagens revelam uma superfície com regiões que não estão completamente recobertas com TiO₂ e regiões com grandes agregados de nanopartículas, formando estruturas maiores. Falhas no recobrimento podem ocorrer na superfície do ouro que é altamente hidrofóbica. Um dos agregados de nanopartículas de TiO₂ é mostrado em detalhe na Figura 7.2d. Certa porosidade

fica evidente na imagem, fato que pode auxiliar o processo de imobilização enzimática com as enzimas ocupando os vazios existentes no filme LbL.

Figura 7.2 – Imagens de MEV-FEG em diferentes aumentos de um filme LbL de (PPID/TiO₂-np)₃ depositado sobre substrato de Au.

7.2 APLICAÇÃO EM SENSORES DE pH

Para aplicações em sensores de pH, os filmes (PPID/TiO₂-Np) foram automontados em substratos de Au. Medidas da sensibilidade ao pH foram realizadas mergulhando os filmes (PPID/TiO₂-Np) em diferentes soluções tampão, variando-se o pH de 4 a 10. Novamente, optou-se por evitar valores extremos de pH, uma vez que dendrímeros apresentam diferentes conformações em pHs extremamente ácidos ou extremamente básicos (117).

A Figura 7.3 mostra a resposta dinâmica ao pH dos filmes (PPID/TiO₂-Np) compostos de 3 bicamadas após 3 min de imersão em cada solução tampão. Pode-se observar que a tensão no sensor cai com o aumento do pH o que indica que a diferença de potencial diminui devido ao aumento de carga negativa na superfície das nanopartículas de TiO₂. Um pequeno deslocamento (*drift*) na tensão de saída é observado com o tempo de medida, uma

vez que filmes compostos de óxidos metálicos participam ativamente das reações redox com íons do eletrólito, portanto, essa flutuação é característica do sistema (141).

Figura 7.3 – Resposta típica ao pH dos filme (PPID/TiO₂-np)₃.

Uma sensibilidade de 57 mV.pH⁻¹ foi obtida para este filme no intervalo de pH entre 4 e 10, como pode ser observado na Figura 7.4. A densidade de carga na superfície de TiO₂-Np depende apenas do número inicial de sítios anfóteros, o que provavelmente não muda com o aumento do número de bicamadas. O encarte da Figura 7.4 mostra a sensibilidade ao pH como função do número de bicamadas de (PPID/TiO₂-Np). Dentro do erro experimental, observa-se que a sensibilidade não varia significativamente, mantendo o valor médio de 57 mV.pH⁻¹. Os resultados acima indicam que o funcionamento do sensor não fica prejudicado mesmo para um recobrimento incompleto a superfície do Au, já que este material possui baixa sensibilidade na detecção de íons.

Figura 7.4 – Sensibilidade ao pH para o sistema (PPID/TiO₂). Encarte: sensibilidade ao pH em função do número de bicamadas

Os resultados obtidos para sensores de pH produzidos pela técnica LbL estão em excelente concordância com os resultados da literatura para sensores de pH compostos por TiO₂ preparados por outros métodos (42, 103-104), apresentados em detalhes na Tabela 7.1. Neste contexto, nossa estratégia de automontagem se mostra viável para fabricação de camadas sensíveis ao pH de baixo custo, com potenciais aplicações em biossensores.

Tabela 7.1 – Comparação entre as técnicas LbL e outras técnicas para obtenção de filmes finos sensores de pH constituídos por TiO₂.

Tipo de sensor	Técnica de fabricação	Escala de pH	Sensibilidade (mV/pH ⁻¹)	Referência
SEGFET	LbL	4 -10	57	Este trabalho
ISFET	<i>sputtering</i>	1 - 11	56,21	(103)
SEGFET	sol - gel	1 - 11	58,73	(42)
EIS	MOCVD	3 - 11	57,4 – 62,3	(104)

7.3 APLICAÇÃO EM BIOSENSORES DE GLICOSE

Para aplicação dos filmes (PPID/TiO₂-Np) como EnFETs que detectam glicose, a enzima GOx foi imobilizada como descrito na subsecção 4.4.1, ou seja, entrecruzamento sobre o filme PPID/TiO₂-Np.

A Figura 7.5 exibe a resposta típica do EnFET (PPID/TiO₂-Np-GOx) após a adição de 0,2 mM de glicose no béquer de medida. Sensíveis a alterações locais de pH, os filmes (PPID/TiO₂-Np) são capazes de detectar variações na concentração de íons H⁺ que ocorrem em virtude da reação catalisada pela enzima GOx. Um tempo de resposta de 10 min é observado na Figura 7.5, sendo a variação na tensão neste tempo utilizada como parâmetro para obtenção da curva analítica do biossensor.

Figura 7.5 – Sinal do EnFET (PPID/NiTsPC)-GOx frente adição de 0,2 mM de glicose. Condições de medida: tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

A curva analítica do EnFET é apresentada na Figura 7.6. Uma sensibilidade de 105 mV.mM⁻¹ foi calculada a partir da região linear (0 a 1 mM), com limite de detecção de 0,013 mM, próximos a valores comumente encontrados na literatura (128, 129) e bem próximos daqueles encontrados para os EnFET (PPID/NiTsPC)-GOx, apresentados no **Capítulo 5**.

Figura 5.10 – Curva de analítica do EnFET ITO-(PPID/NiTsPc)₅-GOx, em tampão fosfato 10mM, pH 7,5.

EnFETs para a detecção de glicose geralmente são construídos imobilizando - se a enzima GOx diretamente no óxido metálico. Contudo, uma ativação na superfície no óxido metálico com agentes silanos é necessária, uma vez que originalmente não há grupos reativos para fixação da enzima (59, 61). Dessa forma, a técnica LbL se mostra adequada, para a construção de biossensores, tendo em vista que a última camada pode ser adequadamente escolhida para que tenha grupos funcionais que seja adequados para tal finalidade.

7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

Nesta parte do trabalho, apresentamos a fabricação de filmes LbL compostos por (PPID/TiO₂-Np) como SEGFET sensor de pH e posteriormente como biossensor de glicose. O sistema baseado na adsorção de multicamadas de materiais orgânicos e inorgânicos é viável para a obtenção de sensores a baixo custo. O sistema desenvolvido apresentou uma sensibilidade Nernstiana na faixa de pH 4 a10. Dendrímeros PPID apresentam alta densidade de grupos funcionais NH₃⁺ em sua periferia, o que permite a fácil imobilização da enzima GOx e sua aplicação como biossensor ou EnFET de glicose. Os resultados sugerem que as plataformas híbridas (PPID/TiO₂-Np) são promissoras como biossensores baseados na detecção de pH. O desenvolvimento de plataformas sensíveis ao pH pela técnica LbL,

contendo materiais nanoestruturados podem ser estendida visando o desenvolvimento de biossensores similares, como uréia e colesterol.

8 SEGKET COMPOSTO POR NANOESTRUTURAS 1D DE PENTÓXIDO DE VANÁDIO

Esta parte do trabalho surgiu de uma parceria com o grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos do IFSC através da aplicação de nanoestruturas unidimensionais (1D) de pentóxido de vanádio em SEGKETs sensores de pH. Estes materiais unidimensionais foram preparados via síntese hidrotermal e caracterizados estruturalmente por difração de raios-X, FTIR e microscopia eletrônica de transmissão.

Em uma primeira etapa, amostras apresentando diferentes morfologias (nanofitas, nanofios e nanobastões) foram diretamente depositadas em substratos de vidro recoberto com Au e aplicadas como camada sensível ao pH no dispositivo SEGKET. Em uma segunda etapa, nanobastões $V_2O_5 \cdot nH_2O$ foram automontados em substratos de vidro recoberto com Au pela técnica SA-LbL onde o polímero PAH foi utilizado como contra-íon. Da mesma maneira, os filmes LbL contendo $V_2O_5 \cdot nH_2O$ foram aplicados como sensor de pH. Ainda, a enzima urease foi covalentemente imobilizada na plataforma (PAH/nanobastões) e aplicada como EnFETs para a detecção de uréia.

8.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS

A morfologia das nanoestruturas 1D de $V_2O_5 \cdot nH_2O$ preparadas em diferentes temperaturas foi estudada por microscopia eletrônica de transmissão. As imagens das amostras obtidas a temperaturas de 160°, 180° e 200° são na Figura 8.1. Para as amostras submetidas ao tratamento hidrotermal em 160 °C, a morfologia obtida foi nanofitas (Figura 8.1a) que possuem uma largura de 20 a 30 nm. As amostras submetidas ao tratamento hidrotermal em 180 °C, por sua vez, apresentaram a morfologia de nanofios (Figura 8.1b) com

um diâmetro um pouco menor em comparação as nanofitas (10-20 nm). Por fim, as amostras tratadas hidrotermicamente a 200 °C apresentam a forma de nanobastões (Figura 8.1c) com um diâmetro entre 50 e 60 nm (113, 114).

Figura 8.1 – Imagens TEM das nanoestruturas de $V_2O_5.nH_2O$ obtidas após tratamento hidrotermal a 160 °C (a), 180 °C (b) e 200 °C (c).

Difratogramas de raios-X (DRX) foram coletados para cada amostra de $V_2O_5.nH_2O$, ou seja, amostras obtidas em diferentes temperaturas de síntese hidrotermal, a fim de confirmar o a fase cristalina das mesmas. Os difratogramas são mostrados na Figura 8.2, confirmando a fase cristalina esperada para todas as amostras obtidas: a fase monoclinica para as amostras obtidas a 160 °C e a fase ortorrômbica para as amostras obtidas a 180 °C e 200 °C.

Figura 8.2 – Padrões de difração de Raios-X das nanoestruturas de $V_2O_5.nH_2O$ obtidas sob as seguintes condições hidrotermais: 160°C (a), 180°C (b) e 200°C (c).

8.2 APLICAÇÃO EM SENSORES DE PH

Para aplicações como material sensível ao pH, as nanoestruturas de $V_2O_5.nH_2O$ foram depositadas sobre vidro BK7 recoberto com Au por *spin-coating*. Estas plataformas foram imersas em soluções tampão para pH diferentes (pH 2 a 12) e a resposta do AI foi coletada em função do tempo. A Figura 8.3 apresenta a resposta dinâmica típica alterando-se o pH a cada 3 minutos para plataformas contendo nanobastões de $V_2O_5.nH_2O$. Em virtude da boa resposta ao pH, podemos afirmar que as nanoestruturas se aderiram muito bem ao substrato.

Figura 8.3 – Resposta dinâmica ao pH dos nanobastões de $V_2O_5.nH_2O$ (obtidos a 200 °C)

Figura 8.4 – Sensibilidade ao pH dos nanobastões de $V_2O_5.nH_2O$ depositados diretamente sobre substratos de Au.

Apesar das alterações estruturais devidas as condições da síntese hidrotermal, resultados similares foram observados para as nanoestruturas de $V_2O_5.nH_2O$ sintetizadas a 160 °C (nanofitas com fase monoclínica) e 180 °C (nanofios com fase ortorrômbica). A resposta medida após a adição em novo tampão feita cada 3 min foi utilizada como parâmetro para determinar a sensibilidade ao pH, mostrada na Figura 8.4. Dentro dos limites do erro experimental, a sensibilidade não se altera para nenhuma das formas de $V_2O_5.nH_2O$, indicando que a sensibilidade ao pH não é dependente da fase ou do tipo de nanoestrutura.

Este resultado é melhor observado na Tabela 8.1, que resume a sensibilidade ao pH encontrada para as diferentes nanoestruturas de $V_2O_5 \cdot nH_2O$.

Tabela 8.1 – Sensibilidade ao pH das nanoestruturas de $V_2O_5 \cdot nH_2O$

Estrutura	Temperatura de síntese hidrotermal (°C)	Sensibilidade (mV.pH ⁻¹)	Erro experimental
Nanofitas	160	56	2
Nanofios	180	55	3
Nanobastões	200	57	3

A sensibilidade ao pH das nanoestruturas de $V_2O_5 \cdot nH_2O$ estão em boa concordância com o valor teórico previsto pela equação de Nernst para materiais sensíveis ao pH (59,15 mV.pH⁻¹) e em excelente concordância com outros óxidos metálicos comumente utilizados como membranas sensíveis (17, 23, 41, 43, 143). Guerra e colaboradores utilizaram o pentóxido de vanádio obtido via sol-gel em dispositivos EGFET sensores de pH (21). Esse material apresentou uma sensibilidade em torno de 58 mV.pH⁻¹. Contudo, em condições fortemente alcalinas (pH 12), o mesmo material perde estabilidade, lixiviando-se do substrato (21). Por sua vez, Guidelli et. al. construíram um EGFET baseado em óxidos mistos de pentóxido de vanádio e trióxido de tungstênio (V_2O_5/WO_3) depositados sobre substratos de carbono vítreo. Surpreendentemente, a membrana V_2O_5/WO_3 apresentou uma sensibilidade super-Nernstiana (68 mV.pH⁻¹), ou seja, acima do valor esperado (40).

8.3 FILMES AUTOMONTADOS (PAH/ V_2O_5 -NANOBASTÕES)

Como a sensibilidade ao pH não varia com a morfologia nem como a temperatura de síntese hidrotermal do $V_2O_5 \cdot nH_2O$, os nanobastões foram usados para a fabricação de filmes automontados utilizando o polímero PAH como contra-íon. Dessa forma, o sistema (PAH/ V_2O_5 -nanobastões) foi aplicado como sensor de pH. Posteriormente, a enzima urease

foi imobilizada nessa plataforma e o sistema foi utilizado como EnFET para a determinação de uréia.

O crescimento de cada bicamada de (PAH/ V_2O_5 -nanobastões) foi monitorado por espectroscopia de absorvância UV-Vis. A Figura 8.5 compara os espectros de absorvância de uma solução aquosa diluída contendo nanobastões de $V_2O_5 \cdot nH_2O$ e de um filme automontado composto por 10 bicamadas de (PAH/ V_2O_5 -nanobastões). Primeiramente, pode-se observar que os bastões são grandes o suficiente para não espalhar a luz incidente. Além disso, duas bandas podem ser observadas em torno dos comprimentos de onda de 407 nm e de 257 nm para o $V_2O_5 \cdot nH_2O$ em solução que são associadas às transições de transferência de carga de um elétron proveniente do orbital π do átomo de oxigênio para o nível d do vanádio, considerando a configuração eletrônica do vanádio no seu estado oxidado (144-145). Já no espectro do filme automontado, observa-se um pequeno deslocamento das mesmas bandas para o azul, que pode estar relacionado a efeitos do ambiente do filme automontado, ou seja, interação dos nanobastões com o PAH.

Figura 8.5 – Espectros de absorvância da solução aquosa dos nanobastões de $V_2O_5 \cdot nH_2O$ (preto) e de filmes SA-LbL (PAH/ V_2O_5 -nanobastões)₁₀ (azul).

A Figura 8.6 mostra os espectros de absorvância medidos após a deposição de cada bicamada de (PAH/ V_2O_5 -nanobastões). A dependência linear (encarte da Figura 8.6) da intensidade da absorvância medida em 390 nm mostra que os nanobastões são depositados de forma regular com o número de bicamadas preparadas pela técnica LbL assistida por *spin*, indicando que a cada ciclo de deposição, a quantidade de material depositada é praticamente a

mesma. Este resultado é surpreendente, pois, até onde sabemos, é a primeira vez que nanobastões são depositados de forma regular pela técnica SA-LbL.

Figura 8.6 – Espectros de absorvância para diferentes bicamadas de (PAH/V₂O₅-nanobastões). Encarte: absorvância em 390 nm em função do número de bicamadas (PAH/V₂O₅-nanobastões).

8.3.1 APLICAÇÃO DOS FILMES (PAH/V₂O₅-NANOBASTÕES) EM SENSORES DE PH

Para aplicação dos filmes (PAH/V₂O₅-nanobastões) como camada sensível no dispositivo SEGFET, os mesmos foram automontados sobre substratos de vidro recoberto com Au. A resposta dinâmica típica ao pH dos filmes (PAH/V₂O₅-nanobastões)₃ é apresentada na Figura 8.7 e a sensibilidade ao pH para o mesmo sistema pode ser vista na Figura 8.8. A estabilidade e variação da resposta é praticamente a mesma que aquela observada na Figura 8.3 para nanobastões depositados diretamente sobre Au. Isto indica que estes filmes são impermeáveis à difusão de íons. A sensibilidade em função do número de bicamadas é mostrada no encarte da Figura 8.8. Observa-se, no entanto, que a sensibilidade é máxima para filmes compostos por três bicamadas, um comportamento próximo do valor encontrado para os nanobastões livres, considerando-se o erro experimental.

Figura 8.7 – Resposta dinâmica ao pH dos filmes SA-LbL (PAH/V₂O₅-nanobastões).

Figura 8.8 – Sensibilidade ao pH dos filmes (PAH/V₂O₅-nanobastões)₃. Encarte: Sensibilidade ao pH em função do número de bicamadas.

A alta sensibilidade ao pH apresentada pelos filmes compostos por 3 e 5 bicamadas, aliada ao fato da superfície poder ser facilmente ativada com grupos NH_3^+ provenientes do polícatión PAH, sugere a aplicação dos mesmos em biossensores.

8.3.2 APLICAÇÃO DOS FILMES (PAH/V₂O₅-NE) EM BIOCENSORES DE URÉIA

Escolhemos os filmes (PAH/V₂O₅-nanobastões) compostos por 3 bicamadas para serem aplicados como biossensores de uréia. A estratégia de imobilização de enzima bem como as concentrações de urease, GA e BSA foram as mesmas utilizadas no **Capítulo 6**.

A Figura 8.9 apresenta a resposta típica do biossensor quando sucessivas alíquotas de uréia (em mM) são adicionadas à solução tampão (pH = 7,5 a 10 mM) contendo a porta estendida descrita acima. Observamos um comportamento semelhante, ou seja, um decréscimo e processo de saturação da resposta desse biossensor em torno de 80 s quando comparado com o EnFET composto por (PVS/PANI-N)-urease, descrito no **Capítulo 6**, uma vez que há consumo de prótons na solução em virtude da geração de hidroxilas durante a reação de hidrólise da uréia pela urease. Assim, podemos concluir, que o tempo de resposta não é afetado pelo material sensível ao pH. Este tempo depende do processo de carga (através da porta de alta impedância) da capacitância formada exclusivamente pela dupla camada de carga entre a superfície do nanobastão e a solução eletrolítica.

Figura 8.9 – Resposta dinâmica típica do EnFET (PAH/V₂O₅-nanobastões) urease frente a diferentes adições de uréia na solução de medida. Condições de medida: tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

A curva analítica para o EnFET (PAH/V₂O₅-nanobastões)-urease é mostrada na Figura 8.10. A partir da curva de calibração obtida observa-se que o sensor é ativo em um

grande intervalo de concentração do analito, resultados que se mostram coerentes com trabalhos da literatura (120, 142).

Figura 8.10 – Curva analítica do EnFET (PAH/V₂O₅-nanobastões)-urease. Condições de medida: tampão fosfato 10 mM, pH 7,5.

8.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

O uso da rota hidrotermal para obtenção de nanoestruturas (1D) de V₂O₅.*n*H₂O foi bem sucedida. Como camada sensível em dispositivos SEGFETs, as nanoestruturas 1D V₂O₅.*n*H₂O apresentaram alta sensibilidade ao pH e, independente da temperatura de síntese hidrotermal e da morfologia das amostras obtidas, a sensibilidade não é alterada de forma significativa. A técnica de automontagem assistida por spin foi aplicada com sucesso para construção de filmes (PAH/V₂O₅-nanobastões), os quais também foram aplicados como sensores de pH, apresentando uma considerável sensibilidade. Posteriormente, com a imobilização da enzima urease nos filmes (PAH/V₂O₅-nanobastões), a nova plataforma foi utilizada como biossensor de uréia, o qual apresentou uma ampla faixa de detecção, isto é, de 0,05 a 20 mM.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nesta tese, filmes de materiais orgânicos (dendrímeros e polianilina) e inorgânicos (TiO_2 e V_2O_5) nanoparticulados foram automontados com a finalidade de se obter novas camadas sensíveis ao pH utilizando dispositivos SEGFETs e posteriormente biossensores ou EnFETs para a determinação de hemometabólitos de interesse clínico, particularmente glicose e uréia.

Quatro sistemas foram propostos e implementados como sensores de pH: ITO-(PPID/NiTsPc), Au-(PVS-PANI-N), Au-(PPID/ TiO_2Np) e nanoestruturas (1D) $\text{V}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Este último também automontado por SA-LbL formando o sistema Au-(PAH- V_2O_5 -nanobastões). Parâmetros de crescimento dos LbL filmes foram estudados e melhorados.

Todos os sistemas testados se mostraram promissores como sensores de pH, apresentando sensibilidade próxima do valor Nernstiano, fato atribuído à natureza anfotérica do material da última camada no filme LbL. Portanto, a técnica LbL convencional ou aquela assistida por *spin* se mostrou viável para a obtenção de sensores de pH de forma simples e a baixo custo. Ainda, a técnica permite a aplicação de qualquer tipo de material na última camada, que pode ser ativa para imobilização de enzimas.

Optamos por utilizar polímeros, PPID, PAH e PANI, os quais contêm grupos amina terminais que são ideais para a imobilização covalente de enzimas. Covalentemente imobilizadas nos filmes LbL estudados, as enzimas GOx e urease que geram íons como produto da reação, exibiram uma grande atividade, sugerindo um alto grau de orientação das mesmas imobilizadas. Ainda, a exposição de um maior número de sítios ativos enzimáticos pode ser conseguido com a presença de BSA no processo de imobilização; fato que aumenta a atividade enzimática quando comparada a outros suportes. Dessa forma, os filmes LbL podem ser aplicados tanto com sensores de pH, quanto como biossensores de glicose e uréia apresentando eficiente detecção.

Algumas etapas não menos importantes das que aqui foram apresentadas, necessitam ser estudadas e analisadas cuidadosamente. Tais etapas, se não foram incluídas neste trabalho devido

ao tempo e instrumentação, espera-se que as mesmas sejam estudadas em trabalhos futuros.

Seguem algumas sugestões:

- ✓ O fato das plataformas LbL sensíveis ao pH serem universais abre espaço para futuras aplicações desses filmes em outros tipos de biossensores, tais como biossensores para detecção de triglicérides, colesterol, penicilina, acetilcolina, etc.
- ✓ Um estudo teórico via simulação acerca dos sistemas obtidos a fim de relacionar os parâmetros de crescimento dos filmes e sua aplicação como sensor de pH seria de grande valia para otimização dos sensores.
- ✓ Considerando que um biossensor envolve, além de um eletrodo enzimático também um sistema de aquisição de sinais em tempo real, é proposto a otimização e miniaturização do circuito usado bem como a elaboração de um software para digitalização dos sinais obtidos.
- ✓ Ainda, a alta especificidade de interações antígeno-anticorpo permite que o SEGFET aqui estudado possa ser estendido para o campo de imunossensores. Assim, plataformas imunossensoras podem ser construídas para o diagnóstico de anticorpos específicos de certas doenças.

Finalmente, espera-se que o presente trabalho possa ter despertado a necessidade do desenvolvimento de sensores e biossensores em nosso país a nível industrial, uma vez que sistemas inteligentes para o monitoramento de hemometabólitos ou outras substâncias representam um elevado potencial de crescimento mercadológico. Entretanto, é reconhecido que o caminho a ser percorrido nessa direção ainda é longo!

REFERÊNCIAS

- 1 HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 9, p. 1247-1250, 1991.
- 2 THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.
- 3 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.
- 4 BUERK, D. G. *Biosensors: theory and applications*. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1993.
- 5 DZYADEVYCH, S. V.; ARKHYPOVA, V. N.; SOLDATKIN, A. P.; EL'SKAYA, A. V.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *IRBM*, v. 29, n.2-3, p. 171-180, 2008. DOI: 10.1016/j.rbmret.2007.11.007.
- 6 UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The enzyme electrode. *Nature*, v. 214, n. 5092, p. 986-988, 1967.
- 7 LIGLER, F. S.; TAITT, C. A. R. *Optical biosensors: present and future*. Amsterdam: Elsevier, 2002.
- 8 LEC, R. M. Piezoelectric biosensors: recent advances and applications. In: IEEE International Frequency Control Symposium and PDA Exhibition, 2001, Seatlon. *Proceedings...* Seatlon: IEEE, 2001. p. 419-429.
- 9 BENGTT, D. Calorimetric biosensors. *Journal of Biotechnology*, v. 15, n.3, p. 187-200, 1990.
- 10 ROBERT, K. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, v. 599, n. 1, p. 7-15, 2007.
- 11 YUQING, M.; JIANRONG, C.; KEMING, F. New technology for the detection of pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 63, n. 1, p. 1-9, 2005.

- 12 BERGVELD, P. Development of an ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurements. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. BME-17, n. 1, p. 70-71, 1970.
- 13 BERGVELD, P. Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. BME-19, n.5, p. 342-351, 1972.
- 14 BERGVELD, P. Thirty years of ISFETOLOGY: what happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 88, n. 1, p. 1-20, 2003.
- 15 DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; KORPAN, Y. I.; ARKHYPova, V. N.; EL'SKAYA, A. V.; CHOVELON, J. M.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Biosensors based on enzyme field-effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, n. 3, p. 496-506, 2003.
- 16 VANDERSPIEGEL, J.; LAUKS, I.; CHAN, P.; BABIC, D. The extended gate chemically sensitive field-effect transistor as multi-species microprobe. *Sensors and Actuators*, v. 4, n. 2, p. 291-298, 1983.
- 17 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. *Materials Chemistry and Physics*, v. 63, n. 1, p. 19-23, 2000.
- 18 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. *Materials Chemistry and Physics*, v. 70, n.1, p. 12-16, 2001.
- 19 FERNANDES, E. G. R.; VIEIRA, N. C. S.; DE QUEIROZ, A. A. A.; GUIMARÃES, F. E. G.; ZUCOLOTTTO, V. Immobilization of Poly(propylene imine) dendrimer/nickel phtalocyanine as nanostructured multilayer films to be used as gate membranes for segfet ph sensors. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 14, p. 6478-6483, 2010.
- 20 PAN, C.-W.; CHOU, J.-C.; SUN, T.-P.; HSIUNG, S.-K. Development of the tin oxide pH electrode by the sputtering method. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 108, n. 1-2, p. 863-869, 2005.
- 21 GUERRA, E. M.; SILVA, G. R.; MULATO, M. Extended gate field effect transistor using V2O5 xerogel sensing membrane by sol-gel method. *Solid State Sciences*, v. 11, n. 2, p. 456-460, 2009.
- 22 BATISTA, P. D.; MULATO, M. ZnO extended-gate field-effect transistors as pH sensors. *Applied Physics Letters*, v. 87, n. 14, p. 3, 2005.

- 23 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. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1 - regular papers brief communications & review papers*, v. 45, n. 10A, p. 7999-8004, 2006.
- 24 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 and Actuators B - chemical*, v. 19, n. 1-3, p. 342-347, 1994.
- 25 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- 26 ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 21, n. 6, p. 569-594, 1966.
- 27 AI, H.; JONES, S. A.; LVOV, Y. M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 39, n. 1, p. 23-43, 2003.
- 28 BRINKMAN, W. F.; HAGGAN, D. E.; TROUTMAN, W. W. A history of the invention of the transistor and where it will lead us. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, v. 32, n. 12, p. 1858-1865, 1997.
- 29 SCHÖNING, M. J.; POGHOSSIAN, A. Bio FEDs (Field-Effect devices): state-of-the-art and new directions. *Electroanalysis*, v. 18, n. 19-20, p. 1893-1900, 2006.
- 30 SCHÖNING, M.; ABOUZAR, M.; POGHOSSIAN, A. pH and ion sensitivity of a field-effect EIS (electrolyte-insulator-semiconductor) sensor covered with polyelectrolyte multilayers. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 13, n. 1, p. 115-122, 2009.
- 31 SEDRA, A. S.; SMITH, K. C. *Microeletrônica*. São Paulo: Makron, 2000. 1270 p.
- 32 YATES, D. E.; LEVINE, S.; HEALY, T. W. Site-binding model of electrical double-layer at oxide-water interface. *Journal of the Chemical Society - faraday transactions I*, v. 70, p. 1807-1818, 1974.
- 33 FUNG, C. D.; CHEUNG, P. W.; KO, W. H. A generalized theory of an electrolyte-insulator-semiconductor field-effect transistor. *IEEE Transactions on Electron Devices*, v. 33, n. 1, p. 8-18, 1986.
- 34 ABOUZAR, M. H.; POGHOSSIAN, A.; SIQUEIRA, J. R.; OLIVEIRA, O. N.; MORITZ, W.; SCHÖNING, M. J. Capacitive electrolyte-insulator-semiconductor structures functionalised with a polyelectrolyte/enzyme multilayer: new strategy for enhanced field-effect biosensing. *Physica Status Solidi A*, v. 207, n. 4, p. 884-890, 2010.

- 35 MATSUO, T.; WISE, K. D. An integrated field-effect electrode for biopotential recording. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. BME-21, n. 6, p. 485-487, 1974.
- 36 ABE, H.; ESASHI, M.; MATSUO, T. ISFET's using inorganic gate thin films. *IEEE Transactions on Electron Devices*, v. 26, n. 12, p. 1939-1944, 1979.
- 37 POGHOSSIAN, A.; SCHÖNING, M. J.; SCHROTH, P.; SIMONIS, A.; LÜTH, H. An ISFET-based penicillin sensor with high sensitivity, low detection limit and long lifetime. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 76, n.1-3, p. 519-526, 2001.
- 38 LIAO, H. K.; CHOU, J. C.; CHUNG, W. Y.; SUN, T. P.; HSIUNG, S. K. Study of amorphous tin oxide thin films for ISFET applications. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 50, n. 2, p. 104-109, 1998.
- 39 DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; EL'SKAYA, A. V.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Enzyme biosensors based on ion-selective field-effect transistors. *Analytica Chimica Acta*, v. 568, n. 1-2, p. 248-258, 2006.
- 40 GUIDELLI, E. J.; GUERRA, E. M.; MULATO, M. Ion sensing properties of vanadium/tungsten mixed oxides. *Materials Chemistry and Physics*, v. 125, n. 3, p. 833-837, 2011.
- 41 BATISTA, P.; MULATO, M. Polycrystalline fluorine-doped tin oxide as sensing thin film in EGFET pH sensor. *Journal of Materials Science*, v. 45, n. 20, p. 5478-5481, 2010.
- 42 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. *Materials Chemistry and Physics*, v. 114, n. 2-3, p. 542-548, 2009.
- 43 LIAO, Y. H.; CHOU, J. C. Fabrication and characterization of a ruthenium nitride membrane for electrochemical pH sensors. *Sensors*, v. 9, n. 4, p. 2478-2490, 2009.
- 44 HSU, J. F.; HUANG, B. R.; HUANG, C. S.; CHEN, H. L. Silicon nanowires as pH sensor. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1 - regular papers brief communications & review papers*, v. 44, n. 4B, p. 2626-2629, 2005.
- 45 CHIN, Y. L.; CHOU, J. C.; LEI, Z. C.; SUN, T. P.; CHUNG, W. Y.; HSIUNG, S. K. Titanium nitride membrane application to extended gate field effect transistor pH sensor using VLSI technology. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1 - regular papers short notes & review papers*, v. 40, n. 11, p. 6311-6315, 2001.
- 46 XU, J. J.; LUO, X. L.; CHEN, H. Y. Analytical aspects of FET-based biosensors. *Frontiers in Bioscience*, v. 10, p. 420-430, 2005.

- 47 JANATA, J.; MOSS, S. D. Chemically sensitive field effect transistors. *Bio-Medical Engineering*, v. 11, n. 7, p. 241-245, 1976.
- 48 CARAS, S.; JANATA, J. Field effect transistor sensitive to penicillin. *Analytical Chemistry*, v. 52, n. 12, p. 1935-1937, 1980.
- 49 CARAS, S. D.; PETELENZ, D.; JANATA, J. pH-based enzyme potentiometric sensors. part 2. glucose-sensitive field effect transistor. *Analytical Chemistry*, v. 57, n. 9, p. 1920-1923, 1985.
- 50 MIYAHARA, Y.; MORIIZUMI, T.; ICHIMURA, K. Integrated enzyme fets for simultaneous detections of urea and glucose. *Sensors and Actuators*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 1985.
- 51 SOLDATKIN, A. P.; MONTORIOL, J.; SANT, W.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Development of potentiometric creatinine-sensitive biosensor based on ISFET and creatinine deiminase immobilised in PVA/SbQ photopolymeric membrane. *Materials Science and Engineering C*, v. 21, n. 1-2, p. 75-79, 2002.
- 52 CHI, L.-L.; YIN, L.-T.; CHOU, J.-C.; CHUNG, W.-Y.; SUN, T.-P.; HSIUNG, K.-P.; HSIUNG, S.-K. Study on separative structure of EnFET to detect acetylcholine. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 71, n. 1-2, p. 68-72, 2000.
- 53 DZYADEVYCH, S. V.; MAI ANH, T.; SOLDATKIN, A. P.; DUC CHIEN, N.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; CHOVELON, J. M. Development of enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for detection of phenolic compounds. *Bioelectrochemistry*, v. 55, n. 1-2, p. 79-81, 2002.
- 54 DUMSCHAT, C.; MUELLER, H.; STEIN, K.; SCHWEDT, G. Pesticide-sensitive ISFET based on enzyme inhibition. *Analytica Chimica Acta*, v. 252, n. 1-2, p. 7-9, 1991.
- 55 SCHÖNING, M. J.; POGHOSSIAN, A. Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs). *Analyst*, v. 127, n. 9, p. 1137-1151, 2002.
- 56 VIEIRA, N. C. S. *Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de In₂O₃:Sn*. 2006. 121 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.
- 57 BONNET, C.; ANDREESCU, S.; MARTY, J.-L. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Analytica Chimica Acta*, v. 481, n. 2, p. 209-211, 2003.

- 58 SIQUEIRA JR, J. R.; ABOUZAR, M. H.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JR, O. N.; SCHÖNING, M. J. Penicillin biosensor based on a capacitive field-effect structure functionalized with a dendrimer/carbon nanotube multilayer. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2009.
- 59 YIN, L. T.; CHOU, J. C.; CHUNG, W. Y.; SUN, T. P.; HSIUNG, K. P.; HSIUNG, S. K. Glucose ENFET doped with MnO₂ powder. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 76, n. 1-3, p. 187-192, 2001.
- 60 KHARITONOV, A. B.; ZAYATS, M.; LICHTENSTEIN, A.; KATZ, E.; WILLNER, I. Enzyme monolayer-functionalized field-effect transistors for biosensor applications. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 70, n.1-3, p. 222-231, 2000.
- 61 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 and Actuators B - chemical*, v. 83, n. 1-3, p. 90-97, 2002.
- 62 FREEMAN, R.; ELBAZ, J.; GILL, R.; ZAYATS, M.; WILLNER, I. Analysis of dopamine and tyrosinase activity on ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) devices. *Chemistry*, v. 13, n. 26, p. 7288-7293, 2007.
- 63 FREEMAN, R.; GILL, R.; WILLNER, I. Following a protein kinase activity using a field-effect transistor device. *Chemical Communications*, n.33, p. 3450-3452, 2007.
- 64 DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, v. 210-211, part 2, p. 831-835, 1992.
- 65 LVOV, Y.; HAAS, H.; DECHER, G.; MOEHWALD, H.; KALACHEV, A. Assembly of polyelectrolyte molecular films onto plasma-treated glass. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 97, n. 49, p. 12835-12841, 1993.
- 66 LVOV, Y.; DECHER, G.; MOEHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir*, v. 9, n. 2, p. 481-486, 1993.
- 67 SASAKI, T.; EBINA, Y.; TANAKA, T.; HARADA, M.; WATANABE, M.; DECHER, G. Layer-by-Layer assembly of titania nanosheet/polycation composite films. *Chemistry of Materials*, v. 13, n. 12, p. 4661-4667, 2001.
- 68 SCHULZE, K.; KIRSTEIN, S. Layer-by-layer deposition of TiO₂ nanoparticles. *Applied Surface Science*, v. 246, n. 4, p. 415-419, 2005.

- 69 VIEIRA, N. C. S.; FERNANDES, E. G. R.; FACETO, A. D.; ZUCOLOTTO V.; GUIMARÃES, F. E. G. Nanostructured polyaniline thin films as pH sensing membranes in FET-based devices. *Sensors and Actuators B - chemical*. 2011. In press.
- 70 SIQUEIRA, J. R.; CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O. N. Bifunctional electroactive nanostructured membranes. *Electrochemistry Communications*, v. 9, n. 11, p. 2676-2680, 2007.
- 71 FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA, O. N.; DE TORRESI, S. I. C. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 19, n. 12, p. 1611-1615, 2004.
- 72 DECHER, G.; LEHR, B.; LOWACK, K.; LVOV, Y.; SCHMITT, J. New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 9, n. 9-10, p. 677-684, 1994.
- 73 LOJOU, E.; BIANCO, P. Quartz crystal microbalance and voltammetry monitoring for layer-by-layer assembly of cytochrome c3 and poly(ester sulfonic acid) films on gold and silver electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 557, p. 37-47, 2003.
- 74 CHO, J.; CHAR, K.; HONG, J. D.; LEE, K. B. Fabrication of highly ordered multilayer films using a spin self-assembly method. *Advanced Materials*, v. 13, n. 14, p. 1076-1078, 2001.
- 75 CHIARELLI, P. A.; JOHAL, M. S.; CASSON, J. L.; ROBERTS, J. B.; ROBINSON, J. M.; WANG, H. L. Controlled fabrication of polyelectrolyte multilayer thin films using spin-assembly. *Advanced Materials*, v. 13, n. 15, p. 1167-1171, 2001.
- 76 LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I.; KUNITAKE, T. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, n. 22, p. 6117-6123, 1995.
- 77 CRESPILO, F. N.; GHICA, M. E.; GOUVEIA-CARIDADE, C.; OLIVEIRA JR, O. N.; BRETT, C. M. A. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): optimised architectures for biosensing. *Talanta*, v. 76, n. 4, p. 922-928, 2008.
- 78 CUI, T. H.; HUA, F.; LVOV, Y. FET fabricated by layer-by-layer nanoassembly. *IEEE Transactions on Electron Devices*, v. 51, n. 3, p. 503-506, 2004.
- 79 CUI, T. H.; LIU, Y.; ZHU, M. Field-effect transistors with layer-by-layer self-assembled nanoparticle thin films as channel and gate dielectric. *Applied Physics Letters*, v. 87, n. 18, 2005. DOI:10.1063/1.2123390.

- 80 LIU, Y.; ERDMAN, A. G.; CUI, T. Acetylcholine biosensors based on layer-by-layer self-assembled polymer/nanoparticle ion-sensitive field-effect transistors. *Sensors and Actuators A - physical*, v. 136, n. 2, p. 540-545, 2007.
- 81 XUE, W.; LIU, Y.; CUI, T. H. High-mobility transistors based on nanoassembled carbon nanotube semiconducting layer and SiO₂ nanoparticle dielectric layer. *Applied Physics Letters*, v. 89, n. 16, 2006. DOI: 10.1063/1.2361278.
- 82 XUE, W.; CUI, T. A thin-film transistor based acetylcholine sensor using self-assembled carbon nanotubes and SiO₂ nanoparticles. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 134, n. 2, p. 981-987, 2008.
- 83 SIQUEIRA, J. R.; BÄCKER, M.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O. N.; SCHÖNING, M. J. Associating biosensing properties with the morphological structure of multilayers containing carbon nanotubes on field-effect devices. *Physica Status Solidi A*, v. 207, n. 4, p. 781-786, 2010.
- 84 SIQUEIRA, J. R.; ABOUZAR, M. H.; BACKER, M.; ZUCOLOTTO, V.; POGHOSSIAN, A.; OLIVEIRA, O. N.; SCHÖNING, M. J. Carbon nanotubes in nanostructured films: potential application as amperometric and potentiometric field-effect (bio-)chemical sensors. *Physica Status Solidi A - applications and materials science*, v. 206, n. 3, p. 462-467, 2009.
- 85 GRANQVIST, C. G.; HULTÅKER, A. Transparent and conducting ITO films: new developments and applications. *Thin Solid Films*, v. 411, n. 1, p. 1-5, 2002.
- 86 FANG, A. P.; NG, H.; SU, X. D.; LI, S. F. Y. Soft-lithography-mediated submicrometer patterning of self-assembled monolayer of hemoglobin on ITO surfaces. *Langmuir*, v. 16, n. 12, p. 5221-5226, 2000.
- 87 FANG, A.; NG, H.; LI, S. F. Y. Anchoring of Self-assembled hemoglobin molecules on bare indium-tin oxide surfaces. *Langmuir*, v. 17, n. 14, p. 4360-4366, 2001.
- 88 DE ALBUQUERQUE, J. E.; MATTOSO, L. H. C.; FARIA, R. M.; MASTERS, J. G.; MACDIARMID, A. G. Study of the interconversion of polyaniline oxidation states by optical absorption spectroscopy. *Synthetic Metals*, v. 146, n. 1, p. 1-10, 2004.
- 89 BHADRA, S.; KHASTGIR, D.; SINGHA, N. K.; LEE, J. H. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science*, v. 34, n. 8, p. 783-810, 2009.
- 90 JANG, J.; HA, J.; CHO, J. Fabrication of water-dispersible polyaniline-poly(4-styrenesulfonate) nanoparticles for inkjet-printed chemical-sensor applications. *Advanced Materials*, v. 19, n. 13, p. 1772-1775, 2007.

- 91 LEE, H. M.; LEE, T. W.; PARK, O. O.; ZYUNG, T. Polymer light-emitting diode prepared with an ionomer and polyaniline. *Advanced Materials for Optics and Electronics*, v. 10, n. 1, p. 17-23, 2000.
- 92 BOROLE, D. D.; KAPADI, U. R.; MAHULIKAR, P. P.; HUNDIWALE, D. G. Glucose oxidase electrodes of polyaniline, poly(o-toluidine) and their copolymer as a biosensor: a comparative study. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 15, n. 6, p. 306-312, 2004.
- 93 FERNANDES, E. G. R. *Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose*. 2005. 155p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2005.
- 94 TIMUR, S.; PAZARLIOGLU, N.; PILLOTON, R.; TELEFONCU, A. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 97, n. 1, p. 132-136, 2004.
- 95 TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, n. 8, p. 1530-1543, 2008.
- 96 RIUL, A.; GALLARDO SOTO, A. M.; MELLO, S. V.; BONE, S.; TAYLOR, D. M.; MATTOSO, L. H. C. An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline. *Synthetic Metals*, v. 132, n. 2, p. 109-116, 2003.
- 97 LAKARD, B.; HERLEM, G.; LAKARD, S.; GUYETANT, R.; FAHYS, B. Potentiometric pH sensors based on electrodeposited polymers. *Polymer*, v. 46, n. 26, p. 12233-12239, 2005.
- 98 HUANG, J.; VIRJI, S.; WEILLER, B. H.; KANER, R. B. Polyaniline nanofibers: facile synthesis and chemical sensors. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 2, p. 314-315, 2002.
- 99 RETHI, M.; PONRATHNAM, S.; RAJAN, C. R. Facile synthesis of processable conductive water solubilized polyaniline. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 19, n. 2, p. 119-122, 1998.
- 100 HUANG, J.; KANER, R. B. A General Chemical Route to Polyaniline Nanofibers. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, n. 3, p. 851-855, 2003.
- 101 SAMSONOV, G. V. *The Oxide handbook*. 2nd ed. New York: IFI/Plenum, 1982. 463 p.
- 102 CHEN, X.; MAO, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *ChemInform*, v. 38, n. 41, p. no-no, 2007.
- 103 CHOU, J.-C.; LIAO, L. P. Study on pH at the point of zero charge of TiO₂ pH ion-sensitive field effect transistor made by the sputtering method. *Thin Solid Films*, v. 476, n. 1, p. 157-161, 2005.

- 104 SHIN, P.-K. The pH-sensing and light-induced drift properties of titanium dioxide thin films deposited by MOCVD. *Applied Surface Science*, v. 214, n. 1-4, p. 214-221, 2003.
- 105 WANG, Z.-S.; SASAKI, T.; MURAMATSU, M.; EBINA, Y.; TANAKA, T.; WANG; WATANABE, M. Self-assembled multilayers of titania nanoparticles and nanosheets with polyelectrolytes. *Chemistry of Materials*, v. 15, n. 3, p. 807-812, 2003.
- 106 KOMMIREDDY, D. S.; SRIRAM, S. M.; LVOV, Y. M.; MILLS, D. K. Stem cell attachment to layer-by-layer assembled TiO₂ nanoparticle thin films. *Biomaterials*, v. 27, n. 24, p. 4296-4303, 2006.
- 107 SAKAI, N.; PRASAD, G. K.; EBINA, Y.; TAKADA, K.; SASAKI, T. Layer-by-layer assembled TiO₂ nanoparticle/PEDOT-PSS composite films for switching of electric conductivity in response to ultraviolet and visible light. *Chemistry of Materials*, v. 18, n. 16, p. 3596-3598, 2006.
- 108 KARUNAKARAN, C.; SENTHILVELAN, S. Vanadia-catalyzed solar photooxidation of aniline. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 289, n. 2, p. 466-471, 2005.
- 109 WANG, Z.; CHEN, J.; HU, X. Electrochromic properties of aqueous sol-gel derived vanadium oxide films with different thickness. *Thin Solid Films*, v. 375, n. 1-2, p. 238-241, 2000.
- 110 WANG, Y.; CAO, G. Developments in nanostructured cathode materials for high-performance lithium-ion batteries. *Advanced Materials*, v. 20, n. 12, p. 2251-2269, 2008.
- 111 LIU, J.; WANG, X.; PENG, Q.; LI, Y. Vanadium pentoxide nanobelts: highly selective and stable ethanol sensor Materials *Advanced Materials*, v. 17, n. 6, p. 764-767, 2005.
- 112 WANG, X.; LI, Y. D. Solution-based synthetic strategies for 1-D nanostructures. *Inorganic Chemistry*, v. 45, n.19, p. 7522-7534, 2006.
- 113 AVANSI JUNIOR, W.; RIBEIRO, C.; LEITE, E. R.; MASTELARO, V. R. Vanadium Pentoxide Nanostructures: An Effective Control of Morphology and Crystal Structure in Hydrothermal Conditions. *Crystal Growth & Design*, v. 9, n. 8, p. 3626-3631, 2009.
- 114 AVANSI JUNIOR, W. *Síntese de nanopartículas de óxido de vanádio obtidas pela decomposição de peróxido*. 2010. 153 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 115 ONI, J.; DIAB, N.; REITER, S.; SCHUHMANN, W. Metallophthalocyanine-modified glassy carbon electrodes: effects of film formation conditions on electrocatalytic activity towards the oxidation of nitric oxide. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 105, n. 2, p. 208-213, 2005.

- 116 PRASAD, R.; GUPTA, V. K.; KUMAR, A. Metallo-tetraazaporphyrin based anion sensors: regulation of sensor characteristics through central metal ion coordination. *Analytica Chimica Acta*, v. 508, n. 1, p. 61-70, 2004.
- 117 BOAS, U.; CHRISTENSEN, J. B.; HEEGAARD, P. M. H. Dendrimers: design, synthesis and chemical properties. *Journal of Materials Chemistry*, v. 16, n. 38, p. 3785-3798, 2006.
- 118 CRESPILO, F. N.; EMILIA GHICA, M.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; BRETT, C. M. A. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochemistry Communications*, v. 8, n. 10, p. 1665-1670, 2006.
- 119 LEHNINGER, A. L.; LEE, N. D.; COX, M. M.; SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.
- 120 PIJANOWSKA, D. G.; TORBICZ, W. pH-ISFET based urea biosensor. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 44, n. 1-3, p. 370-376, 1997.
- 121 CRESPILO, F. N. *Membranas eletroativas nanoestruturadas: estudo do transporte de carga e imobilização enzimática*. 2007. 130 p. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- 122 KIM, J. S.; GRANSTROM, M.; FRIEND, R. H.; JOHANSSON, N.; SALANECK, W. R.; DAIK, R.; FEAST, W. J.; CACIALLI, F. Indium-tin oxide treatments for single- and double-layer polymeric light-emitting diodes: the relation between the anode physical, chemical, and morphological properties and the device performance. *Journal of Applied Physics*, v. 84, n. 12, p. 6859-6870, 1998.
- 123 PAVLISHCHUK, V. V.; ADDISON, A. W. Conversion constants for redox potentials measured versus different reference electrodes in acetonitrile solutions at 25°C. *Inorganica Chimica Acta*, v. 298, n. 1, p. 97-102, 2000.
- 124 BOMMER, J. C.; SPIKES, J. D. *Phthalocyanines: properties and applications*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1989. 448 p.
- 125 SIQUEIRA, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; CRESPILO, F. N.; CARVALHO, A. J. F.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA, O. N. Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 45, p. 22690-22694, 2006.
- 126 SIQUEIRA, J. J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; OLIVEIRA, J. O. N.; ZUCOLOTTI, V. Processing of electroactive nanostructured films incorporating carbon nanotubes and phthalocyanines for sensing. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 24, p. 9050-9055, 2008.

- 127 CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta*, v. 391, n. 2, p. 127-134, 1999.
- 128 LUO, X.-L.; XU, J.-J.; ZHAO, W.; CHEN, H.-Y. A novel glucose ENFET based on the special reactivity of MnO₂ nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, n. 10, p. 1295-1300, 2004.
- 129 LUO, X.-L.; XU, J.-J.; ZHAO, W.; CHEN, H.-Y. Glucose biosensor based on ENFET doped with SiO₂ nanoparticles. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 97, n. 2-3, p. 249-255, 2004.
- 130 SHUL'GA, A. A.; KOUDELKA-HEP, M.; DE ROOIJ, N. F.; NETCHIPOROUK, L. I. Glucose-sensitive enzyme field effect transistor using potassium ferricyanide as an oxidizing substrate. *Analytical Chemistry*, v. 66, n. 2, p. 205-210, 1994.
- 131 SEO, H.-I.; KIM, C.-S.; SOHN, B.-K.; YEOW, T.; SON, M.-T.; HASKARD, M. ISFET glucose sensor based on a new principle using the electrolysis of hydrogen peroxide. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 40, n. 1, p. 1-5, 1997.
- 132 ALENCAR, W. S.; CRESPILO, F. N.; MARTINS, M. V. A.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA, J. O. N.; SILVA, W. C. Synergistic interaction between gold nanoparticles and nickel phthalocyanine in layer-by-layer (LbL) films: evidence of constitutional dynamic chemistry (CDC). *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 11, n. 25, p. 5086-5091, 2009.
- 133 BOHRER, F. I.; COLESNIUC, C. N.; PARK, J.; SCHULLER, I. K.; KUMMEL, A. C.; TROGLER, W. C. Selective detection of vapor phase hydrogen peroxide with phthalocyanine chemiresistors. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 12, p. 3712-3713, 2008.
- 134 WEI, Y.; LI, Y.; LIU, X.; XIAN, Y.; SHI, G.; JIN, L. ZnO nanorods/Au hybrid nanocomposites for glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 1, p. 275-278, 2010.
- 135 HEEGER, A. J. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials†. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 105, n. 36, p. 8475-8491, 2001.
- 136 LASKA, J.; WIDLARZ, J. Spectroscopic and structural characterization of low molecular weight fractions of polyaniline. *Polymer*, v. 46, n. 5, p. 1485-1495, 2005.
- 137 DMITRIEVA, E.; HARIMA, Y.; DUNSCH, L. Influence of phenazine structure on polaron formation in polyaniline: in situ electron spin resonance-ultraviolet/visible-near-infrared spectroelectrochemical study. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, n. 50, p. 16131-16141, 2009.

- 138 BRAGA, G. S.; PATERNO, L. G.; LIMA, J. P. H.; FONSECA, F. J.; DE ANDRADE, A. M. Influence of the deposition parameters on the morphology and electrical conductivity of PANI/PSS self-assembled films. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, n. 4, p. 555-562, 2008.
- 139 GE, C.; ARMSTRONG, N. R.; SAAVEDRA, S. S. pH-sensing properties of poly(aniline) ultrathin films self-assembled on indium-tin oxide. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 4, p. 1401-1410, 2007.
- 140 CHIANG, J. L.; CHOU, J. C.; CHEN, Y. C.; LIAU, G. S.; CHENG, C. C. Drift and hysteresis effects on AlN/SiO₂ gate pH ion-sensitive field-effect transistor. *Japanese Journal of Applied Physics Part 1 - regular papers short notes & review papers*, v. 42, n. 8, p. 4973-4977, 2003.
- 141 HENDRIKSE, J.; OLTHUIS, W.; BERGVELD, P. A method of reducing oxygen induced drift in iridium oxide pH sensors. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 53, n. 1-2, p. 97-103, 1998.
- 142 CHEN, J. C.; CHOU, J. C.; SUN, T. P.; HSIUNG, S. K. Portable urea biosensor based on the extended-gate field effect transistor. *Sensors and Actuators B - chemical*, v. 91, n. 1-3, p. 180-186, 2003.
- 142 BUNIATYAN, V. V.; ABOUZAR, M. H.; MARTIROSYAN, N. W.; SCHUBERT, J.; GEVORGIAN, S.; SCHÖNING, M. J.; POGHOSSIAN, A. pH-sensitive properties of barium strontium titanate (BST) thin films prepared by pulsed laser deposition technique. *Physica Status Solidi A - applications and materials science*, v. 207, n.4, p. 824-830.
- 143 SELBIN, J. The chemistry of oxovanadium(IV). *Chemical Reviews*, v. 65, n. 2, p. 153-175, 1965.
- 144 IWAMOTO, M.; FURUKAWA, H.; MATSUKAMI, K.; TAKENAKA, T.; KAGAWA, S. Diffuse reflectance infrared and photoluminescence spectra of surface vanadyl groups. Direct evidence for change of bond strength and electronic structure of metal-oxygen bond upon supporting oxide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, n. 11, p. 3719-3720, 1983.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

A.1 – Artigos publicados em revistas indexadas

1 FERNANDES, E. G. R.; VIEIRA, N. C. S.; DE QUEIROZ, A. A. A.; GUIMARÃES, F. E. G.; ZUCOLOTTO, V. Immobilization of poly(propylene imine) dendrimer/nickel phtalocyanine as nanostructured multilayer films to be used as gate membranes for segfet ph sensors. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 114, n. 14, p. 6478-6483, 2010.

2 VIEIRA, N. C. S.; FIGUEIREDO, A.; DE QUEIROZ, A. A. A.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Self-Assembled Films of Dendrimers and Metallophthalocyanines as FET-based glucose biosensors. *Sensors*, v. 11, n. 10, p. 9442-9449, 2011.

3 VIEIRA, N. C. S.; FERNANDES, E. G. R.; FACETO, A. D.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Nanostructured polyaniline thin films as pH sensing membranes in FET-based devices. *Sensors and Actuators B - chemical*. In press.

A.2 – Artigos submetidos

1 VIEIRA, N. C. S.; FIGUEIREDO, A.; FACETO, A. D.; DE QUEIROZ, A. A. A.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F. E. G. Dendrimers/TiO₂ nanoparticles layer-by-layer films as extended gate FET for pH and glucose sensing. *Sensors and Actuators B - chemical*. Submitted.

2 VIEIRA, N. C. S.; AVANSI, W.; FIGUEIREDO, A.; RIBEIRO, C.; MASTELARO, V. R.; GUIMARÃES, F. E. G. Ion sensing properties of 1D vanadium pentoxide nanostructures. *Nanoscale Research Letters*. Submitted.

3 VIEIRA, N. C. S.; AVANSI, W.; FIGUEIREDO, A.; RIBEIRO, C.; MASTELARO, V. R.; GUIMARÃES, F. E. G. Hydrothermal sodium-doped vanadium pentoxide nanorods as separative extended gate FET pH sensors. *Materials Science and Engineering B - advanced functional solid-state materials*. Submitted

4 ARRUDA, I. G.; VIEIRA, N. C. S.; PEREIRA, R.; TEREZO, A. J.; GUIMARÃES, F. E. G.; RAMOS, R. J. Layer by layer films of SiO₂ nanoparticles as SEG-FET pH sensors. *Sensors*. Submitted.

A.3 – Patentes

1 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Física de São Carlos. Edson Giuliani Fernandes; Assuero Garcia; Nirton Cristi Silva Vieira; Francisco E.G Guimarães; Ana Paula U Araújo; Valtencir Zucolotto. *Biossensor*, seu uso e método para detecção de íons cálcio. INPI: 018110024344.

2 UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBA. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz; Alexandre Carlos Brandão Ramos; Alessandra Nogueira Santos; Demétrio Artur Werner Soares; Edson Giuliani Ramos Fernandes; José Renato Garcia Braga; Nirton Cristi Silva Vieira. *Dispositivo biossensor integrado com rede neural artificial para a monitoração simultânea de hemometabólitos*. INPI: 0000221008168038.

3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Instituto de Física de São Carlos. Izabela Gutierrez de Arruda; Nirton Cristi Silva Vieira; Francisco E. G Guimarães; Romildo Jeronimo. *Eletrodos modificados com nanopartículas de dióxido de silício e acetilcolinesterase para a detecção potenciométrica do pesticida metamidofós*. em andamento.