

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

JOSÉ ROBERTO SIQUEIRA JUNIOR

**Filmes automontados de nanotubos de
carbono aplicados em sensores**

São Carlos
2009

JOSÉ ROBERTO SIQUEIRA JUNIOR

Filmes automontados de nanotubos de carbono aplicados em sensores

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências e Engenharia de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação dos Materiais.
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior

São Carlos
2009

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 IFSC/USP

Siqueira Junior, José Roberto

Filmes automontados de nanotubos de carbono aplicados em sensores/ José Roberto Siqueira Junior; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior.--São Carlos, 2009.

113 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo

1. Filmes automontados. 2. Nanotubos de carbono. 3. Sensores. 4. Dispositivos de efeito de campo. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

José Roberto Siqueira Junior

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovado em: 23/02/2010

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Bianchi

Instituição: UFOP

Assinatura



Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff

Instituição: UNESP

Assinatura



Prof. Dr. Luis Vicente de Andrade Scalvi

Instituição: UNESP

Assinatura



Prof. Dr. Fernando Josepetti Fonseca

Instituição: EP/USP

Assinatura



Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



Dedicatória

*Dedico esta tese aos meus pais
José Roberto e Cleusa e à minha
namorada Jeniffer*

Agradecimentos

Às pessoas que são importantes e que contribuíram para a realização deste trabalho, quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

- À minha família, em especial aos meus pais José Roberto e Cleusa e ao meu irmão Paulo por serem meu “ pilar ” e estarem sempre me apoiando e incentivando.
- À Jeniffer pelo amor, carinho, paciência e compreensão demonstrada e por não ter desistido de mim durante minha viagem à Alemanha!
- Ao amigo e orientador, Prof. Osvaldo Novais de Oliveira Jr., por ter me guiado na vida científica e acadêmica com seus ensinamentos. Através de seu apoio e confiança estou realizando um sonho e espero um dia retribuir à altura, muito obrigado!
- Ao amigo e companheiro Prof. Valtencir Zucolotto, pela amizade, apoio e confiança. Sua ajuda e ensinamento foram fundamentais para realização desse trabalho, obrigado!
- Ao amigo Prof. Michael J. Schöning, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa na Fachhochschule Aachen em Jülich, para realização do meu estágio de doutorado na Alemanha. Agradeço a confiança, o apoio e a amizade depositada no “ Brazilian guy ”! Tenho certeza que os ensinamentos adquiridos em seu laboratório serão importantes em minha carreira... Vielen Danke!
- Aos amigos e professores do Grupo de Polímeros: Ângelo, Felipe, Thiers, Shikão, Marcos, Thatyane, Rafaela, Vanessa, Níbio, Bertho, Ademir, Rosângela, Simone, Débora, Prof. Paulo B. Miranda, Prof. Roberto M. Faria, Profa. Débora Gonçalves, entre outros pelo companheirismo e apoio.

- Aos amigos parceiros e colaboradores Prof. Arshak Pogossian, Prof. Luciano Caseli, Prof. Frank N. Crepilho, Profa. Maria C. F. de Oliveira e Prof. Fernando V. Paulovich, expresso toda minha gratidão pelos excelentes trabalhos realizados em conjunto.
- Aos meus amigos de Jülich: Matthias, Maryam, Stefan, Monika, David, Heiko, Frederick, Steffen e Patrick, expresso os meus mais profundos agradecimentos por tudo o que fizeram por mim enquanto estive na Alemanha. Danke Schön!
- Aos meus grandes amigos Luli, Angelo e Felipe, obrigado pelo companheirismo, apoio, convivência e altas horas de discussões.
- A todos os amigos e parentes que sempre me apoiaram, mas nunca entenderam nada do faço e estudo, meus sinceros agradecimentos.
- Ao IFSC, Fachhochschule Aachen e Forschungszentrum Jülich, pelas facilidades e infra-estruturas oferecidas.
- Ao Serviço de Pós-Graduação do IFSC e à Biblioteca, pela competência e prontidão nos serviços prestados a mim quando necessitei.
- Por fim, agradeço à CAPES pelas bolsas concedidas de doutorado e estágio de doutorado no exterior.

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”

JOHN QUINCY ADAMS

Resumo

SIQUEIRA JUNIOR, J. R. **Filmes automontados de nanotubos de carbono aplicados em sensores**. 2009. 113 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Nanotubos de carbono (CNTs) têm se mostrado versáteis para melhorar propriedades de outros materiais. A integração de CNTs com materiais biológicos, por exemplo, permite obter biossensores com propriedades e sensibilidade otimizadas. Com a manipulação de CNTs em filmes nanoestruturados, pode-se formar nanocompósitos híbridos, cuja interação sinérgica requer métodos experimentais com controle da arquitetura molecular. Neste estudo, utilizamos a técnica de automontagem para obter dois tipos de sensores incorporando CNTs. No primeiro, filmes automontados de CNTs de parede múltiplas (MWNTs) dispersos em poliamidoamina (PAMAM) e alternados com ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc) foram usados como sensores amperométricos para detectar o neurotransmissor dopamina. As propriedades eletroquímicas obtidas com voltametria cíclica indicaram que a incorporação de MWNTs no filme PAMAM-NT/NiTsPc eleva a corrente de pico redox em três vezes e diminui em 50 mV o potencial de oxidação da dopamina. Isso permitiu detectar dopamina na presença de um interferente típico, o ácido ascórbico. Os sensores apresentaram limite de detecção de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e alta estabilidade. No segundo, filmes nanoestruturados de PAMAM com nanotubos de carbono de parede única (SWNTs), funcionalizados com grupos carboxílicos, foram fabricados sobre dispositivos de efeito de campo do tipo *electrolyte-insulator-semiconductor (EIS)* e *light-addressable potentiometric sensors (LAPS)*. Estes dispositivos modificados foram usados em biossensores de penicilina G, após imobilização da enzima penicilinase. A morfologia do filme PAMAM/SWNT era típica de uma estrutura porosa, com grande área superficial, apropriada para adsorção da enzima e facilitar a penetração de íons H^+ no filme. Esses biossensores exibiram alta sensibilidade ao pH de 55-58 mV/pH e propriedades melhoradas para a detecção de penicilina G, com sensibilidade de 100 mV/década e melhor desempenho com menor tempo de resposta e sinal mais estável.

Palavras-chave: Filmes automontados. Nanotubos de carbono. Sensores. Dispositivos de efeito de campo.

Abstract

SIQUEIRA JUNIOR, J.R. **Layer-by-Layer assembly of carbon nanotubes applied in sensing**. 2009. 113 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Carbon nanotubes (CNTs) are versatile in enhancing the properties of other materials. They can be integrated with biological materials, for instance, in the fabrication of biosensors with optimized sensitivity and performance. With manipulation of CNTs in nanostructured films, one may form hybrid nanocomposites whose synergistic interaction requires experimental methods with control of molecular architecture. In this study, we used the layer-by-layer (LbL) technique to obtain two types of sensors incorporating CNTs. In the first, LbL films of multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) dispersed in polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and alternated with nickel phthalocyanine (NiTsPc) layers were used in the amperometric detection of the neurotransmitter dopamine. The electrochemical properties obtained with cyclic voltammetry indicated that the incorporation of MWNTs in the PAMAM-NiTsPc led to a 3-fold increase in the peak current, in addition to a decrease of 50 mV in the oxidation potential of dopamine. The latter permitted the detection of dopamine even in the presence of a typical interferent, the ascorbic acid. These sensors exhibited a limit of detection of ca. $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$ and high stability. In the second type, LbL films of PAMAM and single-walled carbon nanotubes (SWNTs), functionalized with carboxylic groups, were deposited on field-effect devices, using electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) and light-addressable potentiometric sensors (LAPS). These modified devices were employed as biosensors to detect penicillin G, after immobilizing the enzyme penicillinase. The PAMAM/SWNT film exhibited a highly porous morphology with large surface area, being suitable for enzyme adsorption, in addition to facilitating the penetration of H^+ ions through the film. Such biosensors had a high pH sensitivity of ca. 55-58 mV/pH and improved properties toward penicillin G, with sensitivity of 100 mV/decade and enhanced performance, with faster response time and higher stability.

Keywords: Layer-by-Layer films. Carbon nanotubes. Sensors. Field-effect devices.

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Procedimento esquemático da fabricação de um filme automontado.....	26
Figura 3.1 – Diagrama esquemático de como uma folha de grafite é enrolado para formar um nanotubo de carbono.	31
Figura 3.2 – Três diferentes tipos de estruturas de SWNTs que são obtidas pelo par (n,m)	31
Figura 3.3 – Estrutura eletrônica dos nanotubos (a) armchair (metálico) e (b) ziguezague (semicondutor).	32
Figura 3.4 – Diferentes formatos de MWNTs: (a) <i>coaxial cylindrically curved</i> , (b) <i>coaxial polygonized</i> ou (c) <i>scrolls graphene sheets</i>	33
Figura 3.5 – Representação esquemática da preparação de nanotubos de carbono utilizando a técnica de descarga por arco elétrico.	34
Figura 3.6 – Representação esquemática da preparação de nanotubos de carbono com a técnica de laser pulsado.	35
Figura 3.7. Representação esquemática da síntese de nanotubos de carbono com a técnica de deposição química a vapor (CVD).	36
Figura 3.8 – Representação de diferentes tipos de sensores baseados em CNTs.	38
Figura 4.1 – Princípio de detecção de um ISFET, EIS e LAPS, respectivamente, e a correspondente mudança do sinal gerado. (V_{\sim} : tensão ac, $V_{=}$: dc tensão, V_{DS} : tensão fonte-dreno, I_d : corrente de dreno, WE: eletrodo de trabalho, RE: eletrodo de referência).	44
Figura 4.2 – Estrutura do capacitor MIS. V_G : tensão do porta.	45
Figura 4.3 – Curva teórica C/V de uma estrutura MIS tipo p medida em baixa e alta frequência. Φ_S : potencial de superfície do semicondutor, Φ_B : diferença de potencial entre o nível de Fermi no <i>bulk</i> do semicondutor, C_i : capacitância do isolante, C_{FB} : capacitância da <i>flat-band</i> ; C_{LF} : capacitância mínima em baixa frequência, C_{HF} : capacitância V_T : limiar da tensão.	46
Figura 4.4 – Distribuição de carga e diagrama de banda de energia da estrutura MIS nos modos (a) acumulação, (b) depleção e (c) inversão, respectivamente. M: metal, I: isolante, S: semicondutor, Q_M : carga sobre a porta metálica, Q_h : carga dos buracos acumulados, Q_d : carga na região de depleção, Q_e : carga de elétrons na região de inversão, w_d : largura da região de depleção e w_m : largura máxima da região de depleção. Os símbolos (+) na interface semicondutor-isolante representam os buracos acumulados, enquanto os (-) representam os elétrons.	47
Figura 4.5 – Representação esquemática do sistema de medida do sensor capacitivo EIS.	49

- Figura 4.6** – Representação esquemática das curvas de caracterização (a) C/V e (b) ConCap de um sensor EIS (tipo p) medidas em diferentes pHs e a (c) curva de calibração que define a sensibilidade ao pH deste sensor.....50
- Figura 4.7** – Representação ilustrativa do modelo de *site-binding* na interface isolante-eletrólito, em que os grupos MOH permanecem neutros ou tornam-se positivos (MOH_2^+) ou negativos (MO^-) de acordo com o valor do pH do eletrólito. pH_{pzc} : valor do pH no ponto de carga nula.51
- Figura 4.8** – (a) Representação esquemática do setup experimental do sistema LAPS e seu (b) circuito equivalente. Z: impedância do sistema, incluindo do eletrodo de referência, C_i : capacitância do isolante, C_{SC} : capacitância da região de carga espacial, I_{ph} : fotocorrente, I_p : componente alternado de fotogeração dos pares elétron-buraco.....53
- Figura 4.9** – (a) Curvas I/V e (b) resposta CC típicas de um sensor LAPS (tipo p) em testes de sensibilidade ao pH, usando soluções de diferentes valores.55
- Figura 5.1** – Representações esquemáticas das arquiteturas dos filmes automontado (a) PAMAM-NT/NiTsPc e (b) PAMAM/SWNT, além das estruturas químicas dos materiais utilizados.....57
- Figura 5.2** – Célula eletroquímica usada nas caracterizações do (a) sensor capacitivo EIS e do (b) sensor LAPS.....61
- Figura 6.1** – Espectros eletrônicos da solução aquosa de NiTsPc e dos filmes de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc contendo 10 bicamadas. Encarte: Crescimento exponencial até a 10ª bicamada dos filmes PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc.63
- Figura 6.2** – Imagens de AFM dos filmes de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc contendo diferentes números de bicamadas. Note a diferença na escala do eixo Z dos filmes contendo MWNT.....64
- Figura 6.3** – Espectros de FTIR no modo transmissão de filmes cast de (I) PAMAM, (II) PAMAM-NT, (III) NiTsPc e dos filmes automontados contendo 15 bicamadas de (IV) PAMAM/NiTsPc e (V) PAMAM-NT/NiTsPc.....66
- Figura 6.4** – Espectros de Raman obtidos com laser de 633 nm para (I) CNT em pó, (II) filme cast de PAMAM-NT, (III) NiTsPc em pó e (IV) filme automontado contendo 10 bicamadas de PAMAM-NT/ PSS + 1 bicamada de PAMAM-NT/NiTsPc.67
- Figura 6.5** – Voltamogramas cíclicos dos filmes com 3 bicamadas de (a) PAMAM/NiTsPc e (b) PAMAM-NT/NiTsPc em diferentes velocidades de varredura. Encartes: Relação linear entre as correntes de pico anódica e catódica com a velocidade de varredura.....68
- Figure 6.6** – Voltamogramas cíclicos dos filmes com 3 bicamadas de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Note a diferença nas correntes de pico do filme contendo CNTs.....69

Figura 6.7 – Voltamogramas cíclicos dos filmes contendo 3 bicamadas de (a) PAMAM/NiTsPc e (b) PAMAM-NT/NiTsPc em diferentes concentrações de DA. Encartes: Curva de calibração. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	70
Figura 6.8 – Voltamograma cíclico da detecção simultânea de DA e AA na mesma proporção (0,24 mmol L ⁻¹) para o filme PAMAM-NT/NiTsPc contendo 3 bicamadas. Velocidade de varredura: 50 mV s ⁻¹	71
Figura 6.9 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento fatorial na detecção de dopamina usando o filme automontado PAMAM-NT/NiTsPc.	73
Figura 7.1 – Curvas C/V (a) do sensor EIS (p-Si-SiO ₂ -Ta ₂ O ₅) funcionalizado com multicamadas de PAMAM/SWNT obtidas em solução tampão pH 7 e ampliação (b) da área de depleção com ponto de trabalho em 30 nF. Encarte: valores do deslocamento de potencial das curvas C/V em função do número de camadas adsorvidas de PAMAM e SWNT. Frequência: 50 Hz.....	75
Figura 7.2 – Imagens de (a) FESEM e AFM dos sensores EIS funcionalizados com filmes automontados com 5 bicamadas de (b) PAMAM/SWNT e (c) PAMAM/PSS.	78
Figura 7.3 – Representação esquemática do princípio de operação do biossensor de penicilina EIS funcionalizado com filme PAMAM/SWNT.	79
Figura 7.4 – Curvas C/V (a) e resposta Concap (b) em diferentes valores de pH para um sensor capacitivo EIS funcionalizado com 5 bicamadas de PAMAM/SWNT. Frequência: 50 Hz.	80
Figura 7.5 – Curvas C/V em diferentes concentrações de penicilina para o sensor EIS-NT. Frequência: 50 Hz.	80
Figura 7.6 – Resposta ConCap para diferentes concentrações de penicilina para os sensores (a) EIS puro, (b) EIS-PE e (c) EIS-NT e suas (d) curvas de calibração. Encartes: Amplificação da região contendo sinais de resposta para baixas concentrações de penicilina.....	82
Figura 7.7 – Imagens de FESEM (mesma ampliação de 10.000 vezes) e AFM (de cima e 3D) dos biossensores (a) EIS e (b) EIS-NT, contendo a enzima penicilinase imobilizada	84
Figura 8.1 – (a) Curvas I/V de um dispositivo LAPS funcionalizado com multicamadas de PAMAM/SWNT usando solução tampão em pH, (b) ampliação da região de depleção em 1,0 μA e (c) deslocamento de potencial obtido das curvas I/V em função do número de camadas adsorvidas de PAMAM e SWNT.....	86
Figura 8.2 – Imagens de FESEM do filme automontado PAMAM/SWNT com 6 bicamadas em (a) de cima e (b) secção transversal.	88
Figure 8.3 – Imagens de AFM do filme automontado PAMAM/SWNT com diferentes números de bicamadas.....	89

Figura 8.4 – (a) Curvas I/V e (b) resposta CC do sensor LAPS-NT em testes de sensibilidade ao pH, usando soluções de diferentes valores.....	90
Figura 8.5 – Representação esquemática do princípio de operação de uma estrutura LAPS modificado com filme automontado PAMAM/SWNT + enzima e aplicado como biossensor de penicilina.	91
Figura 8.6 – (a) Medidas de corrente constante (CC) para diferentes concentrações de penicilina G os sensores LAPS e LAPS-NT e suas respectivas (b) curvas de calibração e sensibilidades.	92
Figura 8.7 – Medidas de corrente constante (CC) do biossensor LAPS-NT-penicilinase na detecção de diferentes amostras para sensores cobertos com enzima (em vermelho) e não cobertos (em azul).....	93
Figura 8.8 – Visualização de IDMAP para amostras de distintas unidades de sensor com e sem filme automontado de PAMAM/SWNT + enzima.....	95
Figura 8.9 – Visualização de IDMAP para amostras distintas de tampão, glicose e penicilina usadas nos experimentos de detecção dos sensores (a) LAPS-NT e (b) LAPS.....	96
Figura 8.10 – Visualização de IDMAP de três distintos sensores LAPS utilizados na detecção de penicilina.....	97

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Relação do par (n,m) com o tipo de SWCNT e seu ângulo quiral.	32
Tabela 4.1 – Tipos de sensores eletroquímicos baseados no modo de medida.	42
Tabela 4.2 – Tipos de sensores utilizando sensores de efeito de campo.	43
Tabela 5.1 – Técnicas para caracterizar os filmes automontados.....	59
Tabela 6.1 – Espessura e rugosidade dos filmes automontados.	65
Tabela 6.2 – Potencial de detecção (pico anódico) da DA e do AA usando os eletrodos PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc LbL.	71
Tabela 8.1 – Rugosidade e espessura de filmes automontados PAMAM/SWNT com diferentes bicamadas.....	89

Lista de Abreviações e Siglas

AA	Ácido ascórbico
AFM	Microscopia de força atômica
CC	Fotocorrente constante
CHEMFET	Chemical field-effect transistor
CNT	Nanotubos de carbono
ConCap	Capacitância constante
C/V	Capacitância-voltagem
DA	Neurotransmissor dopamina
EIS	Electrolyte-insulator-semiconductor
EIS-PE	EIS modificado com filme LbL de PAMAM/PSS
EIS-NT	EIS modificado com filme LbL de PAMAM/SWNT
EnFET	Enzymatic field-effect transistor
FED	Field-effect device – Dispositivo de efeito de campo
FESEM	Microscopia eletrônica de varredura
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
IDMAP	Interactive Document Map
IGFET	Insulated-gate field-effect transistor
IR-LED	Diodos emissores de luz infravermelha
IS	Espectroscopia de impedância
ISE	Ion selective electrode
ISFET	Ion-sensitive field-effect transistor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
I/V	Fotocorrente-voltagem
LAPS	Light-addressable potentiometric sensor
LAPS-NT	LAPS modificado com filme LbL de PAMAM/SWNT
LbL	Layer-by-layer
MIS	Metal-insulator-semiconductor capacitance
MWNT	Multi-walled carbon nanotubes
NiTsPc	Metalofalocianina tetrassulfonada de níquel
NTFET	Nanotube-based field-effect transistor
PAMAM	Dendrímero poliamidoamina
PAMAM-NT	Complexo de MWNT disperso em solução de PAMAM
PEN	Enzima penicilinase
PEX	Técnicas de projeção multi-dimensional
PSS	Poliestireno sulfonado
SWNT	Single-walled carbon nanotubes
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta visível

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	25
Capítulo 2 – Objetivos	29
Capítulo 3 – Nanotubos de carbono	30
3.1 – Introdução	30
3.2 – Síntese de nanotubos de carbono	33
3.2.1 – Descarga por arco elétrico	33
3.2.2 – Laser pulsado	34
3.2.3 – Deposição química a vapor (CVD)	35
3.3 – Aplicação em sensores e biossensores	36
Capítulo 4 – Sensores baseados em dispositivos de efeito de campo	40
4.1 – Introdução	40
4.2 – Sensores eletroquímicos	41
4.3 – Dispositivos de efeito de campo	42
4.4 – Princípio de operação do FED	44
4.4.1 – Capacitor MIS	45
4.4.2 – Sensor capacitivo EIS	49
4.4.3 – Dispositivo LAPS	53
Capítulo 5 – Materiais e métodos experimentais	56
5.1 – Materiais e soluções usados na fabricação dos filmes automontados	56
5.2 – Fabricação dos filmes automontados	57
5.3 – Materiais e soluções para os experimentos de detecção	58
5.4 – Técnicas de caracterização	58
5.5 – Fabricação e caracterização dos sensores EIS e LAPS	59
Capítulo 6 – Filmes nanoestruturados e eletroativos de nanotubos de carbono e ftalocianinas aplicados em sensores de dopamina	62
6.1 – Caracterização espectroscópica e microscópica dos filmes	62

6.2 – Caracterização eletroquímica dos filmes automontados.....	67
6.3 – Propriedades eletrocatalíticas dos filmes automontados na detecção de dopamina (DA).....	69
Capítulo 7 – Dispositivos de efeito de campo funcionalizados com filme automontado de nanotubos de carbono.....	74
7.1 – Caracterização elétrica dos filmes	74
7.2 – Caracterização microscópica dos filmes	77
7.3 – Biossensor de penicilina	78
Capítulo 8 – Filme automontado de nanotubos de carbono incorporados em light-addressable potentiometric sensors.....	85
8.1 – Monitorando a adsorção das multicamadas usando LAPS.....	85
8.2 – Morfologia do filme PAMAM/SWNT no chip LAPS.....	87
8.3 – Sensibilidade ao pH e detecção de penicilina usando LAPS modificados	90
8.4 – Empregando métodos de visualização para eliminar o fenômeno de cross talk dos sensores LAPS-NT	94
Capítulo 9 – Conclusões	98
Capítulo 10 – Propostas para trabalhos futuros	100
Referências.....	101
Apêndice A – Publicações originadas no período de doutoramento.....	110
Apêndice B – Técnicas de projeção de dados	112

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A pesquisa em biossensores é multidisciplinar com vastas possibilidades de aplicações, principalmente se diferentes tecnologias e materiais forem integrados (1-4). Neste contexto, a manipulação de nanocompósitos híbridos com controle no nível molecular, e o entendimento das interações entre os seus componentes, são relevantes para desenvolver materiais e novos biossensores (5-8). A fabricação desses nanocompósitos requer técnicas de manipulação para acoplar em dispositivos com fácil processamento. Uma maneira eficiente é processar os materiais em filmes multicamadas, fabricados por automontagem (9-13) (*layer-by-layer, LbL*). Este método permite que vários materiais (orgânicos, inorgânicos e biológicos) possam ser combinados em camadas com espessura nanométrica em diferentes arquiteturas. É um método de baixo custo, viabilizando a produção de filmes finos com controle estrutural. Pode-se obter uma estrutura de camadas ultrafinas que interagem através de ligações não-covalentes, em que o filme pode apresentar propriedades não verificáveis em filmes mais espessos dos mesmos constituintes (9-13).

O uso de filmes nanoestruturados em sensores trouxe novas possibilidades, por duas razões principais: Primeiro, a sensibilidade pode aumentar consideravelmente quando filmes ultrafinos são empregados. Além disso, as técnicas de fabricação de filmes nanoestruturados permitem controle da arquitetura no nível molecular (9-14). A automontagem, por exemplo, oferece fino controle e possibilidade de ajuste de propriedades e da arquitetura em nanoescala (9-14). Esta técnica é a mais simples para preparar nanoestruturas e se baseia na deposição alternada de espécies catiônicas e aniônicas, conforme ilustrado na Figura 1. Este processo pode ser repetido diversas vezes, formando multicamadas sobre substratos sólidos. As principais vantagens dos filmes automontados são a alta sensibilidade e tempo de resposta mais rápido do que sensores com filmes espessos (9,12,14). Outras vantagens são:

- i) Possibilidade de combinar materiais para unidades sensoriais específicas;

- ii) Controle da arquitetura molecular que permite explorar o contato íntimo entre os componentes do sensor;
- iii) Pequena quantidade de material é necessária para produção dos filmes.

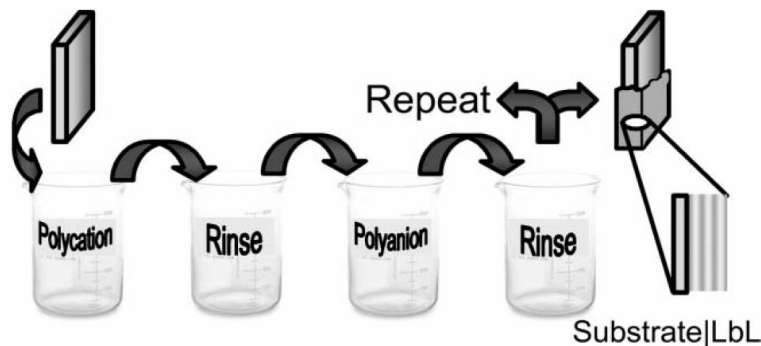


Figura 1.1 – Procedimento esquemático da fabricação de um filme automontado (12).

Filmes nanoestruturados são adequados para biossensores, até porque a automontagem permite imobilização de proteínas e outras moléculas de interesse biológico, com preservação da atividade, devido provavelmente a duas razões principais: A possibilidade de engenharia molecular que permite seleção de materiais com formatos apropriados para imobilização, e as condições em meio aquoso em que são produzidos os filmes automontados. No que tange à sensibilidade, os biossensores podem alcançar níveis extremamente altos, pois se baseiam predominantemente em interações específicas (14). Lvov et al. foram pioneiros em biossensores de filmes automontados com proteínas ou biomoléculas (15). Desde então, muitos biomateriais têm sido empregados como elementos de sensor, incluindo proteínas (16), par antígeno-anticorpo (17), enzimas (18) e DNA (19).

Com o desenvolvimento da nanobioeletrônica, a integração de biomoléculas (ex., proteínas e anticorpos) com nanomateriais em dispositivos elétricos trouxe uma nova geração de biossensores, especialmente devido à compatibilidade do tamanho, onde as partes dos componentes dos circuitos eletrônicos são comparáveis às entidades biológicas. Dentre os principais nanomateriais estudados para esse fim, os nanotubos de carbono (CNTs) e nanopartículas metálicas têm sido usados com moléculas biológicas em dispositivos para nanobiotecnologia (5-8,20-24). Além de biossensores, esses sistemas podem ser aplicados em liberação controlada de fármacos, marcadores biológicos e diagnósticos (20). Para desenvolver esses dispositivos, no entanto, é imprescindível tanto o entendimento dos mecanismos de

interação entre as biomoléculas imobilizadas e esse nanomaterial, quanto o controle dos métodos de manipulação para imobilização. A interação entre os materiais é, em muitos casos, facilitada pela compatibilidade de tamanhos, e pode ocorrer de maneira sinérgica, fazendo com que propriedades melhoradas ou totalmente novas sejam obtidas a partir da escolha e processamento adequado dos materiais. Neste caso, uma maneira eficiente de se combinar nanotubos de carbono e biomoléculas é através de seu processamento em filmes multicamadas, onde alto controle sobre espessura e arquitetura dos filmes pode ser obtido durante o processamento. Dessa maneira, tanto os CNTs como moléculas biológicas podem ser imobilizados, resultando em estruturas com diferentes arquiteturas e preservação da atividade biológica, além da facilidade de manipulação (5-8).

Neste trabalho, a técnica de automontagem foi usada para fabricar dois sistemas nanoestruturados contendo nanotubos de carbono, sendo um aplicado como sensor amperométrico de dopamina e outro como biossensor de penicilina usando dispositivos de efeito de campo. No primeiro, CNTs do tipo multi-paredes (*multi-walled carbon nanotubes – MWNTs*) foram submetidos a um tratamento químico adequado para se tornarem solúveis e foram dispersos em solução de dendrímero poliamidoamina (PAMAM). Esse complexo PAMAM-nanotubos (PAMAM-NT) serviu de polímero nos filmes automontados combinados com metaloftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc), um composto de coordenação eletroativo com grande aplicação em sensores. Neste sistema foi realizado um detalhado estudo das propriedades físico-químico dos filmes, e verificou-se a formação de interações moleculares específicas entre os materiais, possíveis somente através desta técnica. A influência da presença dos MWNTs nas propriedades eletroquímicas através do comportamento redox da NiTsPc imobilizadas no filme automontado também foi estudada. Este sistema foi aplicado como eletrodos modificados para detectar dopamina em presença do interferente ácido ascórbico, verificando os efeitos da sensibilidade e de eletrocatalise do eletrodo.

O segundo sistema baseou-se na fabricação de uma nanoestrutura combinando o dendrímero PAMAM com CNTs de parede única (*single-walled carbon nanotubes – SWNTs*). Este filme foi preparado sobre uma estrutura semicondutora utilizada como plataforma na fabricação de dispositivos de efeito de campo. Neste sistema foram estudados dois tipos de sensores de efeito de campo: o *capacitive*

electrolyte-insulator-semiconductor (EIS) e o *light-addressable potentiometric sensor (LAPS)*. Assim como realizado no primeiro sistema, a influência do filme automontado contendo SWNTs sobre estes dispositivos foi estudada. Um biossensor para detectar penicilina foi preparado através da imobilização da enzima penicilinase sobre o dispositivo EIS e LAPS modificado com o filme automontado de PAMAM/SWNT. Os efeitos da incorporação da nanoestrutura no desempenho do biossensor, assim como a atribuição das possíveis causas, foram verificados.

A escrita desta tese baseou-se em três objetivos principais apresentados no **Capítulo 2**. Uma introdução sobre nanotubos de carbono e seu emprego no desenvolvimento de sensores e biossensores será exibida no **Capítulo 3**. Em seguida, o **Capítulo 4** abordará os fundamentos de sensores eletroquímicos. Neste último será discutido o funcionamento de sensores baseados em dispositivos de efeito de campo. O **Capítulo 5** descreve os materiais e as técnicas de caracterização. Os capítulos subseqüentes destinam-se aos resultados e discussões (**Capítulos 6, 7 e 8**) dos dois sistemas nanoestruturados contendo nanotubos de carbono. Por fim, as conclusões do trabalho e propostas para trabalhos futuros serão apresentadas, respectivamente, nos **Capítulos 9 e 10**.

Capítulo 2

OBJETIVOS

Os principais objetivos deste projeto de doutoramento foram:

- 1.) **Fabricação e caracterização de filmes automontados de nanotubos de carbono:** preparar filmes nanoestruturados de diferentes arquiteturas e caracterizá-los por técnicas de microscopia e/ou espectroscopia. Analisar a morfologia dos filmes e possíveis interações entre os nanotubos e outros materiais que os compõem.

- 2.) **Aplicação dos filmes automontados em um sensor amperométrico:** preparar e caracterizar eletrodos modificados combinando nanotubos de carbono e metalofalocianinas para detectar o neurotransmissor dopamina usando técnicas eletroquímicas. Estudar os efeitos das propriedades eletroquímicas do eletrodo modificado na presença dos nanotubos e sua influência na detecção de dopamina.

- 3.) **Aplicação dos filmes automontados em um biossensor de efeito de campo:** incorporar nanotubos de carbono em filmes automontados em dispositivos de efeito de campo do tipo EIS e LAPS e caracterizar a influência desse filme sobre esses dispositivos. Imobilizar a enzima penicilinase sobre o dispositivo modificado e estudar os efeitos sobre o seu desempenho na detecção de penicilina G. Verificar o possível desenvolvimento de novos biossensores com esses dispositivos.

Capítulo 3

NANOTUBOS DE CARBONO

3.1 Introdução

Nanotubos de carbono (CNTs), descobertos no início da década de 90 (25), têm sido estudados nas áreas da física, química e engenharia de materiais. Esse grande interesse se deve às suas propriedades estruturais, mecânicas e elétricas, como alta estabilidade química e térmica, alta elasticidade e condutividade (25,26). São formados somente por carbonos e possuem forma cilíndrica. Sua estrutura pode ser comparada ao de uma folha de grafite enrolada em forma de tubo (27) em que a razão entre seu comprimento e seu diâmetro o torna próximo de uma estrutura unidimensional. As suas estruturas mais importantes são nanotubos de carbono de parede única (*single walled carbon nanotube – SWNTs*) e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*multi walled carbon nanotubes – MWNTs*). O SWNT possui a estrutura de um cilindro simples e o MWNT é composto de vários SWNTs concêntricos. O comprimento e o diâmetro das estruturas dos MWNTs são muito diferentes dos SWNTs, o que implica em muitas diferenças entre suas propriedades (28,29). As propriedades do nanotubo dependem do arranjo atômico de como a “folha de grafite é enrolada”, do diâmetro e do comprimento do tubo e de sua morfologia (28,29).

A estrutura dos SWNTs é dada em termos da quiralidade do tubo e definida por um vetor quiral, \vec{C}_h , pela relação $\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$ (27-29), em que n e m são números inteiros e \vec{a}_1 e \vec{a}_2 são os vetores de células unitárias de uma matriz bidimensional formada pela folha de grafite em que a direção do eixo do nanotubo é perpendicular a esse vetor quiral, como mostrado na figura 3.1.

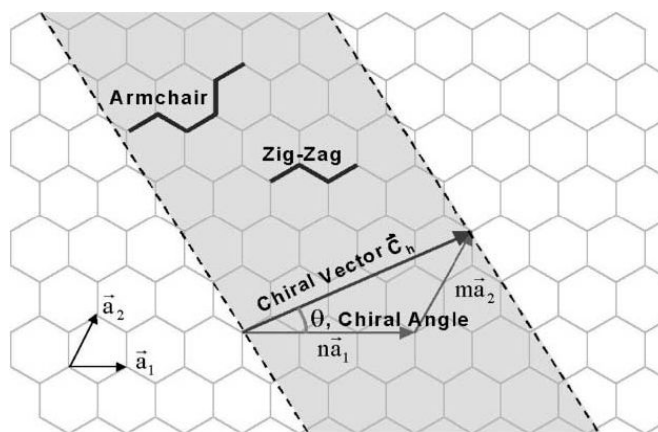


Figura 3.1 – Diagrama esquemático de como uma folha de grafite é enrolado para formar um nanotubo de carbono.

Nanotubos são definidos pelo par (n,m) relacionados ao vetor quiral. Com os valores desse par podem-se ter três tipos de estruturas de CNTs: **ziguezague**, **armchair (poltrona)** e **quiral**, conforme mostrado na figura 3.2.

Tipos de nanotubos

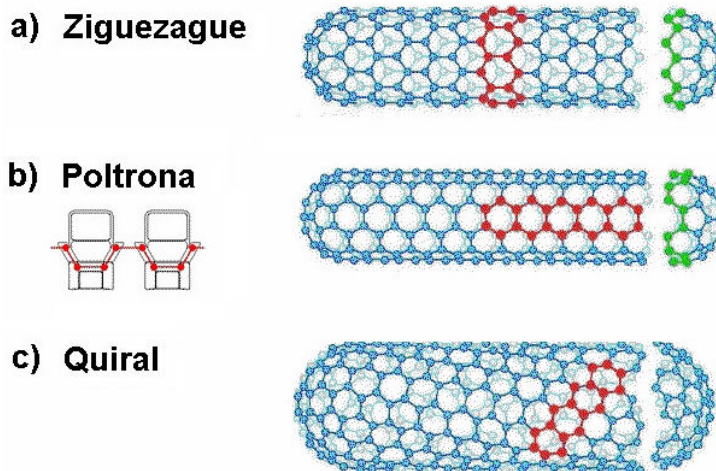


Figura 3.2 – Três tipos de estruturas de SWNTs obtidas com o par (n,m) .

O valor de (n,m) determina a quiralidade do nanotubo, afetando as propriedades ópticas, mecânicas e em particular propriedades eletrônicas. Dependendo da quiralidade, os nanotubos podem ser metálicos ou semicondutores (27-29). Se (n,m) é múltiplo de 3, os nanotubos exibem comportamento **metálico**, ou seja, possui nível de Fermi numa banda semi-preenchida. Quando (n,m) não é

múltiplo de 3, os nanotubos apresentam comportamento **semicondutor**. A tabela 3.1 apresenta a relação de (n,m) com a estrutura do nanotubo e o ângulo quiral, enquanto a figura 3.3 mostra a diferença das propriedades eletrônicas das estruturas ziguezague e armchair no nível de Fermi.

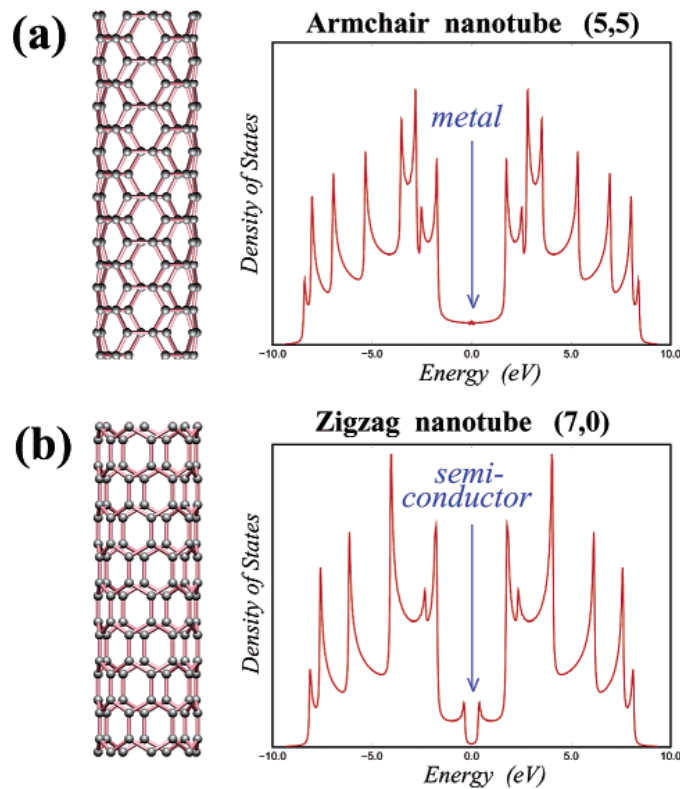


Figura 3.3 – Estrutura eletrônica dos nanotubos (a) armchair (metálico) e (b) ziguezague (semicondutor) (29).

Tabela 3.1 – Relação do par (n,m) com o tipo de SWCNT e seu ângulo quiral.

(n,m)	Estrutura	Ângulo quiral
$n = m$	Armchair	$\Theta = 0^\circ$
$m = 0$	Ziguezague	$\Theta = 30^\circ$
$m \neq n$	Quiral	$0^\circ \leq \Theta \leq 30^\circ$

Os MWNTs são descritos por diferentes modelos de acordo com imagens de microscopia eletrônica. Podem ter a forma cilíndrico coaxial, coaxial em polígono ou folhas de grafeno enroladas (27), como mostrado na figura 3.4.

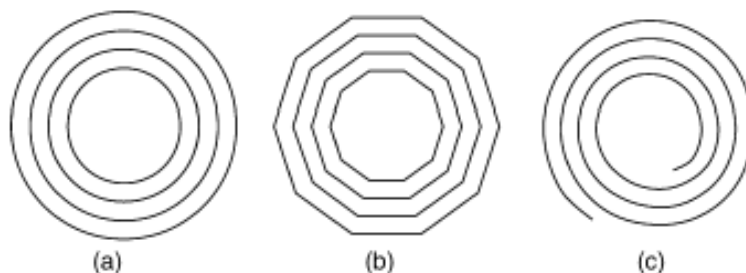


Figura 3.4 – Diferentes formatos de MWNTs: (a) cilíndrico coaxial, (b) coaxial em polígono ou (c) folhas de grafeno enroladas. (27)

3.2 Síntese de nanotubos de carbono

Há diversas técnicas de preparação de nanotubos de carbono, sendo os métodos por descarga por arco elétrico, laser pulsado e deposição química a vapor (CVD) os mais utilizados (30).

3.2.1 Descarga por arco elétrico

Esta técnica se baseia em gerar um arco elétrico entre dois eletrodos de grafite numa câmara fechada contendo um gás inerte (ex. hélio) a uma pressão pouco abaixo da atmosfera. A formação do arco elétrico gera um plasma entre os eletrodos, com transferência de material do eletrodo positivo para o negativo e conseqüente desgaste do primeiro. A temperatura do plasma é extremamente alta, em média 4000K. Nesse ambiente, a evaporação leva átomos de carbono do eletrodo positivo a se acumularem no eletrodo negativo e nas paredes internas da câmara na forma de fuligem. Nesta última é onde se encontram os nanotubos de carbono. A figura 3.5 ilustra esquematicamente o processo de descarga por arco elétrico.

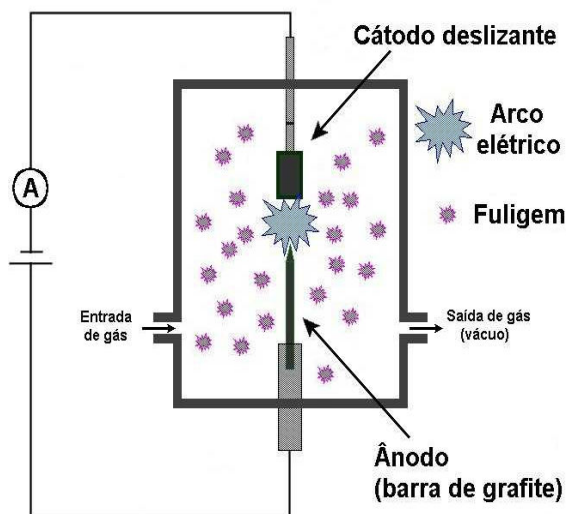


Figura 3.5 – Representação esquemática da preparação de nanotubos de carbono utilizando a técnica de descarga por arco elétrico. (30)

Este método pode ser operado de acordo com o tipo de nanotubo que se quer obter. Os MWNTs são formados evaporando somente grafite, utilizando uma barra de grafite puro como ânodo. Nesse processo os MWNTs se formam de maneira compacta sobre o cátodo. No caso dos SWNCTs, é necessária a co-evaporação de grafite e catalisadores metálicos, tais como Ni, Co, Co/Ni, Co/Y, Ni/Fe. A presença desses metais em pequenas concentrações (em torno de 2%) no plasma provoca a formação de feixes desse tipo de nanotubo. A qualidade e a concentração de SWCNT nas amostras por este método dependem muito da concentração e da razão entre as misturas dos catalisadores.

3.2.2 Laser pulsado

O princípio deste método se baseia na vaporização de um pedaço de grafite por irradiação laser em uma atmosfera inerte (He ou Ar), utilizando um laser pulsado (Nd, Nd-YAG ou CO₂) focalizado sobre um alvo de grafite. O grafite é colocado num tubo de quartzo num forno com temperatura controlada. Com o tubo fechado e evacuado, a temperatura é ajustada até 1200 °C, e preenchido com um gás inerte. O feixe de laser é focado com uma lente sobre o grafite, que passa a varrer uniformemente a sua superfície, vaporizando-o. Nesse processo ocorre a formação

de partículas de carbono que são levadas pelo fluxo de gás até um coletor de cobre resfriado, localizado numa das extremidades do tubo de quartzo. A fuligem formada sobre o coletor e sobre a parede do tubo contém os CNTs. A representação desse método de preparação de nanotubos é mostrada na figura 3.6.

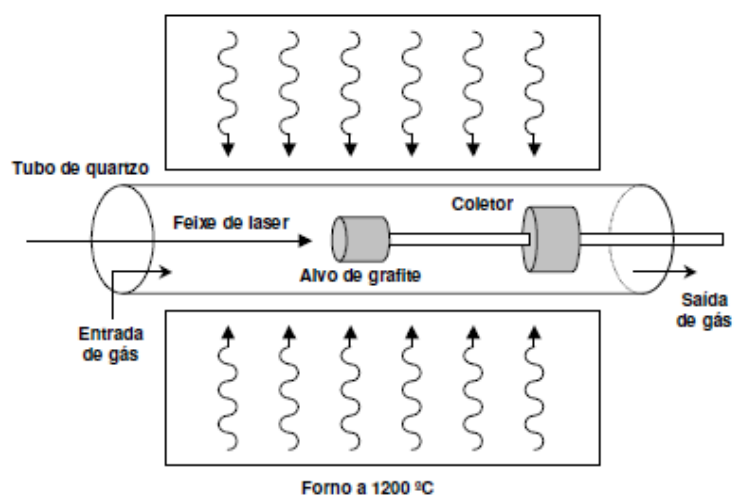


Figura 3.6 – Representação esquemática da preparação de nanotubos de carbono com a técnica de laser pulsado. (30)

De maneira análoga à técnica de descarga por arco elétrico, é possível obter os dois tipos de nanotubos com o uso (ou não) de catalisadores metálicos. MWNTs são obtidos com um alvo de grafite puro, enquanto SWNTs se formam quando partículas de metais de transição são misturadas ao grafite, em que a eficiência da sua produção está ligada ao tipo de catalisador. Uma característica importante dos CNTs gerados por esta técnica é a ausência de material amorfo que os recobre, sendo adequados para o estudo e análise de sua estrutura.

3.2.3 Deposição química a vapor (CVD)

A produção de nanotubos por CVD consiste na decomposição química de precursores voláteis (gases), tais como metano e acetileno, através de tratamento térmico adequado. Os gases atuam como fornecedores dos átomos de carbono que alimentam a reação responsável pela geração dos CNTs. Essa reação é

desencadeada pelo catalisador, que provoca a decomposição do hidrocarboneto precursor em átomos de carbono e hidrogênio. Estes são depositados sobre um substrato, enquanto os primeiros são eliminados por exaustão. Os parâmetros mais importantes deste método são o gás (metano ou acetileno), o tipo de catalisador (Ni, Fe, Co ou Y) e a temperatura do substrato (entre 500 e 700 °C) onde se deseja crescer os CNTs. O tipo de substrato possui papel importante, pois pode limitar a região de crescimento dos nanotubos, tendo um caráter interessante na fabricação de dispositivos (5-8). Por envolver uma reação de decomposição de compostos moleculares por aquecimento, essa técnica é também chamada de pirólise, esquematicamente ilustrada na figura 3.7.

Esta técnica tem a vantagem de formar nanoestruturas ordenadas sobre um substrato, permitindo aplicação imediata, por exemplo, em dispositivos eletrônicos. Além disso, é considerado o método mais adequado para produção de CNTs em escala comercial, pois não gera estruturas amorfas de carbono e resíduos de partículas metálicas, diferentemente do gerado por descarga de arco elétrico. Possui alto rendimento e é, em muitos aspectos, um método muito similar ao utilizado para produzir fibras de carbono, um processo bem conhecido (30).

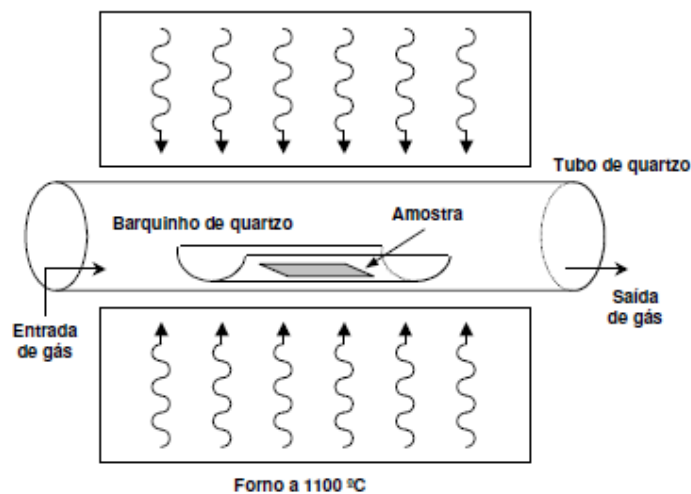


Figura 3.7 – Representação esquemática da síntese de nanotubos de carbono com a técnica de deposição química a vapor (CVD). (30)

3.3 Aplicação em sensores e biossensores

A aplicação de CNTs em sensores e biossensores requer sua manipulação no nível molecular, o que tem sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisa (5-8). Uma das maneiras mais eficazes de manipulação dos nanotubos é na forma de filmes ultrafinos. Olek e colaboradores mostraram ser possível imobilizar nanotubos com bom controle das propriedades utilizando a automontagem (31). Para filmes automontados, porém, é necessário que os nanotubos sejam funcionalizados. A modificação química e solubilização de CNTs representa uma nova área de pesquisa (32), devido às novas características oriundas da funcionalização. Nanotubos funcionalizados podem ser usados, por exemplo, em nanocompósitos poliméricos, na investigação da interação molecular nanotubo-molécula e conjugação com espécies biológicas (5-8). Há vários relatos na literatura acerca das técnicas de funcionalização dos SWNT e MWNT (33-40), sendo que a mais empregada se baseia na ligação de ácidos carboxílicos sobre as extremidades e regiões de defeito na superfície do tubo via tratamento em banho ácido. Atualmente CNTs funcionalizados com grupos carboxílicos e outros grupos funcionais podem ser adquiridos comercialmente.

O interesse de integrar CNTs e sistemas biológicos em dispositivos elétricos, como biossensores, advém especialmente da compatibilidade do tamanho, pois os componentes dos circuitos eletrônicos têm dimensões comparáveis às entidades biológicas. As interações eletrostáticas e a transferência de carga, típicas de processos biológicos, podem ser detectadas por nanocircuitos eletrônicos, sendo vantajoso para detectar espécies biológicas (5-8). Por exemplo, o diâmetro dos SWNTs é comparável ao tamanho de moléculas, tais como do DNA que é de 1 nm, ao passo que o seu comprimento é maior, fornecendo deste modo uma interface conveniente com os circuitos em escala micrométrica. Além disso, a alta reatividade e área efetiva desse nanomaterial fornecem uma combinação natural para moléculas orgânicas (5-8).

SWNTs semicondutores vêm sendo usados em transistores de efeito de campo (FET) para detectar espécies biológicas em temperatura e condições ambientes (5-8). Nanossensores de FET com SWNTs podem ser fabricados, em que a porta sólida é trocada por moléculas adsorvidas que modulam a condutância do nanotubo. Há dois tipos clássicos de design de dispositivos de NTFETs. O primeiro utiliza um único nanotubo de carbono como canal de elétrons entre os eletrodos fonte e dreno. O segundo tipo de estrutura envolve um conjunto de nanotubos de

carbono que servem como canal coletivo entre a fonte e o dreno. A interação nanotubo-analito pode ter um de dois efeitos. O primeiro é a transferência de carga das moléculas do analito para os CNTs. No segundo tipo de mecanismo, o analito atua como potencial de espalhamento através do CNT. A distinção entre os dois tipos de mecanismos é obtida através de medidas no transistor. Se ocorrer a transferência de carga, o limiar de voltagem se torna tanto mais positivo (retirando elétrons) ou mais negativo (doando elétrons) (5-8).

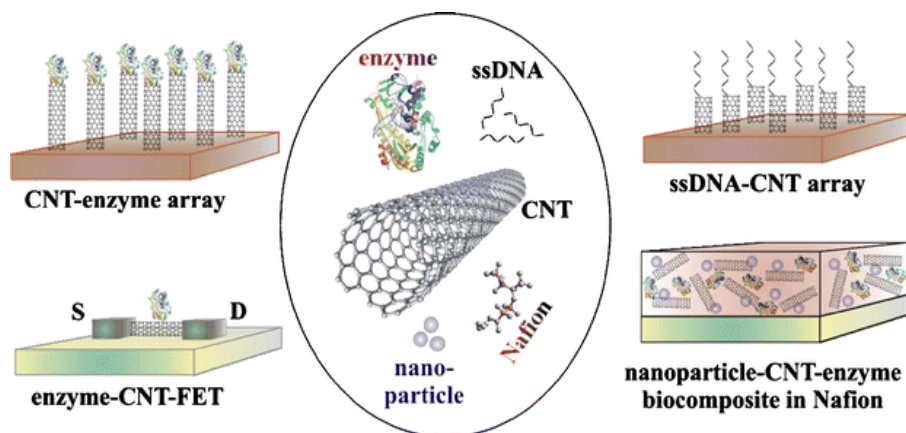


Figura 3.8 – Representação de diferentes tipos de sensores baseados em CNTs (6).

Há um número grande de publicações em sensores eletroquímicos com CNTs. A maioria envolve a fabricação de eletrodos modificados, em que se imobiliza uma enzima sobre sua superfície (41). A figura 3.8 mostra de forma resumida diferentes tipos de sensores baseados em CNTs combinados com materiais variados. Esse grande interesse no estudo de tais sensores advém de um conjunto de vantagens que são atribuídas às propriedades intrínsecas desse material, assim como às suas propriedades sinérgicas com outras substâncias. Além das propriedades elétricas e mecânicas, CNTs exibem propriedades eletroquímicas similares a outros eletrodos de carbono. Em particular, as propriedades elétricas possibilitam que os CNTs sejam capazes de acentuar a mediação de transferência de elétrons de reações com espécies eletroativas em solução (21). Outras vantagens na aplicação de CNTs em sensores eletroquímicos são:

- Aumento da área de superfície eletroativa dos eletrodos;
- Habilidade em catalisar reações redox de analitos;
- Funcionalização com diversos grupos funcionais;

- Imobilização de biomoléculas (ex. enzimas e DNA) sem perda da atividade biológica;
- Melhoramento das propriedades dos sensores (ex. alta sensibilidade e rápido tempo de resposta).

Capítulo 4

SENSORES BASEADOS EM DISPOSITIVOS DE EFEITO DE CAMPO

4.1 Introdução

A pesquisa em sensores é uma das mais multidisciplinares, envolvendo áreas da física, química, biologia e engenharia. De acordo com a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) um sensor químico é um dispositivo que transforma a informação química de uma faixa de concentração de uma amostra específica em um sinal analítico. Essa informação pode ser originada da reação química de um analito ou de uma propriedade física do sistema investigado. Esse tipo de sensor é o principal componente de um analisador. Este último, além do sensor, pode conter dispositivos que desempenham funções tais como processamento de sinais e dados num sistema automatizado. Além disso, sensores químicos contêm duas unidades funcionais básicas: um receptor e um transdutor. Em alguns casos pode estar incluso um separador entre as unidades, como uma membrana. No receptor a informação é transformada numa forma de energia que pode ser medida por um transdutor, ao passo que o receptor transforma a energia que carrega a informação química de uma amostra em um sinal analítico útil (42,43).

O receptor de um sensor químico pode se basear em vários princípios:

- Físico: não ocorre reação química, como em medidas ópticas (absorbância, índice de refração), ou alteração na condutividade, temperatura ou massa.
- Químico: ocorre reação química devido à presença de um analito, gerando um sinal analítico.
- Bioquímico: a fonte do sinal analítico é um processo bioquímico. Sensores químicos baseados neste tipo de receptor são chamados de **biossensores**.

Esses sensores podem ser classificados de diversas formas, sendo a mais usual aquela em que se usa o princípio de operação do transdutor. Sensores óticos, eletroquímicos, elétricos, magnéticos, termométricos e sensíveis a massa, são exemplos de alguns grupos (42,43). Os sensores estudados neste projeto de doutoramento se classificam entre os sensores eletroquímicos, que serão mais detalhados a seguir.

4.2 Sensores eletroquímicos

Sensores ou dispositivos eletroquímicos transformam o efeito de uma interação eletroquímica analito-eletrodo em um sinal útil. Esses efeitos podem ser eletricamente estimulados ou resultar de interação espontânea sem corrente elétrica. Os subgrupos podem ser distinguidos da seguinte maneira:

- 1.) Sensores voltamétricos, incluindo os amperométricos, em que a corrente é medida no modo d.c. ou a.c. Envolve sensores baseados em eletrodos quimicamente inertes ou ativos e eletrodos modificados, além de sensores com ou sem fonte de corrente externa (sensores galvânicos);
- 2.) Sensores potenciométricos, em que o potencial do eletrodo indicador (eletrodo de íons seletivo, eletrodo redox) é medido em relação ao eletrodo de referência;
- 3.) Transistor de efeito de campo modificado quimicamente (CHEMFET), onde o efeito da interação entre o analito e a camada ativa gera mudanças na corrente de fonte e dreno, sendo similar ao encontrado em sensores potenciométricos seletivos para íons (ISE).
- 4.) Sensores potenciométricos de gás, feitos de eletrólito sólido, que se diferem por trabalhar em altas temperaturas.

Um biossensor eletroquímico é um dispositivo receptor-transdutor integrado (um eletrodo modificado quimicamente com um filme de material bioquímico), que é capaz de fornecer uma informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa, usando um elemento de reconhecimento biológico. É classificado de acordo com o mecanismo de especificidade biológica ou pelo modo do sinal de transdução, ou por uma combinação de ambos, sendo também descritos como sensores

amperométricos, potenciométricos, de efeito de campo ou condutivos (42,43). A tabela 4.1 sumariza os tipos de sensores eletroquímicos classificados por seu tipo de medida, seguido de seus respectivos transdutor e analito transdutor.

Tabela 4.1 – Tipos de sensores eletroquímicos baseados no modo de medida.

Tipo de medida	Transdutor	Analito transdutor
Amperométrico	Eletrodos de carbono ou metal Eletrodos quimicamente modificados	O ₂ , açúcar, álcool... Açúcar, álcool, fenóis, oligonucleotídeos...
Potenciométrico	Eletrodos de íon seletivo (ISE) Eletrodos de vidro Eletrodo de gás Eletrodo de metal	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , F ⁻ H ⁺ , Na ⁺ ... CO ₂ , NH ₃ Espécies redox
Condutimétrico, Impedimétrico	Eletrodos interdigitados Eletrodos de metal	Espécies carregadas, oligonucleotídeos, uréia...
Íon carregado ou efeito de campo	Transistor de efeito campo sensível a íon (ISFET) FET-enzimático (ENFET)	H ⁺ , K ⁺ ...

4.3 Dispositivos de efeito de campo

O desenvolvimento da micro e nanotecnologia de semicondutores trouxe avanços com novos tipos de sensores que combinam o processo de reconhecimento químico ou biológico com chips de silício. O uso de materiais funcionalizados e a tecnologia do silício permitem criação de sistemas de sensoriamento, incluindo sinais de processamento inteligente de parâmetros bioquímicos e microeletrodos para determinação de íons e produtos metabólicos em biomedicina, análise de alimentos e monitoramento ambiental. Neste contexto, o dispositivo de efeito de campo (FED) é uma classe de sensor eletroquímico, cujas principais vantagens são baixo peso e área miniaturizada, tempo de resposta rápido, robustez, integração de um conjunto de sensores em um chip e possível baixo custo de fabricação. O sensor capacitivo *electrolyte-insulator-semiconductor (EIS)*, o *light-addressable potentiometric sensor (LAPS)* e o *ion-sensitive field-effect transistor (ISFET)*, são exemplos típicos de sensores baseados na plataforma FED, sendo este último o mais conhecido (3,4,44).

Esses dispositivos são derivados do *metal-insulator-semiconductor capacitance (MIS)* ou *insulated-gate field-effect transistor (IGFET)*, onde a porta (*gate*) é substituída por uma solução eletrólito (amostra teste) e um eletrodo de referência. Com a introdução de um íon e/ou uma porta sensível a cargas, os FEDs são sensíveis a qualquer interação elétrica próxima ou na interface do eletrólito. As reações (bio)químicas podem ser detectadas pelos sensores EIS, LAPS ou ISFET acoplados com o elemento de reconhecimento químico ou biológico. Por exemplo, mudanças na composição química do analito induzirão alterações elétricas da superfície do FED, modulando a capacitância do sensor EIS, a fotocorrente do LAPS ou a corrente de fonte-dreno do ISFET, conforme mostrado na figura 4.1.

Para a geração do sinal, os seguintes mecanismos podem ser considerados:

- Mudança na concentração iônica ou do pH;
- Mudança na concentração iônica devida a uma reação enzimática;
- Adsorção de macromoléculas carregadas (ex: polieletrólitos, proteínas, DNA);
- Estabelecimento de ligação de moléculas (ex: afinidade à reação antígeno-anticorpo ou hibridização de DNA);
- Mudanças em sistemas biológicos devidas a processos (bio)químicos mais complexos (ex: possível ação de células nervosas, processo metabólico de bactérias ou células, interações ligante-receptor).

A tabela 4.2 resume alguns sensores químicos e biossensores sensíveis a vários íons e analitos, desenvolvidos com EIS, LAPS e ISFET como transdutores (3,4,44).

Tabela 4.2 – Tipos de sensores utilizando sensores de efeito de campo.

Tipos de sensor	Íon / analito	Membrana Sensível ou (bio) elemento de reconhecimento
Sensor de pH	H ⁺ , OH ⁻	Si ₃ N ₄ , Al ₂ O ₃ , Ta ₂ O ₅
Sensor de íons	K ⁺ , Li ⁺ , Cs ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻	Membrana polimérica & ionóforo
Sensor enzimático	Glicose, uréia, penicilina, alina, pesticidas, cianida	Glicose oxidase, urease, penicilinase, alinase, hidrolase organofosforada, cianidase

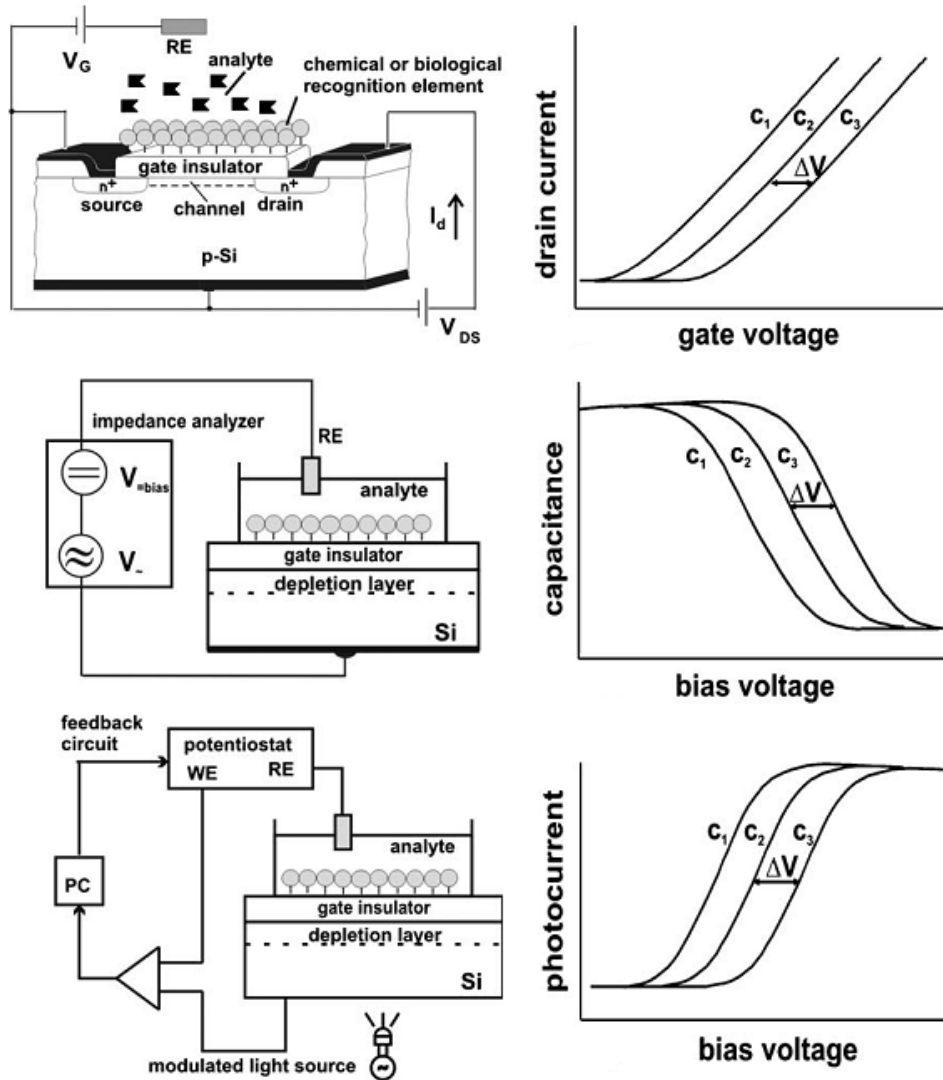


Figura 4.1 – Princípio de detecção de um ISFET, EIS e LAPS, respectivamente, e a correspondente mudança do sinal gerado. (V_{\sim} : tensão ac, $V_{=}$: dc tensão, V_{DS} : tensão fonte-dreno, I_d : corrente de dreno, WE: eletrodo de trabalho, RE: eletrodo de referência). (44)

4.4 Princípio de operação do FED

A descrição do princípio de funcionamento dos FEDs será concentrada nos dois tipos de dispositivos estudados, o sensor capacitivo EIS e o LAPS. A descrição do ISFET por ser encontrada na ref. (44). Esses dois tipos sensores de efeito de campo possuem estruturas similares, diferindo no princípio de transdução empregado para gerar as regiões de excesso de cargas no semiconductor (3,4,44).

Contudo, o princípio básico de operação de ambos deriva do capacitor MIS (metal-isolante-semicondutor).

4.4.1 Capacitor MIS

A estrutura do capacitor MIS consiste de um substrato semicondutor, por exemplo p-Si, e uma camada de metal (ou silício policristalino) como eletrodo porta (*gate*), separados por uma camada nanométrica (10-100 nm) de material isolante, conforme ilustrado na figura 4.2. Geralmente, o isolante da porta é de SiO₂ ou de uma dupla camada isolante, tais como SiO₂-Ta₂O₅, em que se assume ser ideal, ou seja, a corrente não passa através do isolante. Essa estrutura pode ser considerada como de um capacitor de duas placas paralelas, embora as características de operação do capacitor MIS sejam totalmente diferentes dos capacitores de placas paralelas convencionais (44). Neste caso, em particular, a propriedade mais importante é a distribuição da carga espacial no semicondutor, responsável pela modulação da capacitância do MIS através de um potencial aplicado na porta.

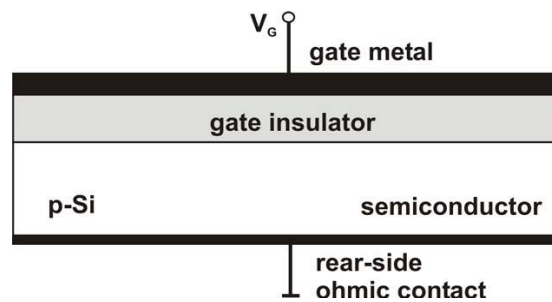


Figura 4.2 – Estrutura do capacitor MIS. V_G : tensão da porta. (44)

A capacitância total da estrutura MIS, C , pode ser considerada como uma combinação em série da capacitância do isolante, $C_i = \epsilon_i / d$ (ϵ_i e d são a permissividade elétrica e espessura do isolante, respectivamente) e da capacitância de carga espacial dependente da tensão no semicondutor, C_{SC} :

$$C = \frac{C_i C_{SC}}{C_i + C_{SC}} \quad (4.1)$$

as capacitâncias C , C_i e C_{SC} são definidas usualmente por área de superfície em cm². Na equação 4.1, C_i corresponde à capacitância máxima do sistema, para uma dada

espessura d , enquanto C_{SC} é determinada pela espessura da região de carga espacial no semicondutor, que está associada à tensão aplicada no sistema. Desta forma, a capacitância total da estrutura MIS também será dependente desta tensão (V_G).

A figura 4.3 mostra uma curva teórica típica de capacitância-voltagem (C/V) de uma estrutura MIS tipo p ideal. Esta curva exibe três regiões distintas de operação do capacitor MIS, chamados de modos de **acumulação**, **depleção** e **inversão**. No caso de estruturas tipo n, a curva é idêntica, porém com polaridade da voltagem reversa (tensão positiva gera acumulação e negativa inversão).

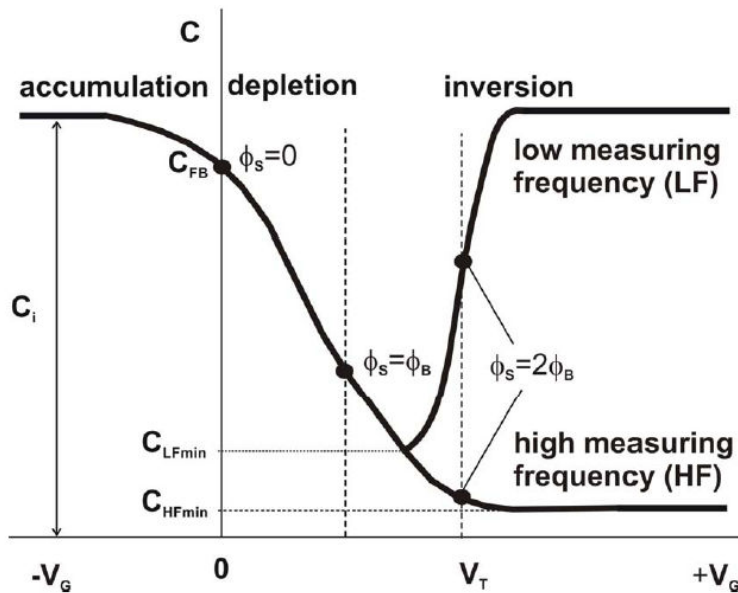


Figura 4.3 – Curva teórica C/V de uma estrutura MIS tipo p medida em baixa e alta frequência. Φ_S : potencial de superfície do semicondutor, Φ_B : diferença de potencial entre o nível de Fermi no *bulk* do semicondutor, C_i : capacitância do isolante, C_{FB} : capacitância da *flat-band*; C_{LF} : capacitância mínima em baixa frequência, C_{HF} : capacitância V_T : limiar da tensão. (44)

Os três modos exibidos na curva C/V podem ser mais bem explicados usando um diagrama de banda de energia e suas respectivas distribuições de carga para cada região, conforme mostrado na figura 4.4. Quando o potencial negativo ($V_G < 0$) é aplicado na porta, mostrado na figura 4.4a, forma-se um campo elétrico que provoca acúmulo de portadores majoritários, neste caso buracos, na interface semicondutor-isolante. Esse modo de operação é denominado acumulação. Neste último, o capacitor MIS se comporta como um capacitor de placas paralelas convencional, em que a capacitância total é determinada pela camada isolante, ou seja, $C = C_i$. A depleção, mostrada na figura 4.4b, ocorre quando um pequeno

potencial positivo ($V_G > 0$) é aplicado no eletrodo metálico, originando cargas negativas no semicondutor, que neutraliza os portadores livres (buracos) no substrato p-Si próximo da interface. Forma-se uma região com déficit de portadores móveis, sendo as cargas negativas devidas aos átomos aceitadores ionizados. A largura da região de depleção, w_d , é determinada por uma série de parâmetros, tais como a tensão aplicada, a concentração de dopagem do substrato, a constante dielétrica e a espessura do isolante (44). Logo, a capacitância equivalente da estrutura MIS no modo de depleção é representada por uma capacitância fixa, C_i , e a capacitância variável de camada de depleção é dada por:

$$C = \frac{C_i}{(1 + (\epsilon_i w_d / \epsilon_s d))} \quad (4.2)$$

onde ϵ_s é a permissividade do semicondutor. Com o aumento da tensão aplicada, aumenta a largura da região de depleção, w_d , diminuindo a capacitância total.

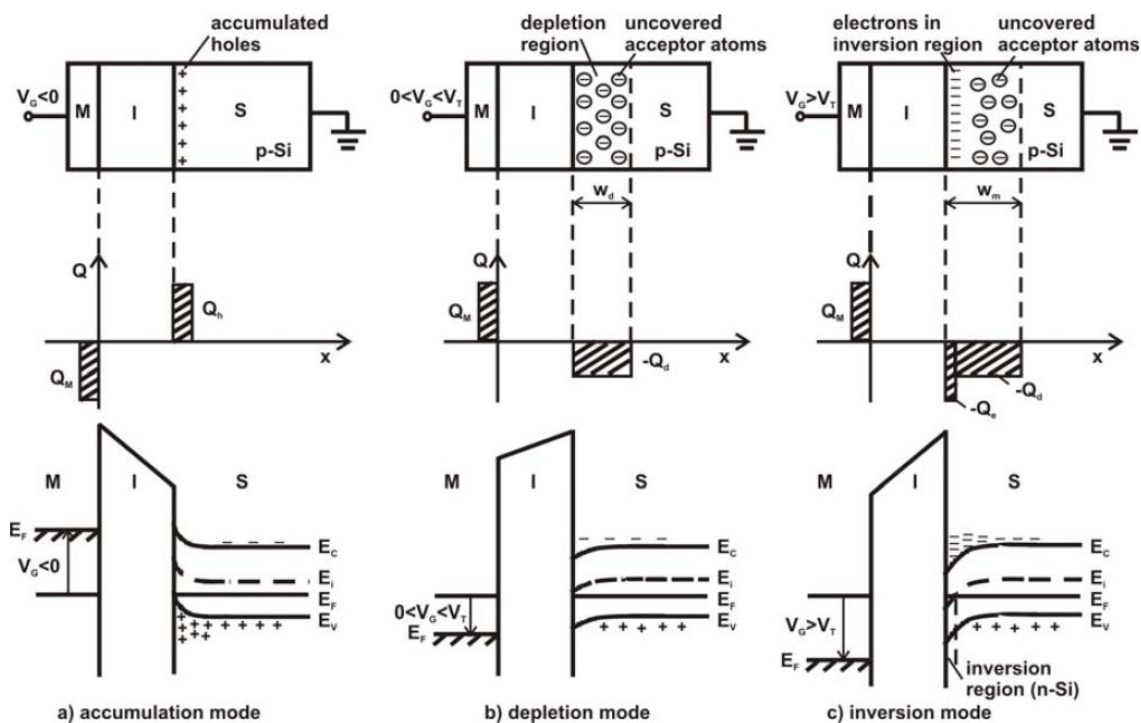


Figura 4.4 – Distribuição de carga e diagrama de banda de energia da estrutura MIS nos modos (a) acumulação, (b) depleção e (c) inversão, respectivamente. M: metal, I: isolante, S: semicondutor, Q_M : carga sobre a porta metálica, Q_h : carga dos buracos acumulados, Q_d : carga na região de depleção, Q_e : carga de elétrons na região de inversão, w_d : largura da região de depleção e w_m : largura máxima da região de depleção. Os símbolos (+) na interface semicondutor-isolante representam os buracos acumulados, enquanto os (-) representam os elétrons. (44)

Quando o potencial aplicado na porta é maior que a tensão de limiar (V_T), ocorre o modo de inversão (ver figura 4.2). A concentração de elétrons próxima da interface semiconductor-isolante excede a concentração de buracos, formando uma camada carregada negativamente, além de uma camada de depleção, conforme mostrado na figura 4.4c. Esta camada é formada por portadores de carga minoritários, atraídos para a interface pela tensão positiva na porta. Neste modo, a capacitância total pode se tornar igual à da região de acumulação, se a frequência usada for suficientemente baixa (abaixo de 100 Hz), pois as flutuações de carga na porta são suficientemente “lentas” para a carga de inversão acompanhar a variação diretamente (44). Em altas frequências, o abastecimento de portadores de carga na camada de inversão não é suficientemente rápido para alcançar um equilíbrio, não ocorrendo o aumento da capacitância nesta região (ver figura 4.2).

O potencial que separa o regime de acumulação e depleção é chamado de tensão de *flatband* (V_{FB}), sendo definido quando a tensão da porta (V_G) é igual à diferença da função trabalho entre as bandas de energia da porta metálica e do semiconductor. Nessa condição a banda de energia do semiconductor é plana (*flat*), que implica na não existência de densidade de cargas no semiconductor. Em uma estrutura MIS ideal, pressupõe-se que a *flatband* ocorra quando $V_G = 0$. No entanto, tal condição não se aplica para estruturas reais por uma série de fatores, incluindo: diferença entre as funções trabalho do metal (W_M) e do semiconductor (W_S), cargas localizadas no interior e na superfície do isolante (Q_i livres ou fixas), além do estado de interface (Q_{SS}), devido ao processamento e condições não ideais do material (44). Logo, V_{FB} de um MIS não ideal é diferente de zero, e determinado em função das diferenças de funções trabalho e da presença de cargas, de acordo com a equação:

$$V_{FB} = \frac{W_M - W_S}{q} - \frac{Q_i + Q_{SS}}{C_i} \quad (4.3)$$

Mesmo o semiconductor estando em equilíbrio, essa condição não ideal leva à deformação da banda de energia, assim como desloca a voltagem ao longo da curva C/V e, portanto, um potencial adicional deve ser aplicado no metal para que a condição de *flatband* seja alcançada. Para aplicação em sensores, a *flatband* é o parâmetro mais importante a ser analisado numa estrutura capacitiva.

4.4.2 Sensor capacitivo EIS

O *electrolyte-insulator-semiconductor* (EIS) é a estrutura mais simplificada de um sensor (bio)químico baseado em FEDs. Como já mencionado, sua estrutura deriva do capacitor MIS, em que a porta metálica é substituída por um eletrólito (analito) e um eletrodo de referência (RE). Seu funcionamento se baseia na aplicação de uma tensão dc polarizada via RE para ajuste do ponto de trabalho (*working point*) do sensor EIS, além da aplicação de uma pequena tensão ac ($\sim 10\text{-}50\text{ mV}$) no sistema para medir a capacitância do sensor (3,4,44). A figura 4.5 ilustra a configuração e o princípio de operação de uma estrutura EIS.

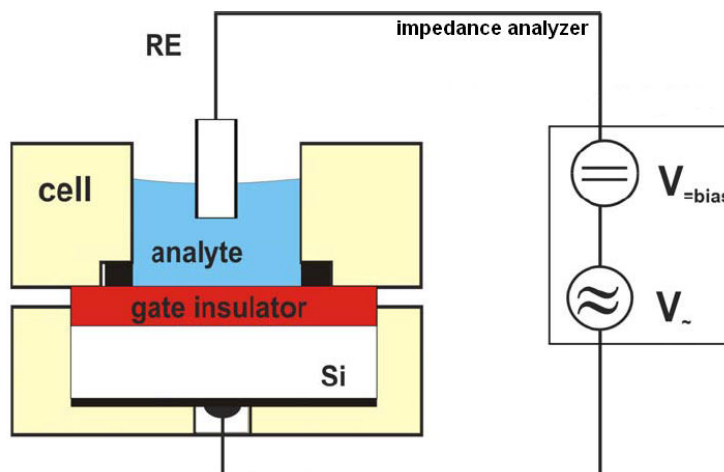


Figura 4.5 – Representação esquemática do sistema de medida do sensor capacitivo EIS.

O circuito equivalente ac completo de um sistema EIS é complexo e inclui componentes, tais como a resistência de *bulk* e a capacitância de carga espacial do semicondutor, a capacitância do isolante, a impedância de interface isolante-eletrólito e a capacitância da dupla-camada, a resistência de *bulk* do eletrólito e da impedância do eletrodo de referência. No entanto, considerando valores usuais da espessura do isolante ($\sim 30\text{-}100\text{ nm}$), a força iônica ajustada da solução eletrólito ($>10^{-4}\text{-}10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$) e em frequências usuais, o circuito equivalente da estrutura EIS pode ser simplificado como uma conexão em série das capacitâncias do isolante e da carga espacial do semicondutor, como descrito na subseção anterior para a estrutura MIS. Assim, a capacitância da estrutura EIS é similar à do MIS, porém com a possibilidade de modulação de tensão de *flatband*, e conseqüentemente da

capacitância da carga espacial, devido ao potencial (φ) da interface isolante-eletrólito. Logo, a capacitância da estrutura EIS é calculada por:

$$C(\varphi) = \frac{C_i C_{sc}(\varphi)}{C_i + C_{sc}(\varphi)} \quad (4.4)$$

A caracterização dos sensores EIS se baseia em medidas nos modos de capacitância-voltagem (C/V) e capacitância constante (ConCap). A figura 4.6 ilustra curvas típicas (a) C/V e (b) resposta ConCap de um sensor EIS, tipo p, medidas em diferentes pHs.

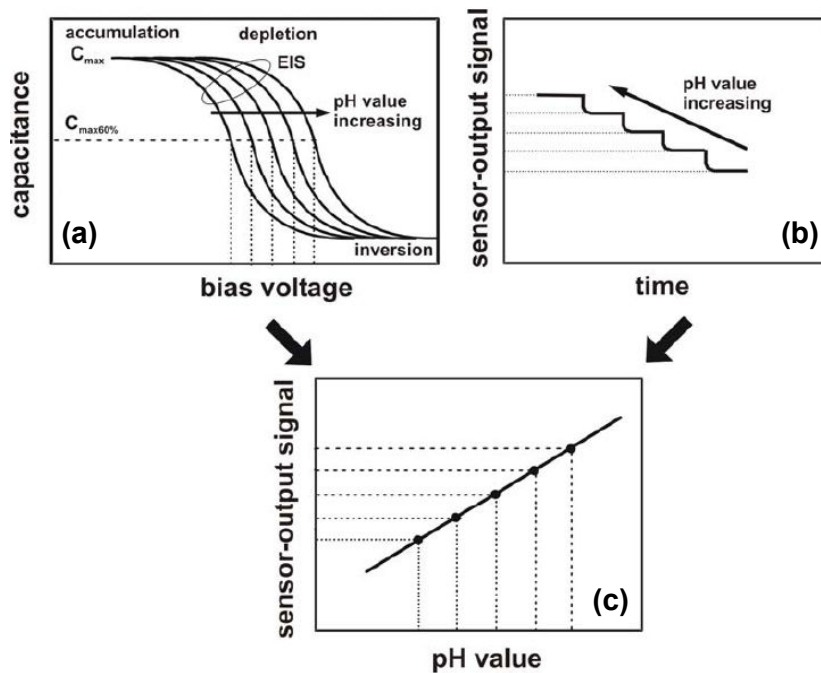
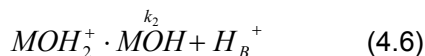
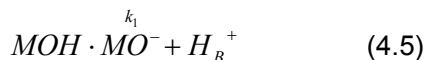


Figura 4.6 – Representação esquemática das curvas de caracterização (a) C/V e (b) ConCap de um sensor EIS (tipo p) medidas em diferentes pHs e a (c) curva de calibração que define a sensibilidade ao pH deste sensor. (44)

Assim como no capacitor MIS, a curva C/V de um sensor EIS também exhibe os três modos de acumulação, depleção e inversão. No entanto, somente a região de depleção é empregada e analisada na aplicação dessa estrutura em sensores. A figura 4.6a mostra o deslocamento das curvas C/V na região de depleção, demonstrando sua dependência com a concentração iônica (neste caso pH) devido ao potencial (φ) da interface isolante-eletrólito (44).

Nos sensores EIS sensíveis ao pH, os níveis de energia da interface isolante-eletrólito se altera com a mudança na concentração de íons H^+ , gerando um potencial de interface. O mecanismo de funcionamento de um FED sensível ao pH pode ser explicado com o modelo de *site-binding* (44), mostrado na figura 4.7. As

superfícies de qualquer óxido metálico contêm grupos hidroxílicos (MOH) anfotéricos neutros, que dependendo do pH da solução são capazes de tanto se ligar, no caso do MOH_2^+ , ou liberar um próton, no caso do MO^- , de acordo com as seguintes reações:



onde H_B^+ representa os prótons no *bulk* da solução e k_1 e k_2 são constantes de equilíbrio.

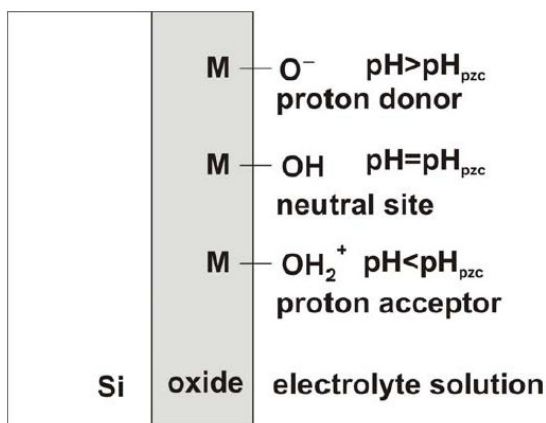


Figura 4.7 – Representação ilustrativa do modelo de *site-binding* na interface isolante-eletrólito, em que os grupos MOH permanecem neutros ou tornam-se positivos (MOH_2^+) ou negativos (MO^-) de acordo com o pH do eletrólito. pH_{pzc} : pH no ponto de carga nula. (44)

Como resultado, quando $pH > pH_{pzc}$ (pH_{pzc} é o valor do pH no ponto de carga nula), a superfície do óxido é carregada negativamente e quando $pH < pH_{pzc}$ positivamente, como mostrado na figura 4.7. A dependência ao pH, resultante da carga elétrica na superfície do isolante da porta, causa modulação da capacitância da estrutura EIS. Logo, uma expressão geral para a sensibilidade ao pH deste dispositivo pode ser definida em função da mudança de potencial na interface isolante(óxido)-eletrólito como resposta às mudanças no pH da solução:

$$\frac{\delta\varphi}{\delta pH_B} = -2,3 \frac{kT}{q} \alpha \quad (4.7)$$

sendo

$$\alpha = \frac{1}{(2,3kTC_{dif} / q^2 \beta_{int}) + 1} \quad (4.8)$$

onde α é um parâmetro de sensibilidade adimensional que varia de 0 a 1 e depende da capacidade da interface com o tampão, β_{int} caracteriza a possibilidade de a superfície do óxido liberar ou receber prótons e C_{dif} é determinada pela concentração da solução de *bulk* via o comprimento de Debye. Pelas equações 4.7 e 4.8 pode-se inferir que a sensibilidade máxima de Nerst (59,3 mV/pH a 25 °C) pode ser obtida somente no caso que α se aproxima de 1, enquanto para óxidos com $\alpha < 1$, uma resposta sub-Nerst é esperada (44). A condição $\alpha = 1$ é alcançada para óxidos com alto valor de capacidade de superfície do *buffer* (alta densidade de sítios com superfície ativa) e baixo valor de capacitância da dupla camada (eletrólito com baixa concentração). Portanto, óxidos com grande quantidade de sítios na superfície, tais como o Ta₂O₅ (~10¹⁵ cm⁻²) ou Al₂O₃ (~8 x 10¹⁴ cm⁻²), exibem alta sensibilidade ao pH, enquanto que o SiO₂ (~5 x 10¹⁴ cm⁻²) com menor quantidade de sítios exibe menor sensibilidade ao pH (44).

Para caracterizar a sensibilidade química do sistema EIS, é essencial manter as condições na interface semiconductor-isolante constante, de forma que as mudanças na região de depleção das curvas C/V possam ser totalmente atribuídas às reações na interface isolante-eletrólito. Tal condição é satisfeita na *flatband* através da equação:

$$V_{fb} = E_{ref} - \varphi + \chi_{sol} - \frac{W_s}{q} - \frac{Q_i + Q_{SS}}{C_i} \quad (4.9)$$

onde E_{ref} é o potencial do eletrodo de referência, χ_{sol} é o potencial de dipolo da superfície e φ é o potencial na interface isolante-eletrólito, que depende da atividade dos íons em solução (44). Este último é o único termo não constante da equação 4.9, indicando que a sensibilidade da estrutura EIS com respeito à composição do eletrólito depende da variação da tensão de *flatband*, que pode ser determinada de forma precisa pelas curvas C/V. Os demais termos são similares aos da equação 4.3.

De forma contrária ao método C/V, o modo de medida ConCap permite uma investigação dinâmica do comportamento do sinal do sensor. Esse método é apropriado para uma caracterização simples e direta das camadas sensíveis a íons. Além da sensibilidade, esse modo permite caracterizar parâmetros importantes que determinam as características de um sensor, tais como tempo de resposta e a estabilidade e *drift* do sinal em períodos longos e curtos, assim como o efeito da

histerese. Porém, para melhor obtenção de dados, é necessário ajustar uma capacitância do ponto de trabalho (*working point*), geralmente extraída da região de *flatband* com valor de ~60-70% da capacitância máxima nas curvas C/V . Usando um circuito de controle de *feedback* para manter constante essa capacitância, pode-se observar alterações no potencial resultante da mudança da concentração de íons na superfície do sensor (ver curva na figura 4.6b).

4.4.3 Dispositivo LAPS

O *light-addressable potentiometric sensor* (LAPS), assim como o sensor EIS e ISFET, é um FED utilizado em sensores químicos. Porém, diferentemente dos outros é possível empregar a plataforma LAPS em um sistema de multi-sensores em um único chip. O sistema LAPS consiste de três unidades, sendo uma célula eletroquímica onde se insere o chip LAPS, uma fonte de luz de diodos emissores de luz (LEDs) infravermelha ou laser, e um circuito eletrônico para medir fotocorrente (44). A montagem do sistema de medida e seu circuito equivalente são mostrados na figura 4.8.

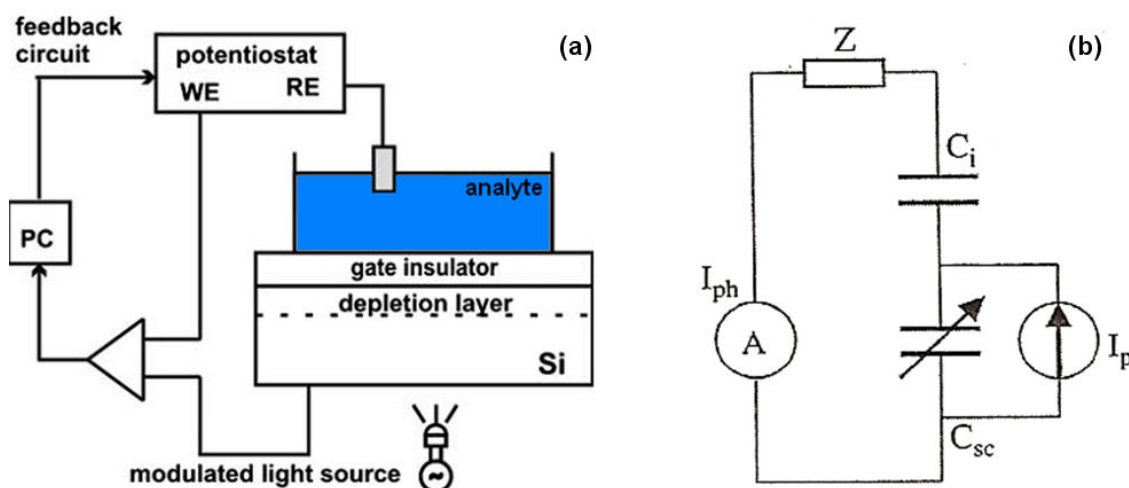


Figura 4.8 – (a) Representação esquemática da montagem experimental do sistema LAPS e seu (b) circuito equivalente. Z : impedância do sistema, incluindo do eletrodo de referência, C_i : capacitância do isolante, C_{sc} : capacitância da região de carga espacial, I_{ph} : fotocorrente, I_p : componente alternado de fotogeração dos pares elétron-buraco. (44)

A estrutura LAPS é similar ao EIS, tanto que na ausência de iluminação o LAPS se comporta como um capacitor EIS. Aplicando uma tensão dc no eletrodo de referência, surge uma camada de depleção na interface semiconductor-isolante. A largura dessa camada e a capacitância variam com o potencial de superfície do isolante. Essa variação é detectada iluminando o chip LAPS com uma luz modulada, que induz fotocorrente ac para ser medida como o sinal do sensor (3,4,44).

A iluminação de um semiconductor por luz infravermelha gera pares elétron-buraco que podem se difundir, recombinar ou ser separados por um campo elétrico. Quando o semiconductor é guiado à condição de depleção, os pares elétron-buraco difundidos do *bulk* do semiconductor para a região de depleção, ou os que foram fotogerados nesta região, são separados pelo campo elétrico em uma escala de tempo curta em comparação ao tempo de recombinação. A excitação com luz pode ser por iluminação frontal (passando pelo isolante) ou do lado traseiro da estrutura planar do chip. Quando a luz é incidida no lado frontal, ocorre injeção de portadores com excesso de carga logo abaixo da camada de óxido (isolante) na região de carga espacial. De forma contrária, a luz incidida no lado traseiro gera portadores com excesso de carga no semiconductor. Desses, somente os portadores que se difundirem através do *bulk* do semiconductor até a região de depleção poderão gerar fotovoltagem com a separação de cargas pelo campo elétrico (44).

Quando o semiconductor é iluminado com fonte de luz de intensidade constante ocorre a separação de carga dos pares elétron-buraco fotogerados na região de depleção, gerando uma corrente transiente que decai a zero, assim como a formação de cargas separadas sobre a região de depleção neutraliza a tendência de separação de outras cargas. Esse efeito é similar ao carregamento de um capacitor. No regime estacionário de iluminação, a recombinação e a geração dos pares elétron-buraco se equilibram e não há fotocorrente. Desligando a iluminação induz-se uma corrente transiente de polaridade oposta, análogo ao descarregamento de um capacitor. As cargas separadas voltam pela região de depleção, que retorna a sua largura original. Ao modular a intensidade da luz com um período mais curto que o tempo de decaimento das correntes de transiente, modula-se a capacitância na região de depleção, gerando uma fotocorrente alternada em um circuito externo (44). Esta fotocorrente é devida ao rearranjo dos portadores de carga na camada de depleção, enquanto a iluminação é ligada e

desligada. A amplitude deste sinal é a quantidade a ser medida. Com forte depleção, a fotocorrente alternada medida (I_{ph}) é determinada pelos pares elétron-buraco que se formam ou difundem na região de depleção e pelas capacitâncias da área iluminada, de acordo com a equação:

$$I_{ph} = I_p \frac{C_i}{C_i + C_{SC}} \quad (4.10)$$

sendo I_p a componente alternada de fotogeração dos pares elétron-buraco.

Como a capacitância da região de carga espacial (C_{SC}) depende da tensão dc aplicada, a fotocorrente na interface isolante-eletrólito é função da tensão aplicada no dispositivo. A figura 4.9a ilustra uma curva de fotocorrente-voltagem (I/V), considerando como exemplo os sinais de resposta para diferentes valores de pH num sensor LAPS (tipo p). São similares às curvas C/V do sensor EIS, possuindo os três modos de acumulação, depleção e inversão, porém de sentido inverso (ver figura 4.6a).

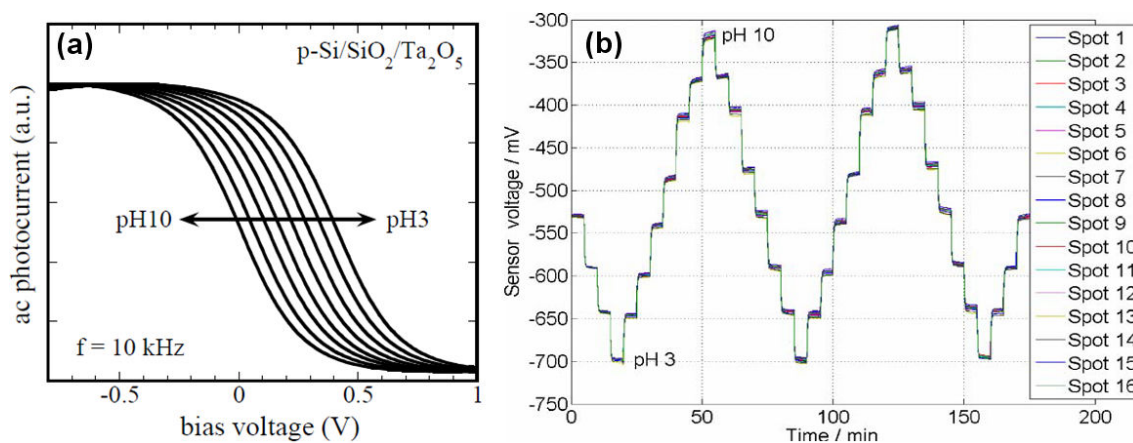


Figura 4.9 – (a) Curvas I/V e (b) resposta CC típicas de um sensor LAPS (tipo p) em testes de sensibilidade ao pH, usando soluções de diferentes valores. (44)

Outro modo de medida no sistema LAPS é o de fotocorrente constante (CC), em que um sistema de *feedback* controla a tensão aplicada para manter constante a fotocorrente. De maneira similar ao modo ConCap do sistema EIS, esse modo possibilita investigar medidas dinâmicas e pode ser usado para detectar soluções com diferentes pHs, como mostrado na figura 4.9b, ou de soluções com diferentes concentrações de íons (analito).

Capítulo 5

MATERIAIS E MÉTODOS EXPERIMENTAIS

5.1 Materiais e soluções usados na fabricação dos filmes automontados

Os materiais para fabricar os filmes automontados foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. e estão descritos abaixo:

- Polieletrólito dendrímero poliamidoamina (PAMAM) de quarta geração;
- Ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc);
- Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNT);
- Nanotubos de carbono de parede única funcionalizados com grupos carboxílicos (SWNT-COOH).

Para desenvolver um dos dois sistemas estudados, soluções aquosas de NiTsPc e PAMAM foram preparadas em pH 4 a concentrações de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente. A dispersão de MWNT foi preparada adicionando 10 mg de MWNTs purificado em 10 mL de solução de PAMAM sob ultrassom por 2h, seguido por filtração e ajuste do pH para 4 usando uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 . Antes de serem dispersos em solução de dendrímero, os nanotubos MWNT foram purificados de acordo com o seguinte procedimento: 100 mg de MWNTs foram oxidados à temperatura de $400 \text{ }^\circ\text{C}$ por 45 min para remoção de partículas de carbono amorfo. Os nanotubos oxidados foram dispersos em 60 mL de solução 6 mol L^{-1} de HCl em ultrassom por 4h para remoção de partículas metálicas usadas na síntese, lavados com água Mili-Q sob centrifugação para remover o ácido até o pH da solução ficar neutro, seguido por secagem no forno a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (23).

Em outro sistema estudado, soluções aquosas de PAMAM e SWNT-COOH foram preparadas em temperatura ambiente à concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$, usando solução de tampão tritisol em pH 4 e pH 8 respectivamente (45-47).

5.2 Fabricação dos filmes automontados

Foram preparados filmes automontados de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc através da imersão alternada de substratos de vidro coberto com óxido de estanho e índio (ITO) na solução policatiônica de PAMAM (5 min) ou PAMAM-NT (10 min) e na solução polianiônica de NiTsPc. Após deposição de cada camada, os filmes eram colocados em solução de lavagem (Mili-Q em pH 4) por 10 s e secos com jato de gás nitrogênio. A figura 5.1a mostra uma representação esquemática da arquitetura do filme automontado de PAMAM-NT/NiTsPc, assim como as estruturas químicas dos materiais usados (23).

Os filmes automontados de PAMAM/SWNT foram fabricados sobre um substrato de Al-Si-SiO₂-Ta₂O₅, conforme ilustrado na figura 5.1b e fixado em uma célula selada com O-ring. As soluções de PAMAM e SWNT foram colocadas sobre o sensor durante 5 min e 10 min respectivamente. Após a deposição de cada camada, os filmes foram enxaguados e lavados em uma solução aquosa de pH neutro e secos com fluxo de N₂ (45-47).

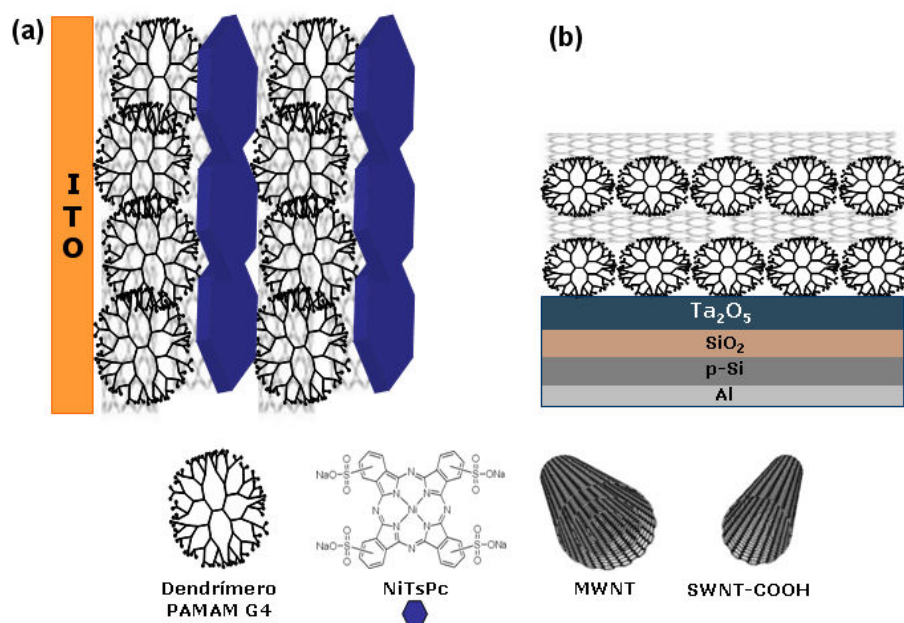


Figura 5.1 – Representações esquemáticas das arquiteturas dos filmes automontados (a) PAMAM-NT/NiTsPc e (b) PAMAM/SWNT, além das estruturas químicas dos materiais.

5.3 Materiais e soluções para os experimentos de detecção

A dopamina (DA) (3-hidroxitiramina hidrocloreada, $C_8H_{11}NO_2 \cdot HCl$) foi adquirida da Fluka e foram preparadas concentrações de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ até $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2SO_4 (23). A enzima penicilinase (*Bacillus cereus*, 1650 unidades/mg de proteína – Sigma) foi preparada em solução tampão triacoolamina $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (TEA) em pH 8, sendo imobilizada via adsorção física colocando-se $80 \mu\text{L}$ de sua solução sobre a superfície do filme PAMAM/SWNT e secos à temperatura ambiente por 4 horas. O sensor foi subsequentemente lavado em solução tampão polimix pH 8 e secos com gás N_2 . As soluções de penicilina G (benzil penicilina, $C_{16}H_{17}N_2O_4SNa$ – Sigma) foram preparadas em diferentes concentrações entre $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e 25 mmol L^{-1} em tampão polimix pH 8, contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução KCl (45-47).

5.4 Técnicas de caracterização

Os filmes nanoestruturados foram caracterizados com diversas técnicas. Por exemplo, espectroscopia de UV-vis foi utilizada para monitorar o crescimento das multicamadas, enquanto com a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e micro-Raman foi possível analisar as interações entre os compostos do filme. A morfologia das nanoestruturas foi obtida por imagens de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (FESEM), ao passo que as caracterizações elétricas e eletroquímicas foram realizadas por medidas convencionais, tais como capacitância-voltagem (C/V) e voltametria cíclica, respectivamente. Um resumo detalhado dos tipos de caracterização, seguido respectivamente da técnica e dos equipamentos usados, estão sumarizados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Técnicas para caracterizar os filmes automontados.

Técnica	Equipamento	Tipo de caracterização
Espectroscopia eletrônica (UV-vis)	Espectrofotômetro Hitachi U-2001	- Visualizar a banda de absorção dos materiais - Monitorar o crescimento das multicamadas
Espectroscopia vibracional de infravermelho (FTIR)	Espectrômetro Nicolet Nexus 470	- Interação entre os materiais que compõem o filme automontado, comparando com espectros do material em volume (modo transmissão)
Espectroscopia de Micro-Raman	Espectrógrafo micro-Raman Renishaw ($\lambda = 633 \text{ nm}$)	- Analisar grau de pureza dos nanotubos de carbono e sua presença nos filmes automontados
Voltametria cíclica	Potenciostato EG&G PAR M280	- Processo redox das ftalocianinas em eletrodos modificados - Ação catalítica da ftalocianina e dos nanotubos na detecção de dopamina
Medidas elétricas	Analizador de impedância Zahner Elektrik	- Monitorar a adsorção de multicamadas sobre o dispositivo de efeito de campo EIS - Testes de sensibilidade ao pH - Detecção de penicilina
Microscopia de força atômica (AFM)	Microscópio Nanoscope III Digital Instruments BioMat Workstation JPK Instruments	- Morfologia dos filmes automontados de ftalocianinas e nanotubos de carbono - Morfologia dos filmes automontados de dendrímeros/nanotubos de carbono e enzima
Microscopia eletrônica de varredura (FESEM)	Gemini [®] FESEM Column LEO 1550 VP	- Morfologia dos filmes automontados de dendrímeros/nanotubos de carbono e enzima

5.5 Fabricação e caracterização dos sensores EIS e LAPS

Os chips dos dispositivos de efeito de campo com estrutura p-Si-SiO₂-Ta₂O₅ foram preparados em uma lâmina de Si (100) tipo p com 356-406 μm de espessura e 1-10 Ωcm . A camada de SiO₂ com 30 nm de espessura foi crescida por oxidação térmica do Si em atmosfera de O₂ a 1050 °C por 30 min, enquanto a camada de Ta₂O₅ (55 nm) foi preparada por oxidação térmica de 30 nm de Ta por *sputtering* em atmosfera de oxigênio a 515 °C por cerca de 30 min. Como camada de contato, um filme de 300 nm de Al foi depositado no lado traseiro do substrato. Os chips de área

quadrada foram cortados com medidas de 10 mm x 10 mm e 20 mm x 20 mm, respectivamente para os sensores EIS e LAPS (3,4).

Os sensores EIS contendo filmes de PAMAM/SWNT com área de contato de 0.5 cm^2 foram caracterizados por medidas de capacitância-voltagem (C/V), capacitância constante (ConCap) e espectroscopia de impedância (IS), usando um analisador de impedância (Zahner Elektrik) e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Metrohm, 3M KCl). No modo ConCap, a capacitância dos sensores EIS foi mantida constante através de um circuito de controle, que permitiu medir diretamente mudanças de potencial causadas por adsorção ou ligação dos compostos carregados. As medidas de impedância foram realizadas em ambas as regiões de acumulação e depleção numa faixa de frequência de 1 Hz a 1 MHz. Para efeito de comparação, as curvas C/V, ConCap e IS das estruturas puras dos EIS também foram medidas (46,48-50).

As unidades eletrônicas do dispositivo LAPS foram implementadas num sistema SMD contendo 16 spots de diodos emissores de luz infravermelho (IR-LEDs) que iluminavam o lado traseiro do sensor (51,52). A área de contato dos sensores LAPS era de $2,25 \text{ cm}^2$ e foram caracterizados através de dois tipos de medidas: curvas corrente-tensão (I/V) e modo de corrente constante (CC). Nas medidas I/V, o sinal de foto-corrente foi medido como função da tensão externa e a concentração do íon foi determinada medindo-se o deslocamento horizontal da curva I/V após especificar os parâmetros de medidas, tais como a faixa de tensão externa e o número de repetição das medidas, até que as 16 curvas I/V correspondentes de cada spot fossem medidas. As medidas I/V foram usadas para definir o ponto de trabalho para o modo de medida CC. O ponto de trabalho ótimo foi encontrado no gradiente mais elevado da curva I-V. Portanto, após a medida individual de todas as 16 curvas I/V, uma foi escolhida para calcular e ajustar o ponto de trabalho para as medidas subsequentes, no modo CC. Para gravar a mudança temporal da concentração de íons na solução, os dispositivos LAPS operaram no modo CC, em que a tensão externa foi controlada por um sistema de retroalimentação para manter a foto-corrente em um valor constante (47,51,52).

Para melhor entendimento e visualização do procedimento experimental de caracterização dos dispositivos, a figura 5.2 mostra o aparato experimental composto por célula eletroquímica + chip sensor acoplado + eletrodo de referência para caracterização elétrica dos dispositivos (a) EIS e (b) LAPS.

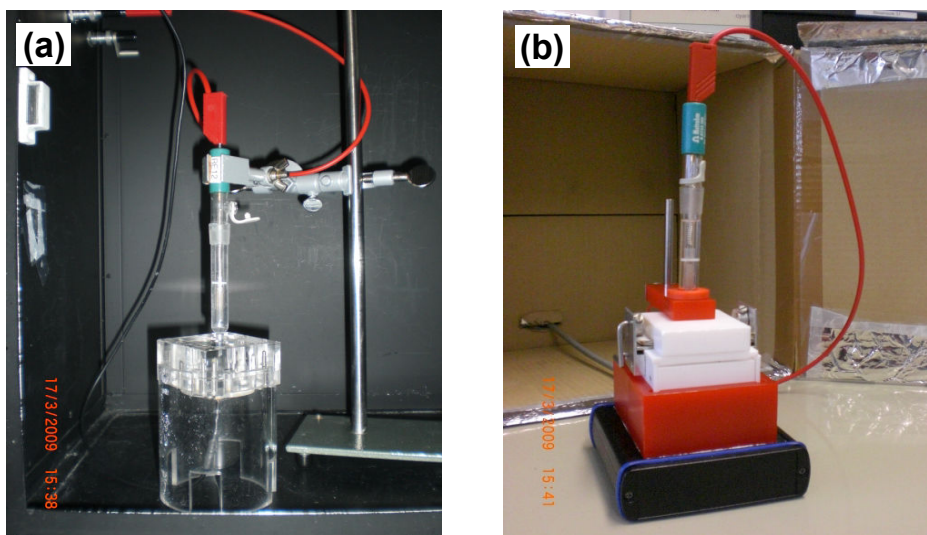


Figura 5.2 – Célula eletroquímica usada nas caracterizações do (a) sensor capacitivo EIS e do (b) sensor LAPS.

Capítulo 6

FILMES NANOESTRUTURADOS E ELETROATIVOS DE NANOTUBOS DE CARBONO E FTALOCIANINAS APLICADOS EM SENSORES DE DOPAMINA

Este estudo teve como objetivo fabricar e caracterizar filmes automontados de nanotubos multi-paredes (MWNTs) com o dendrímero PAMAM e a ftalocianina tetrassulfonada de níquel (NiTsPc). As ftalocianinas são moléculas macrocíclicas com alta estabilidade térmica e atividade redox bem definida, usadas em sensores, eletrodos para catálise, memória óptica, células fotovoltaicas e como agentes fotodinâmicos na terapia do câncer (53). Os filmes automontados de CNT e ftalocianinas foram usados como sensor eletroquímico do neurotransmissor dopamina (DA) com medidas de voltametria cíclica. Além disso, as interações moleculares e a morfologia do filme automontado foram estudadas em detalhe com medidas espectroscópicas e microscopia.

6.1 Caracterização espectroscópica e microscópica dos filmes

A arquitetura do filme automontado foi composta de MWNTs dispersos em solução de dendrímero (PAMAM-NT) e combinados com NiTsPc. As multicamadas desse filme foram monitoradas por espectros de UV-vis, analisando a solução aquosa de NiTsPc e dos filmes com 10 bicamadas de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc, conforme mostrado na figura 6.1. A intensa banda entre 600 e 700 nm é atribuída à absorção da banda Q da NiTsPc (53). O espectro da solução de NiTsPc apresenta um ombro em 660 nm relacionado às espécies monoméricas e uma intensa absorbância em 625 nm, característica de espécies diméricas (53). Entretanto, no espectro dos filmes automontados a banda em 660 nm não é observada, sugerindo que as moléculas de NiTsPc estão principalmente agregadas na forma dimérica. Além disso, observou-se um deslocamento para o azul de 5 nm em comparação com a solução de NiTsPc. Este último está relacionado

provavelmente com a formação de agregados do tipo H, que pode ser um indicativo de interações entre os materiais ou agregação das moléculas de NiTsPc (14,23,54). O encarte da Figura 5 mostra que a absorbância no pico (em 615 nm) aumenta exponencialmente, ao invés do crescimento linear relatado por Zucolotto *et al.* e Siqueira Jr. *et al.* em filmes automontados de polianilina/NiTsPc (55) e quitosana/NiTsPc (54), respectivamente. Este crescimento exponencial pode ser resultado da interpenetração da NiTsPc sobre as camadas de PAMAM-NT na formação do filme, como proposto por Picart *et al.* (56) e Garza *et al.* (57) para filmes automontados de polieletrólitos. Além disso, a adsorção mais intensa do filme PAMAM/NiTsPc comparado com o filme PAMAM-NT/NiTsPc de mesmo número de bicamadas pode ser atribuída à presença dos MWNTs que podem dificultar a adsorção da NiTsPc.

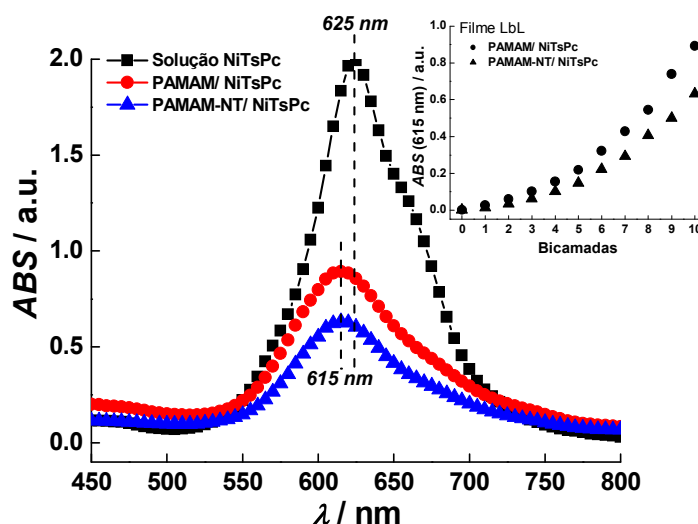


Figura 6.1 – Espectros eletrônicos da solução aquosa de NiTsPc e dos filmes de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc contendo 10 bicamadas. Encarte: Crescimento exponencial até a 10^a bicamada dos filmes PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc.

O crescimento e a formação dos filmes PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc também foram analisados por imagens de AFM em uma área de 1,0 μm x 1,0 μm , como mostrado na figura 6.2. A Tabela 6.1 indica que a formação do filme foi regular com espessuras similares para a primeira bicamada. No entanto, a rugosidade (RMS) do filme PAMAM-NT/NiTsPc foi aproximadamente o triplo, indicando que os MWNTs dispersos no PAMAM afetam a morfologia do filme automontado. As imagens de AFM mostraram que tanto a rugosidade quanto a espessura dos dois sistemas aumentaram com o número de bicamadas, especialmente para o filme

PAMAM-NT/NiTsPc (ver Tabela 6.1). Além disso, após cinco bicamadas, o filme PAMAM-NT/NiTsPc apresentou estruturas globulares grandes, entre 80 nm – 120 nm, resultado de coalescência.

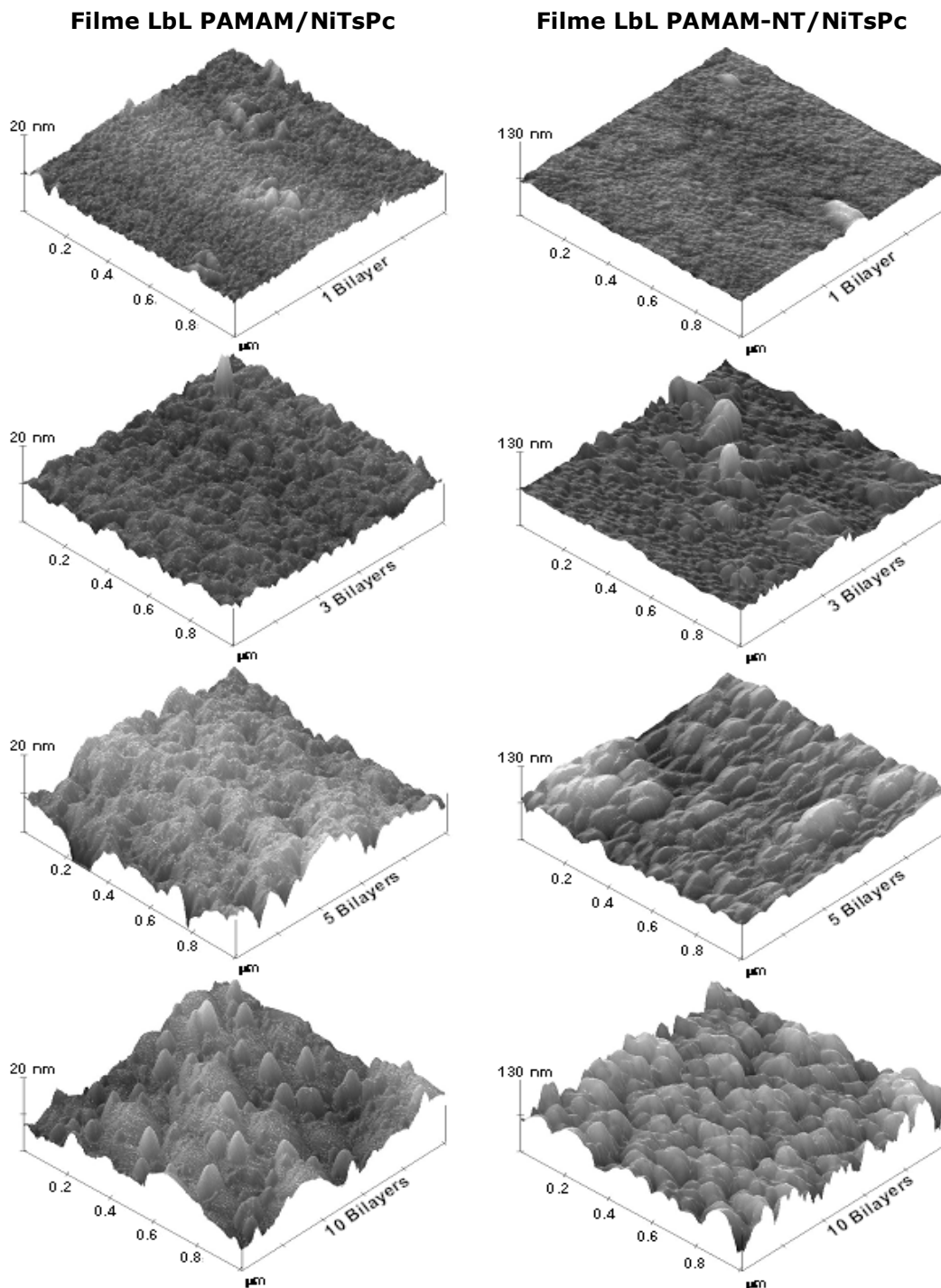


Figura 6.2 – Imagens de AFM dos filmes de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc contendo diferentes números de bicamadas. Note a diferença na escala do eixo Z dos filmes contendo MWNT.

Tabela 6.1 – Espessura e rugosidade dos filmes automontados.

Filme	Bicamadas	Espessura (nm)	Rugosidade RMS (nm)
PAMAM/ NiTsPc	1	1,4	1,6
	3	6,1	2,1
	5	8,8	4,5
	10	72,2	5,3
PAMAM-NT/ NiTsPc	1	1,5	4,1
	3	35,0	16,2
	5	35,5	16,8
	10	100,8	27,7

As interações entre os materiais que compõem o filme foram analisadas por espectros de FTIR, coletados no modo transmissão, de filmes automontados contendo 15 bicamadas de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc, além de espectros de filmes cast de PAMAM, PAMAM-NT e NiTsPc. Os espectros são mostrados na figura 6.3. Os espectros do PAMAM e PAMAM-NT possuem duas bandas em 1663 cm^{-1} e 1533 cm^{-1} atribuídas à amida I (estiramento C=O) e à amida II (deformação C–N) do PAMAM, respectivamente (58). Estas bandas também aparecem nos filmes automontados, confirmando a incorporação do dendrímero. A banda em 1089 cm^{-1} no espectro de PAMAM, atribuída ao estiramento C–N (58), foi deslocada para 1104 cm^{-1} no espectro de PAMAM-NT, que pode estar relacionado a uma mudança na orientação dos modos de vibração C–N devido à presença dos MWNTs. O espectro de PAMAM também mostra que a banda atribuída à deformação N–C=O (em 622 cm^{-1}) não foi observada no espectro de PAMAM-NT porque foi sobreposta por uma banda de maior intensidade em 610 cm^{-1} associada com a vibração C–C (59), indicando desta forma a imobilização dos MWNTs no dendrímero. O espectro de NiTsPc apresentou bandas em 1194 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento, que foram deslocadas para 1173 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} quando comparadas com os espectro de filmes automontados de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc. Em concordância com Zucolotto *et al.* (55,60) e Siqueira Jr. *et al.* (22,54), os deslocamentos são devidos às interações eletrostáticas entre os grupos SO_3^- da NiTsPc com os grupos NH_3^+ do PAMAM. Além disso, uma nova

banda (ausente no espectro de NiTsPc) surgiu nos espectros dos filmes automontados em 1059 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento C–N do PAMAM. Estas interações podem estar associadas com o contato íntimo dos componentes do filme na arquitetura automontada.

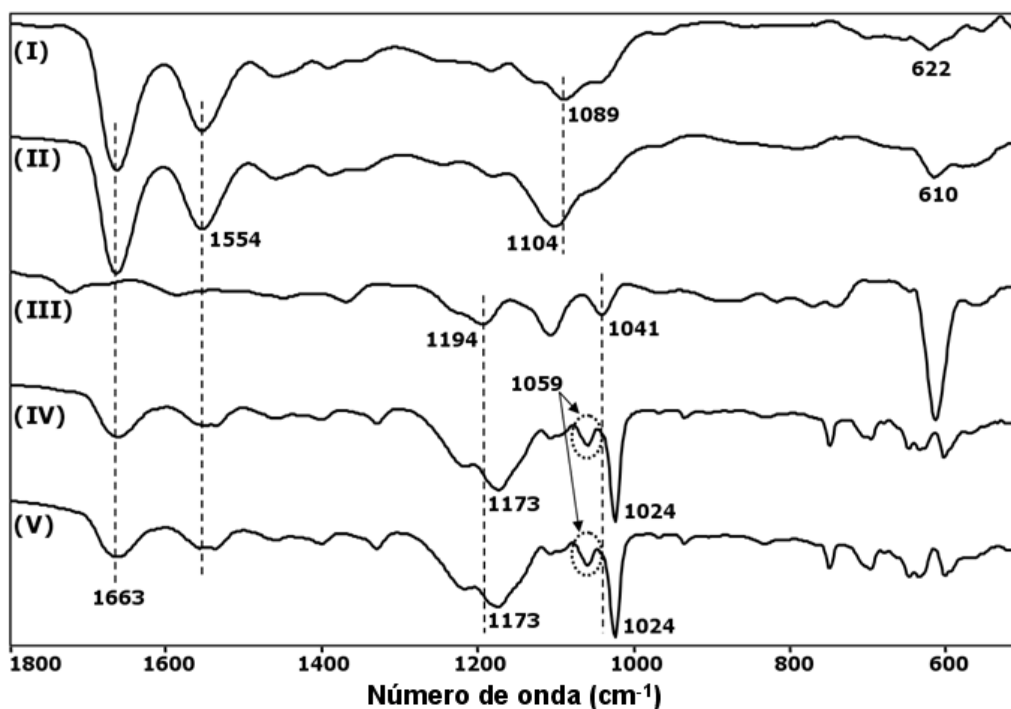


Figura 6.3 – Espectros de FTIR no modo transmissão de filmes cast de (I) PAMAM, (II) PAMAM-NT, (III) NiTsPc e dos filmes automontados contendo 15 bicamadas de (IV) PAMAM/NiTsPc e (V) PAMAM-NT/NiTsPc.

Experimentos de micro-Raman foram realizados em pó de MWNT e NiTsPc, filme cast de PAMAM-NT e filme automontado contendo 10 bicamadas de PAMAM-NT/PSS (PSS = poliestireno sulfonado) adicionado de uma bicamada de PAMAM-NT/NiTsPc. Os resultados da figura 6.4 mostram duas bandas em 1600 cm^{-1} e 1355 cm^{-1} , atribuídas à banda G e D, respectivamente, para o espectro de MWNT (61). No espectro de PAMAM-NT, a banda G foi deslocada para 1592 cm^{-1} , provavelmente porque as moléculas de PAMAM adsorveram na superfície do CNT, enquanto a banda D praticamente desapareceu. Como a banda D é atribuída a carbono amorfo e impurezas (61-63), o espectro indica o alto grau de pureza dos CNTs na solução de PAMAM após o processo de purificação (62,63). A adsorção dos CNTs no filme PAMAM-NT/NiTsPc não foi observada no espectro devido à grande quantidade de NiTsPc adsorvida no filme automontado que gerou um sinal intenso em 1554 cm^{-1} e 1377 cm^{-1} (ambos atribuídos ao estiramento pirrol). Por isso, para confirmar a

adsorção do CNT, foi preparado um filme automontado com 10 bicamadas de PAMAM-NT/PSS, sobre o qual foi depositada uma camada de NiTsPc. Desta forma, foi possível distinguir no espectro Raman as bandas atribuídas ao MWNT (banda G em 1592 cm^{-1}) e à NiTsPc (estiramento pirrol em 1556 cm^{-1}), como indicado no espectro IV da Figura 6.4.

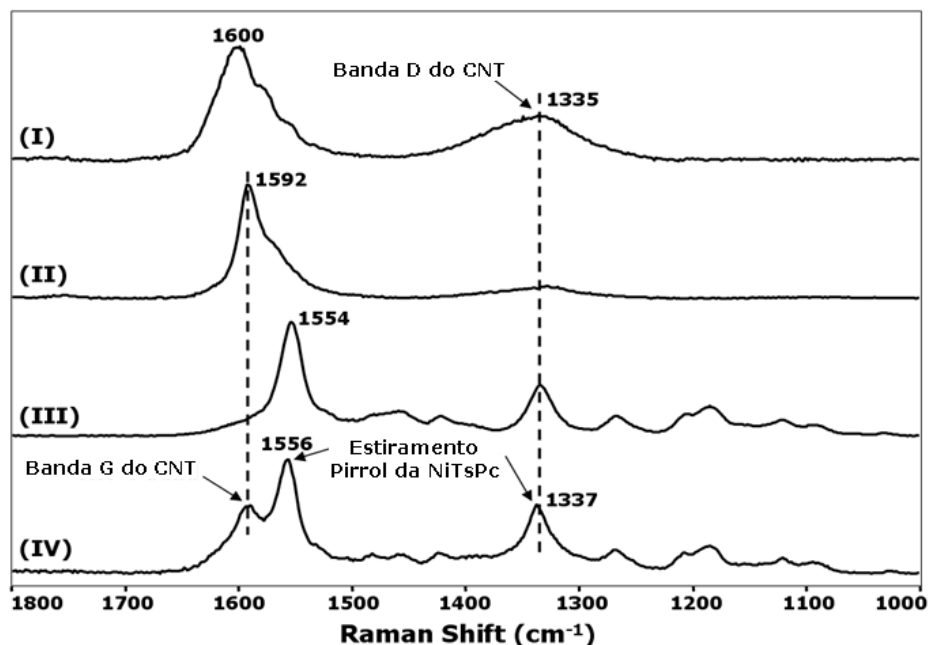


Figura 6.4 – Espectros de Raman obtidos com laser de 633 nm para (I) CNT em pó, (II) filme cast de PAMAM-NT, (III) NiTsPc em pó e (IV) filme automontado contendo 10 bicamadas de PAMAM-NT/ PSS + 1 bicamada de PAMAM-NT/NiTsPc.

6.2 Caracterização eletroquímica dos filmes automontados

A caracterização eletroquímica dos eletrodos de ITO modificados com filme automontado foi realizada por voltametria cíclica. A figura 6.5 mostra voltamogramas de filmes automontados com 3 bicamadas em diferentes velocidades de varredura de (a) PAMAM/NiTsPc e (b) PAMAM-NT/NiTsPc. Os dois filmes (eletrodos modificados) apresentaram eletroatividade bem definida e o mesmo par redox em 0,86 V e 0,87 V, atribuído ao processo eletroquímico da unidade Pc da NiTsPc $[\text{Ni(II)TsPc}^{4-}/\text{Ni(II)TsPc}^{6-}]$ (64). O mesmo processo redox foi observado em filmes automontados de quitosana/NiTsPc (54). O encarte da figura 6.5 mostra que as

correntes de pico anódica e catódica (I_{pa} e I_{pc}) aumentaram linearmente com a velocidade de varredura, indicando um processo controlado por transferência de carga (65-67). Além disso, os potenciais de pico redox foram os mesmos a diferentes velocidades de varredura para ambos os eletrodos, a diferença entre os potencial de pico anódico e catódico foi somente 10 mV e a razão entre a I_{pa} e I_{pc} foi 1,0. Estas características confirmam o caráter reversível destes filmes (68). No entanto, a presença da corrente de pico anódica próxima de 0,6 V pode estar relacionada ao processo irreversível $[Ni(II)TsPc^{6-}/Ni(II)TsPc^{5-}]$ – (não há processo catódico, além de o potencial anódico ser deslocado com a velocidade de varredura). A incorporação dos nanotubos nos filmes automontados gerou um aumento de 3 vezes nas correntes de pico do filme PAMAM-NT/NiTsPc, como mostrado na figura 6.6. Tal aumento pode ser devido a uma área de superfície eletroativa maior no filme PAMAM-NT/NiTsPc, com maior número de sítios redox disponíveis em razão da maior rugosidade comparada à do filme PAMAM/NiTsPc, conforme revelado por AFM. Em medidas de estabilidade, com 100 ciclos a 50 mV s^{-1} , observou-se que os dois eletrodos são estáveis, não havendo mudança na corrente de pico e no perfil do voltamograma após vários ciclos.

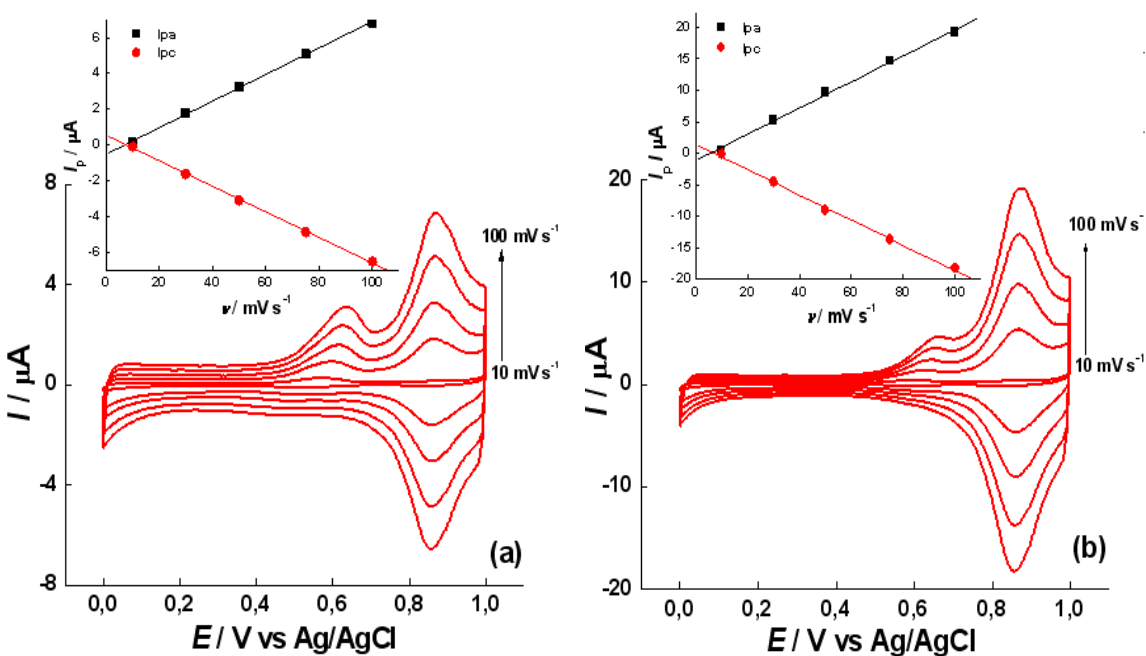


Figura 6.5 – Voltamogramas cíclicos dos filmes com 3 bicamadas de (a) PAMAM/NiTsPc e (b) PAMAM-NT/NiTsPc em diferentes velocidades de varredura. Encartes: Relação linear entre as correntes de pico anódica e catódica com a velocidade de varredura.

É importante ressaltar que o comportamento eletroquímico da NiTsPc em solução é completamente diferente dos filmes automontados. Nestes, os processos são irreversíveis e aparecem em potenciais mais positivos, o que é uma evidência de que a natureza nanoestruturada dos filmes automontados pode facilitar a transferência de carga da NiTsPc. Tal característica demonstra a vantagem em usar automontagem para o sistema proposto. Outras técnicas, tais como *casting* e *spin-coating*, foram usadas na preparação de filmes finos com os mesmos materiais (PAMAM, MWNT e NiTsPc). Estes filmes não foram estáveis sobre o substrato (ITO), pois apresentaram consideráveis perdas de material durante as caracterizações eletroquímicas.

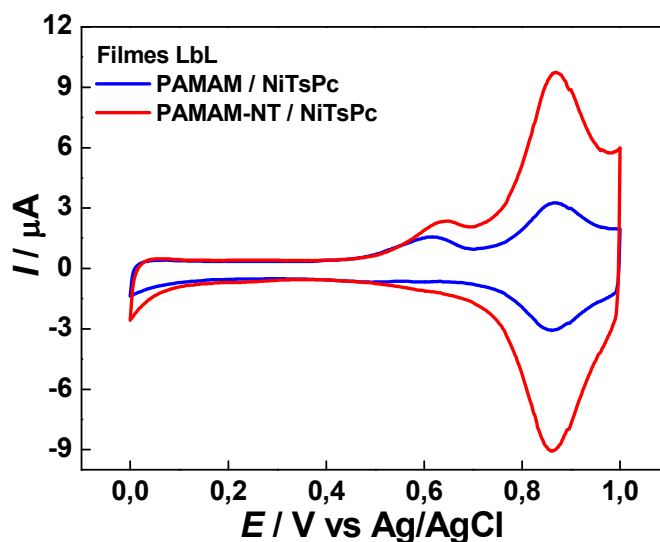


Figure 6.6 – Voltamogramas cíclicos dos filmes com 3 bicamadas de PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} . Note a diferença nas correntes de pico do filme contendo CNTs.

6.3 Propriedades electrocatalíticas dos filmes automontados na detecção de dopamina (DA)

Os eletrodos de ITO modificados com o filme automontado foram testados como elemento de sensor em compostos de interesse biológico. A figura 6.7 mostra voltamogramas cíclicos de filmes automontados com 3 bicamadas de (a) PAMAM/NiTsPc e (b) PAMAM-NT/NiTsPc na presença de diferentes concentrações

de DA, de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,25 \text{mmol L}^{-1}$. Em filmes de PAMAM/NiTsPc é observado um par redox, atribuído à oxidação e redução de dois elétrons, em que a dopamina é oxidada em dopaminoquinona (69). Entretanto, o filme PAMAM-NT/NiTsPc exibiu dois picos anódicos com intensidade crescente com a concentração e com a velocidade de varredura, sugerindo que o processo de oxidação de dois elétrons da DA ocorre separadamente. No filme PAMAM/NiTsPc, o processo redox irreversível da DA ocorre em $0,03 \text{V}$ e $0,80 \text{V}$, enquanto o mesmo processo no filme PAMAM-NT/NiTsPc foi deslocado para $0,14 \text{V}$ e $0,75 \text{V}$. Ou seja, os MWNTs acentuaram o processo redox e melhoraram as propriedades catalíticas da NiTsPc na detecção da dopamina. Nos dois tipos de eletrodos, a corrente de pico anódica aumentou linearmente com a concentração de DA, como mostram os encartes das Figuras 6.7a e 6.7.b. Essa dependência linear foi importante para determinar a curva de calibração de cada eletrodo modificado e calcular o limite de detecção (LD) para a DA, que foi $0,43 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,54 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os filmes PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc, respectivamente.

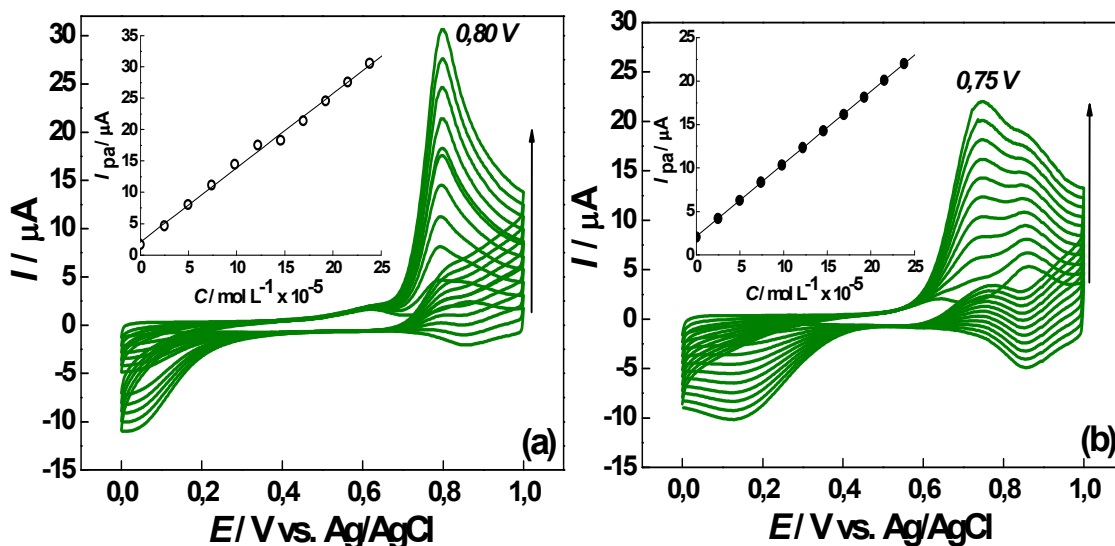


Figura 6.7 – Voltamogramas cíclicos dos filmes contendo 3 bicamadas de (a) PAMAM/NiTsPc e (b) PAMAM-NT/NiTsPc em diferentes concentrações de DA. Encartes: Curva de calibração. Velocidade de varredura: 50mV s^{-1} .

Os limites de detecção foram significativamente menores do que os relatados para filmes automontados na detecção de DA (Zucolotto *et al.* (55) e Siqueira Jr. *et al.* (54)). O limite de quantificação (LQ) para a DA também foi calculado, sendo $1,4$

$\mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ para os filmes PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc, respectivamente.

Para investigar a seletividade dos eletrodos na presença de interferentes, diferentes concentrações de DA foram adicionadas em solução de $0,24 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido ascórbico (AA). Como os potenciais de oxidação da DA e do AA são similares, não foi possível distinguir os analitos usando o filme PAMAM/NiTsPc. No entanto, o filme PAMAM-NT/NiTsPc apresentou um comportamento seletivo, sendo possível distinguir os sinais entre a DA ($0,75 \text{ V}$) e o AA ($0,85 \text{ V}$) na mesma proporção, como mostrado na Figura 6.8. Provavelmente a seletividade exibida no filme contendo nanotubos está relacionada ao efeito eletrocatalítico mencionado na detecção de DA com esses eletrodos, como mostrado na Figura 6.6b. Para facilitar a análise, os potenciais de pico anódico (E_{pa}) da DA e do AA para ambos os eletrodos estão resumidos na Tabela 6.2.

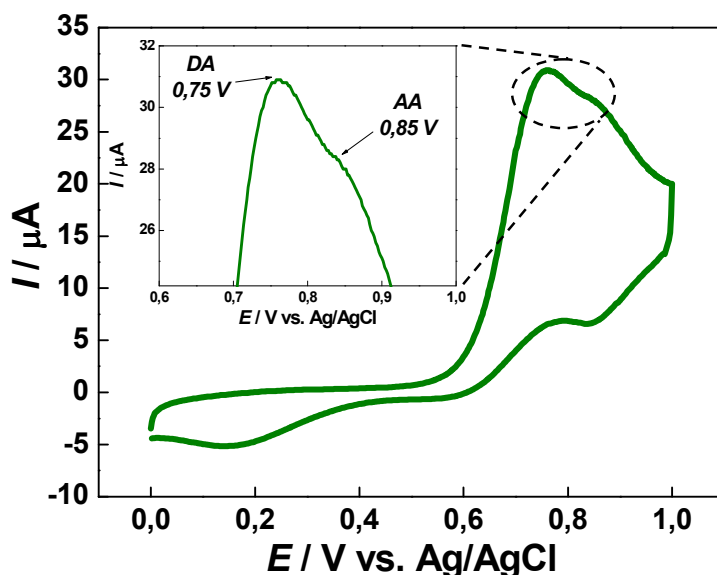


Figura 6.8 – Voltamograma cíclico da detecção simultânea de DA e AA na mesma proporção ($0,24 \text{ mmol L}^{-1}$) para o filme PAMAM-NT/NiTsPc contendo 3 bicamadas. Velocidade de varredura: 50 mV s^{-1} .

Tabela 6.2 – Potencial de detecção (pico anódico) da DA e do AA usando os eletrodos PAMAM/NiTsPc e PAMAM-NT/NiTsPc LbL.

Eletrodo	DA – E_{pa} (V)	AA – E_{pa} (V)
PAMAM/ NiTsPc	0,80	0,85
PAMAM-NT/ NiTsPc	0,75	0,85

O desempenho de sensores e biossensores que utilizam filmes orgânicos varia consideravelmente de acordo com as características do filme, o que requer um estudo sistemático para otimizar as condições de fabricação. Em filmes automontados, muitas variáveis afetam as propriedades dos filmes, tais como o tempo de deposição, número de bicamadas, concentração do analito detectado, entre outros. Para minimizar o tempo de preparação e análise dos filmes, usamos um planejamento fatorial (70) – como prova conceitual – para avaliar a influência da concentração de DA e do número de bicamadas (variáveis independentes) durante a detecção de DA. Uma das vantagens deste método é obter uma informação valiosa através da realização de um número reduzido de experimentos. O parâmetro considerado indicativo da sensibilidade foi o pico de corrente do primeiro processo anódico da oxidação da DA a 10 mV s^{-1} . Os resultados do planejamento fatorial 2^2 para os sistema PAMAM-NT/NiTsPc foram analisados através da metodologia da superfície de resposta (RSM) como mostrado na Figura 6.9. Tanto a concentração de DA como o número de bicamadas são variáveis que afetam a detecção de DA; entretanto, não há interação entre elas, pois o efeito calculado foi insignificante. A concentração de DA foi a variável mais significativa, enquanto o número de bicamadas levou (em termos de corrente de pico) a uma modesta melhoria na detecção de DA devido ao aumento da superfície do filme. Contudo, o aumento do número de bicamadas tende a aumentar o sinal de fundo (corrente capacitiva), que não é desejado. Logo, para reduzir a corrente de fundo e obter menores limites de detecção, a recomendação baseada nos resultados do planejamento fatorial é usar filmes automontados com poucas bicamadas em aplicações futuras como elemento de sensor.

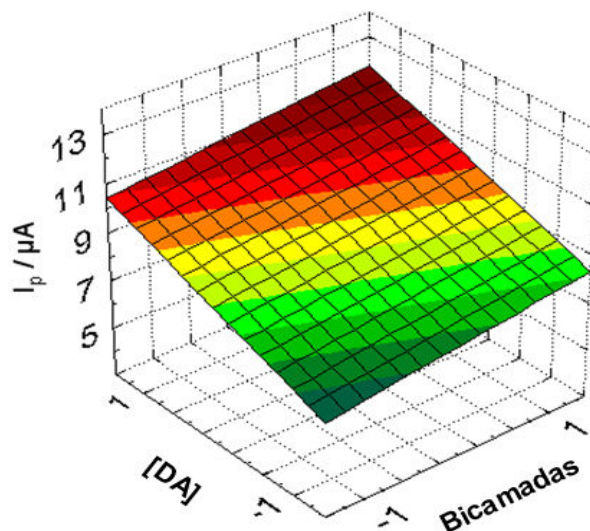


Figura 6.9 – Superfície de resposta gerada pelo planejamento fatorial na detecção de dopamina usando o filme automontado PAMAM-NT/NiTsPc.

Pode-se concluir que os filmes automontados contendo MWNTs e NiTsPc foram caracterizados por fortes interações devido ao contato íntimo entre os componentes. A incorporação do complexo PAMAM-NT nos filmes acentuou o processo redox da NiTsPc e melhorou a atividade catalítica para detectar dopamina, gerando eletrodos modificados com alta eletroatividade, sensibilidade e seletividade na presença de ácido ascórbico. Como resultado do planejamento fatorial, inferimos que para obter corrente de fundo e alcançar limites de detecção menores, o ideal é empregar filmes automontados com poucas bicamadas.

Capítulo 7

DISPOSITIVOS DE EFEITO DE CAMPO FUNCIONALIZADOS COM FILME AUTOMONTADO DE NANOTUBOS DE CARBONO

Neste estudo, dispositivos de efeito de campo (FEDs) de plataforma capacitiva *electrolyte-insulator-semiconductor* (EIS) foram recobertos com filmes automontados contendo nanotubos de carbono do tipo *single-walled* (SWNTs) e PAMAM. A influência dos SWNTs incorporados nestes dispositivos foi analisada por caracterizações elétricas e microscópicas. Com a imobilização da enzima penicilinase sobre os EIS modificados (EIS-NT), foram obtidos biossensores para detectar penicilina G. Os efeitos da incorporação de SWNTs nas propriedades deste modelo de biossensor foram analisados, comparando-os com dois outros tipos de sensores: o EIS puro (sem modificação por filme) e o EIS modificado com filme automontado de polieletrólitos PAMAM/PSS (poliestireno sulfonado).

7.1 Caracterização elétrica dos filmes

Através dos FEDs, em particular usando o sistema EIS, pode-se monitorar a formação das multicamadas automontadas e controlar as arquiteturas e propriedades do filme. Há a vantagem adicional de poder identificar as contribuições de cada camada adsorvida do filme no sinal do sensor (45,48-50). A figura 7.1 mostra curvas C/V para o sensor EIS (p-Si-SiO₂-Ta₂O₅) recoberto com multicamadas de PAMAM/SWNT em pH 7 (7.1a), e uma ampliação na região de depleção com ponto de trabalho de 30 nF (7.1b). A adsorção de cada camada de PAMAM e SWNT, respectivamente, causou um deslocamento nas curvas C/V ao longo do eixo de tensão.

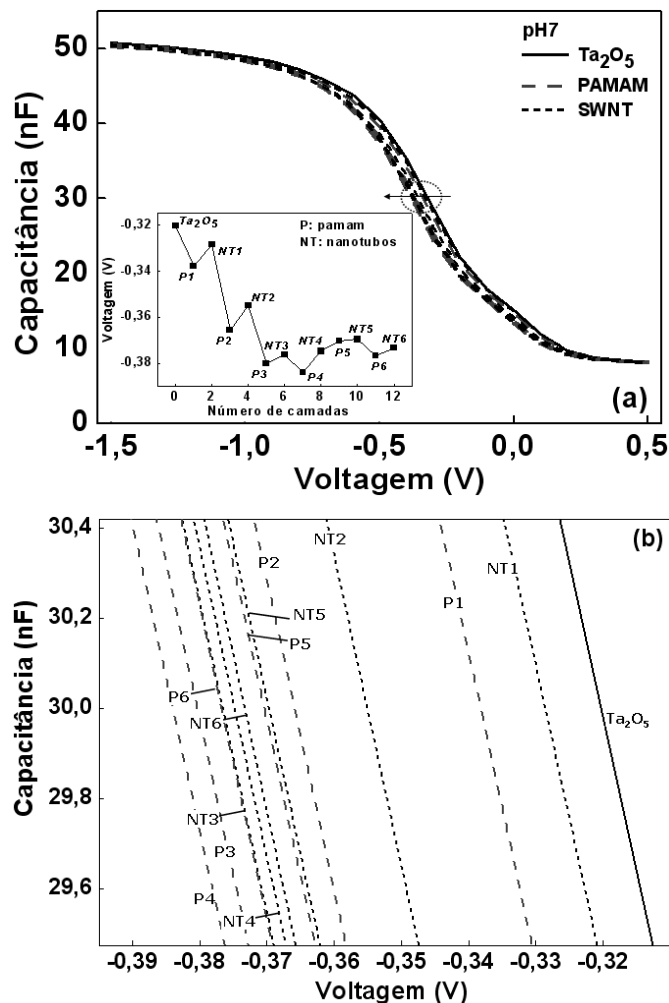


Figura 7.1 – Curvas C/V (a) do sensor EIS ($p\text{-Si-SiO}_2\text{-Ta}_2\text{O}_5$) funcionalizado com multicamadas de PAMAM/SWNT obtidas em solução tampão pH 7 e ampliação (b) da área de depleção com ponto de trabalho em 30 nF. Encarte: valores do deslocamento de potencial das curvas C/V em função do número de camadas adsorvidas de PAMAM e SWNT. Frequência: 50 Hz.

O potencial é deslocado devido à carga da camada adsorvida e à diferença de potencial entre a interface sólido/líquido. A capacitância na região de acumulação se altera por causa da capacitância adicional do filme em série com a capacitância geométrica da estrutura EIS pura (45,48-50). O encarte da figura 7.1a mostra os deslocamentos de potencial para cada curva C/V em função do número de camadas adsorvidas de PAMAM e SWNT. Os pontos P3 e P4 representam os menores potenciais após adsorção das camadas de PAMAM. O mesmo foi observado nas camadas de nanotubos (NT3 e NT4), conforme mostrado em detalhe na figura 7.1b. Após estes valores, as camadas subsequentes apontaram para uma saturação,

indicando que o máximo de multicamadas que podem ser detectadas está entre 3 e 4.

Ressalte-se que a direção dos deslocamentos de potencial depende do sinal da carga da última camada adsorvida. Isso indica que as moléculas carregadas positivamente de dendrímeros e os SWNTs carregados negativamente podem induzir uma mudança de potencial interfacial, que resulta na mudança da tensão de *flat-band* da estrutura EIS. Além disso, efeitos de carga e potencial causados pela redistribuição de íons nas multicamadas porosas podem causar deslocamentos nas curvas C/V (48-50). O deslocamento de potencial tende a diminuir com o aumento do número das camadas de PAMAM/SWNT. Efeitos similares foram relatados por Poghossian *et al.* em estruturas EIS de p-Si-SiO₂ e p-Si-SiO₂-nanocristais de diamante funcionalizados com filmes automontados de PAH/PSS (71). Esses resultados demonstram que tal caracterização pode ser utilizada em outros materiais carregados que não absorvem luz no espectro do UV-vis, cujo monitoramento é usualmente difícil.

Outro ponto a ser enfatizado diz respeito aos materiais empregados nos filmes. Estes foram produzidos com materiais carregados, cujas propriedades dependem do pH. Uma argumentação seria se a dependência intrínseca ao pH poderia “mascarar” os resultados nos experimentos de detecção. Tal influência não ocorre porque ambos PAMAM e SWNT-COOH podem ser considerados eletrólitos “fracos” com um grau de ionização variando com o pH, que afeta a adsorção dos filmes automontados. Esta é a razão pelo qual utilizamos pHs 4 e 8 na preparação das soluções de PAMAM e SWNTs, respectivamente, para assegurar que ambas estivessem carregadas para promover uma interação eletrostática eficiente durante a adsorção das camadas do filme. No entanto, após deposição do filme PAMAM/SWNTs sobre os FEDs, não deve haver muitos grupos amina e carboxílicos livres para interagir dentro das multicamadas. As cargas são compensadas através das interações eletrostáticas, que devem ser estáveis no intervalo de pH empregado, pois em caso contrário os filmes se dissolveriam. Com tal estabilidade, não se espera que as propriedades do filme sejam afetadas de maneira a causar resultados espúrios nas medidas em virtude de alterações no pH durante os experimentos de detecção.

7.2 Caracterização microscópica dos filmes

A superfície modificada do sensor capacitivo EIS pelos filmes automontados de PAMAM/SWNT e PAMAM/PSS foi caracterizada por técnicas microscópicas de FESEM e AFM. As figuras 7.2a e 7.2b mostram imagens de FESEM e AFM, respectivamente, ilustrando a superfície do filme PAMAM/SWNT contendo 5 bicamadas. Há um denso nanofilme com feixes de SWNTs cobrindo toda a superfície do sensor EIS. Além disso, o filme apresentou alta porosidade devido à interpenetração dos feixes de nanotubos nas camadas de dendrímero, como pode ser visto na imagem de secção transversal de FESEM da figura 7.2a. A estrutura porosa é desejada, pois pode atuar como canais para condução de íons. Isso pode gerar sensores baseados em FEDs com propriedades melhoradas, tais como rápido tempo de resposta, sinal estável e maior sensibilidade. A espessura e a rugosidade (RMS) do filme foram 32-35 nm e 7-8 nm, respectivamente. São valores cerca de 10 vezes os observados para o filme automontado de PAMAM/PSS com o mesmo número de bicamadas, também apresentado na figura 7.2c. Essa diferença demonstra o forte efeito dos SWNTs na morfologia dos filmes, através do aumento da área de contato superficial e que pode afetar as propriedades dos sensores.

Deve-se enfatizar que uma vez formado, o filme automontado é muito estável na superfície do sensor EIS, mesmo após ser submetido a vários processos de limpeza em soluções aquosas com pHs distintos. O mesmo não se observou para filmes *cast* contendo somente SWNTs. Este apresentou uma distribuição densamente agregada e não homogênea do material, sem controle da espessura e com pouca estabilidade sobre o chip. Tal contraste de propriedades demonstra a adequação da técnica de automontagem na manipulação de nanotubos de carbono em filmes nanoestruturados.

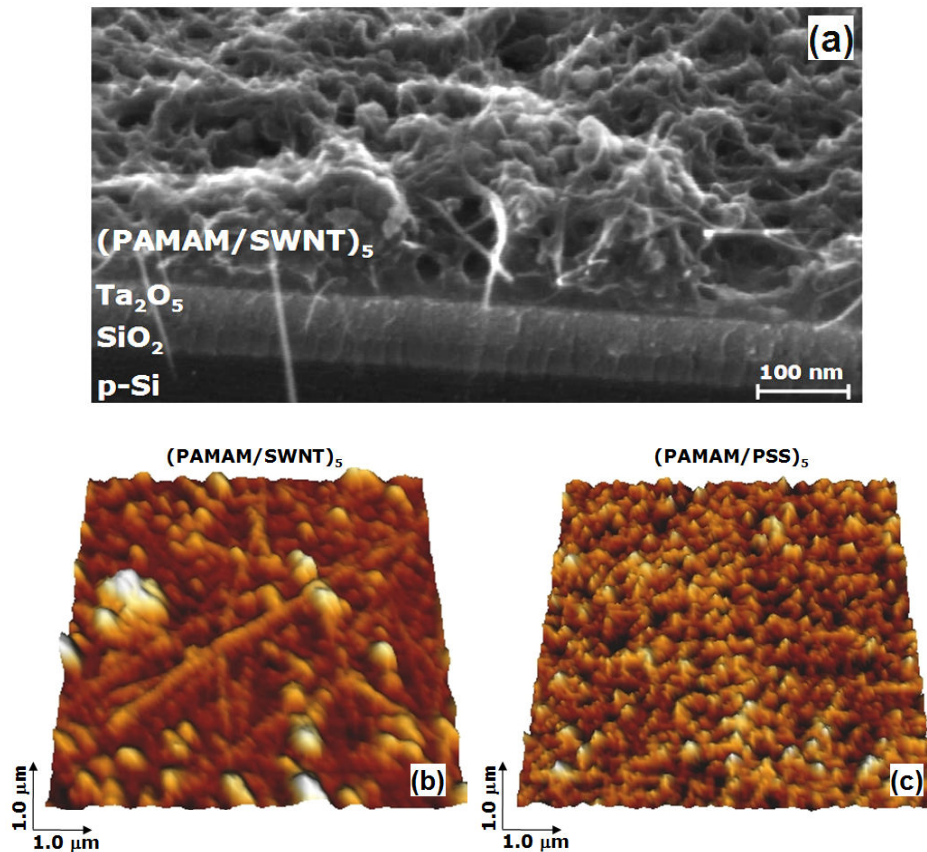


Figura 7.2 – Imagens de (a) FESEM e AFM dos sensores EIS funcionalizados com filmes automontados com 5 bicamadas de (b) PAMAM/SWNT e (c) PAMAM/PSS.

7.3 Biossensor de Penicilina

A Penicilina G é um antibiótico usado para fins veterinários na prevenção e tratamento de infecção por bactérias. Por outro lado, resíduos de penicilina em alimentos, como leites e carnes, podem ser prejudiciais em seres humanos, causando reações alérgicas (46,72-74). A estratégia empregada para preparar um biossensor de efeito de campo de penicilina foi imobilizar a enzima penicilinase via adsorção física sobre os três sensores EIS propostos. O princípio de operação deste biossensor baseia-se na detecção de variações da concentração de íons H^+ resultantes da hidrólise da penicilina em ácido penicilóico catalisada pela enzima penicilinase (46,72-74), cuja reação é mostrada esquematicamente na figura 7.3, assim como a montagem do sensor EIS-NT.

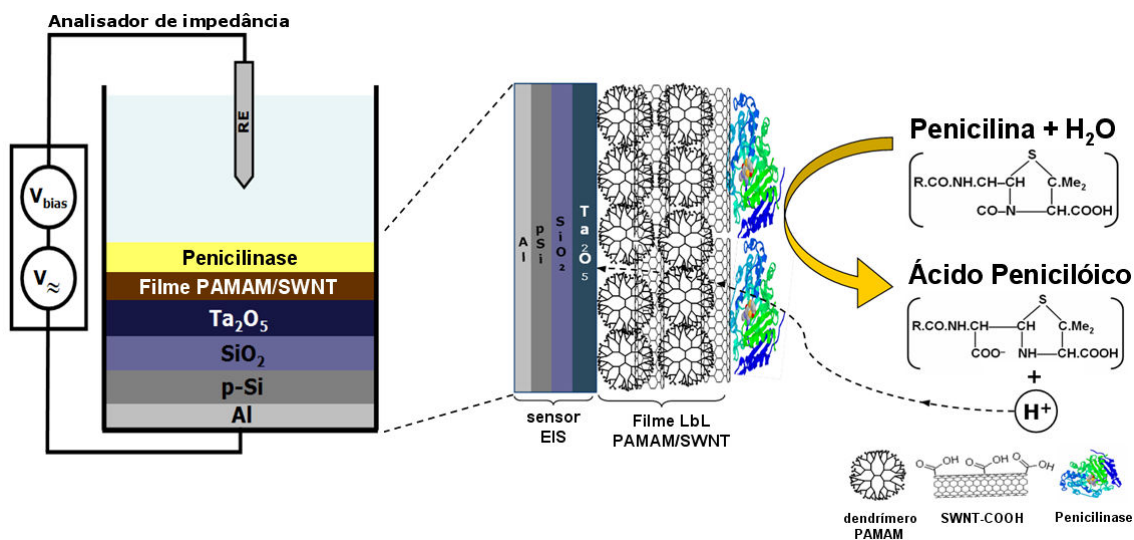


Figura 7.3 – Representação esquemática do princípio de operação do biossensor de penicilina EIS funcionalizado com filme PAMAM/SWNT.

Antes da etapa de imobilização da enzima, foi analisada a sensibilidade ao pH dos sensores EIS. A figura 7.4a apresenta curvas C/V, enquanto a figura 7.4b mostra as medidas ConCap para um sensor EIS-NT de 3 bicamadas obtidas sobre diferentes faixas de pH, de 3 a 10. Comparando com a sensibilidade ao pH do Ta₂O₅ (ca. 55-58 mV/pH) (72,73), a presença do filme PAMAM/SWNT não afetou significativamente a sensibilidade do sensor EIS, sendo de 55 mV/pH. Isso pode ser explicado pela grande porosidade do filme com a interconexão de redes de nanotubos orientados de forma aleatória nas camadas poliméricas de dendrímero, mostrada na figura 7.2a, que permite penetração dos íons H⁺ através do filme até alcançar a superfície do Ta₂O₅. Uma sensibilidade ao pH similar também foi observada para o sensor EIS com filme PAMAM/PSS (EIS-PE). Neste caso, porém, a sensibilidade pode ser atribuída à menor espessura do filme, que é dez vezes menor do que para o filme PAMAM/SWNT com o mesmo número de bicamadas. O mesmo experimento realizado no modo ConCap também revelou que o sensor EIS-NT possui rápido tempo de resposta, boa estabilidade para cada pH e pequena histerese (ca. 4 mV), conforme mostrado na figura 7.4b.

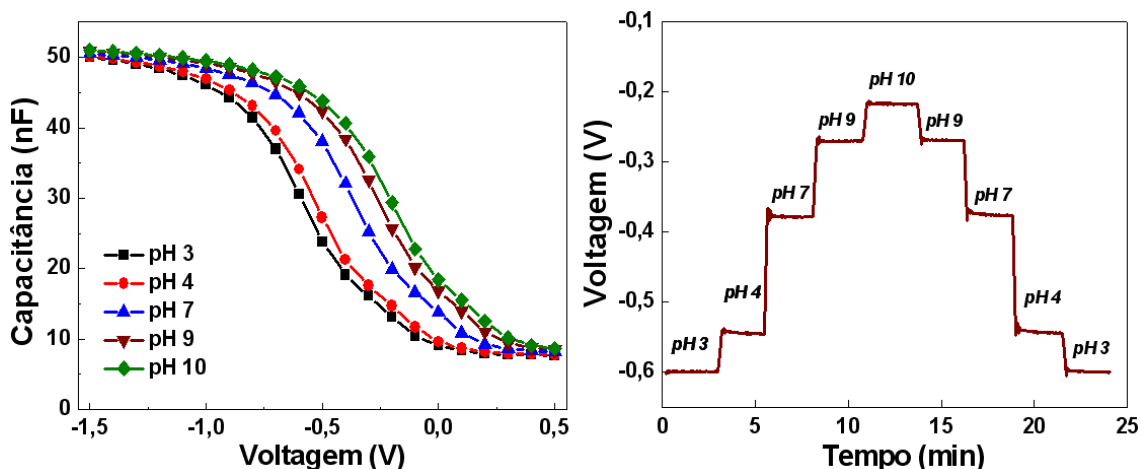


Figura 7.4 – Curvas C/V (a) e resposta Concap (b) em diferentes valores de pH para um sensor capacitivo EIS funcionalizado com 5 bicamadas de PAMAM/SWNT. Frequência: 50 Hz.

Após imobilização da penicilinase sobre os três sensores EIS, EIS-PE e EIS-NT, experimentos de detecção com concentrações de penicilina de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram realizados. A figura 7.5 apresenta curvas C/V, onde a tensão da *flat-band* foi deslocada para potenciais menores (área aumentada no encarte) com o aumento da concentração do analito. Isso indica uma maior concentração de íons H^+ na superfície do sensor devido à reação enzimática. Mencione-se que essas medidas também foram realizadas para o sensor EIS e EIS-PE.

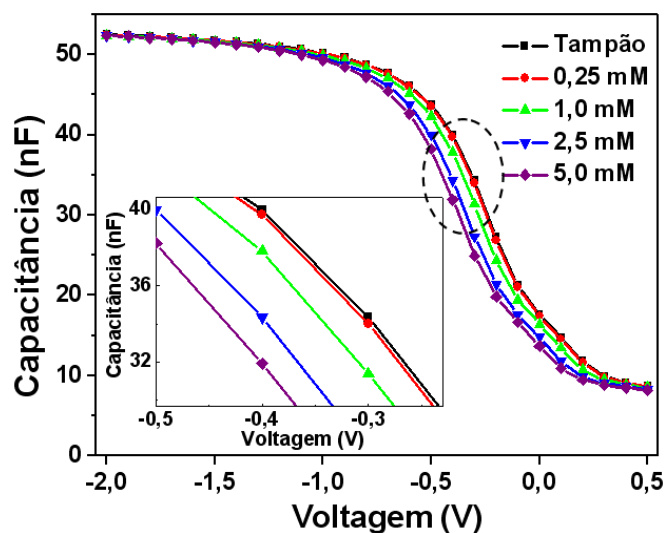


Figura 7.5 – Curvas C/V em diferentes concentrações de penicilina para o sensor EIS-NT. Frequência: 50 Hz.

Para investigar em detalhe as propriedades e desempenho dos biossensores modificados EIS, medidas no modo ConCap foram realizadas numa larga faixa de concentrações de penicilina, de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 25 mmol L^{-1} . A figura 7.6 mostra a resposta dinâmica de concentrações de penicilina para o sensor (a) EIS puro, (b) EIS-PE e (c) EIS-NT, além de suas respectivas (d) curvas de calibração. As respostas ao aumento na concentração de íons H^+ proveniente da reação enzimática constituíram mudanças na área de potencial de depleção a um ponto de trabalho de $32,5 \text{ nF}$. Como esperado, o sensor EIS puro com o Ta_2O_5 como camada sensível (6) e o sensor EIS-PE apresentaram boa sensibilidade para diferentes concentrações de penicilina. Contudo, o sensor EIS-NT apresentou maior sensibilidade e melhor desempenho.

No EIS puro, mostrado na figura 7.6a, o *drift* do sinal e o tempo de resposta aumentaram (maior que 5 min) após detecção de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto o sensor EIS-PE, mostrado na figura 7.6b, o mesmo ocorreu após detecção de 10 mmol L^{-1} . Além disso, a resposta para esses sensores mostra saturação para concentrações acima de 10 mmol L^{-1} . Em contrapartida, a figura 7.6c mostra que para o EIS-NT, o tempo de resposta permanece constante (menor que 5 min), seguido de um pequeno *drift* de sinal até a concentração de 25 mmol L^{-1} e não houve indício de saturação para a faixa de concentrações analisadas. Isso permitiu uma região linear de detecção mais ampla. De $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 25 mmol L^{-1} , a sensibilidade à penicilina do sensor EIS-NT foi melhorada para 100 mV/década , enquanto que na mesma faixa de concentração os sensores EIS e EIS-PE apresentaram 83 e 81 mV/década , respectivamente. Considerando a “melhor” faixa linear de detecção em comum para os três sensores, de $0,5$ a 10 mmol L^{-1} , a sensibilidade do sensor EIS-NT foi 116 mV/década , enquanto que para os sensores EIS e EIS-PE os valores foram 100 e 98 mV/década , respectivamente, conforme indicado nas curvas de calibração da figura 7.6d. Ou seja, o filme automontado de SWNT incorporado na estrutura EIS aumentou a sensibilidade do biossensor de penicilina.

A influência dos SWNTs no desempenho dos sensores também foi observada em baixas concentrações, de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, como mostrado nos encartes das figuras 7.6a-c. Nesta faixa de concentração, o potencial foi o mesmo para as três primeiras soluções de penicilina, começando a decrescer após $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de penicilina para o EIS puro. O mesmo foi observado para o EIS-PE. Por

outro lado, um pequeno decréscimo do potencial ocorreu para o EIS-NT já entre as duas primeiras e mais diluídas soluções de penicilina. Embora essa variação de potencial nesta faixa de concentrações seja pequena, a sensibilidade à penicilina e a resposta foram melhores do que para os outros dois sensores sem nanotubos. Isso indica que a presença dos SWNTs no sensor também melhora a sensibilidade à penicilina em baixas concentrações.

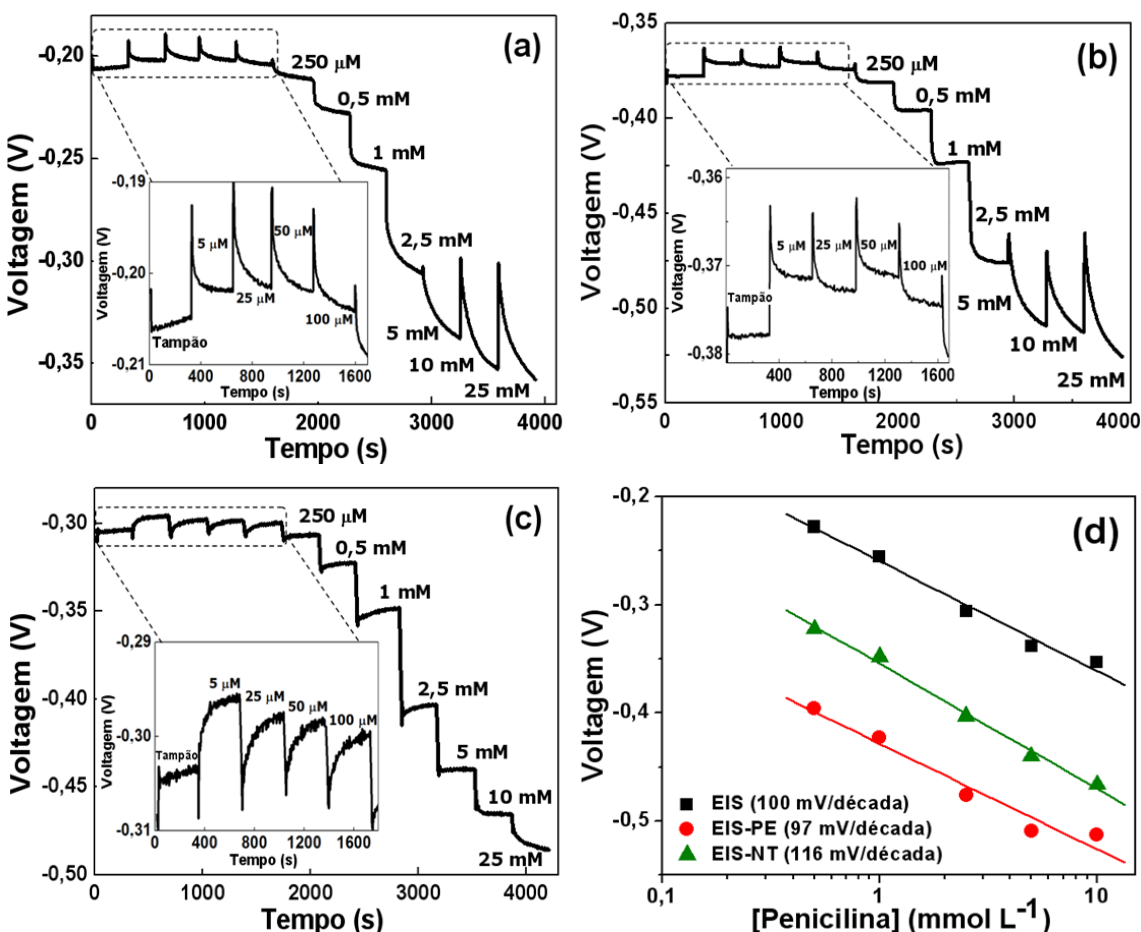


Figura 7.6 – Resposta ConCap para diferentes concentrações de penicilina para os sensores (a) EIS puro, (b) EIS-PE e (c) EIS-NT e suas (d) curvas de calibração. Encartes: Amplificação da região contendo sinais de resposta para baixas concentrações de penicilina.

Uma comparação desses resultados pode ser feita com trabalhos similares da literatura. Abouzar *et al.* produziram biossensor de penicilina com um sensor capacitivo de estrutura *electrolyte-diamond-insulator-semiconductor* (EDIS) com sensibilidade de ca. 60-70 mV/década, sensibilidade ao pH de ca. 40 mV/pH e limite de detecção entre 5-25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (75). Um biossensor de penicilina amperométrico e

outro EnFET, relatados respectivamente por Stred'anský *et al.* e Lee *et al.*, apresentaram limite de detecção de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, sensibilidade de $48 \text{ mV}/\text{mmol L}^{-1}$ e tempo de resposta entre 0,5-3 min (75-77). Os biossensores EIS-NT apresentados aqui exibiram maior sensibilidade e estabilidade, além de menor tempo de resposta do sinal. Estas características são atribuídas a toda estrutura do sensor EIS-NT (p-Si-SiO₂-Ta₂O₅-(PAMAM/SWNT)₃).

A estabilidade e a reprodutibilidade do biossensor EIS-NT foram observadas após serem armazenados por duas semanas, apresentando ainda alta sensibilidade. A sensibilidade caiu pela metade após um mês, seguida pela perda da estabilidade do sinal. Também é importante ressaltar a seletividade desse biossensor na detecção de penicilina. Foram usadas soluções de 50 mmol L^{-1} de glicose e de tampão polymix, intercalados com as soluções de penicilina, que não ocasionaram mudanças no sinal.

Uma possível explicação para a maior sensibilidade e melhor desempenho dos biossensores de penicilina, induzidos pelos SWNTs, pode estar relacionada à arquitetura dos filmes. O contato íntimo entre os dendrímeros e a densa rede de feixes de SWNTs levou a multicamadas estáveis com alto grau de interconexão dos nanotubos, conforme mostrado na figura 7.2a. Isso aumentou a porosidade do filme, permitindo maior penetração dos íons H⁺ provenientes da reação enzimática para a superfície do Ta₂O₅. Em outras palavras, o filme automontado PAMAM/SWNT atuou como nanomembrana porosa com grande área superficial, permitindo melhor distribuição e imobilização de uma quantidade maior da enzima, facilitando a penetração dos íons H⁺ através do filme. Simultaneamente, as moléculas do tampão são impedidas de “neutralizar” os íons H⁺ livres localizados do nanofilme.

A maior quantidade de penicilinase imobilizada foi confirmada por imagens de FESEM e AFM, como mostrado na figura 7.7, comparando os sensores (a) EIS e (b) EIS-NT, ambos contendo a enzima adsorvida sobre suas superfícies. As imagens de FESEM possuem mesma ampliação de 10 mil vezes, enquanto as de AFM possuem áreas de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$. O sensor EIS-NT exibiu uma quantidade maior de enzima homogeneamente distribuída, uma diferença que pode explicar os efeitos da arquitetura dos filmes contendo SWNTs nas propriedades do biossensor.

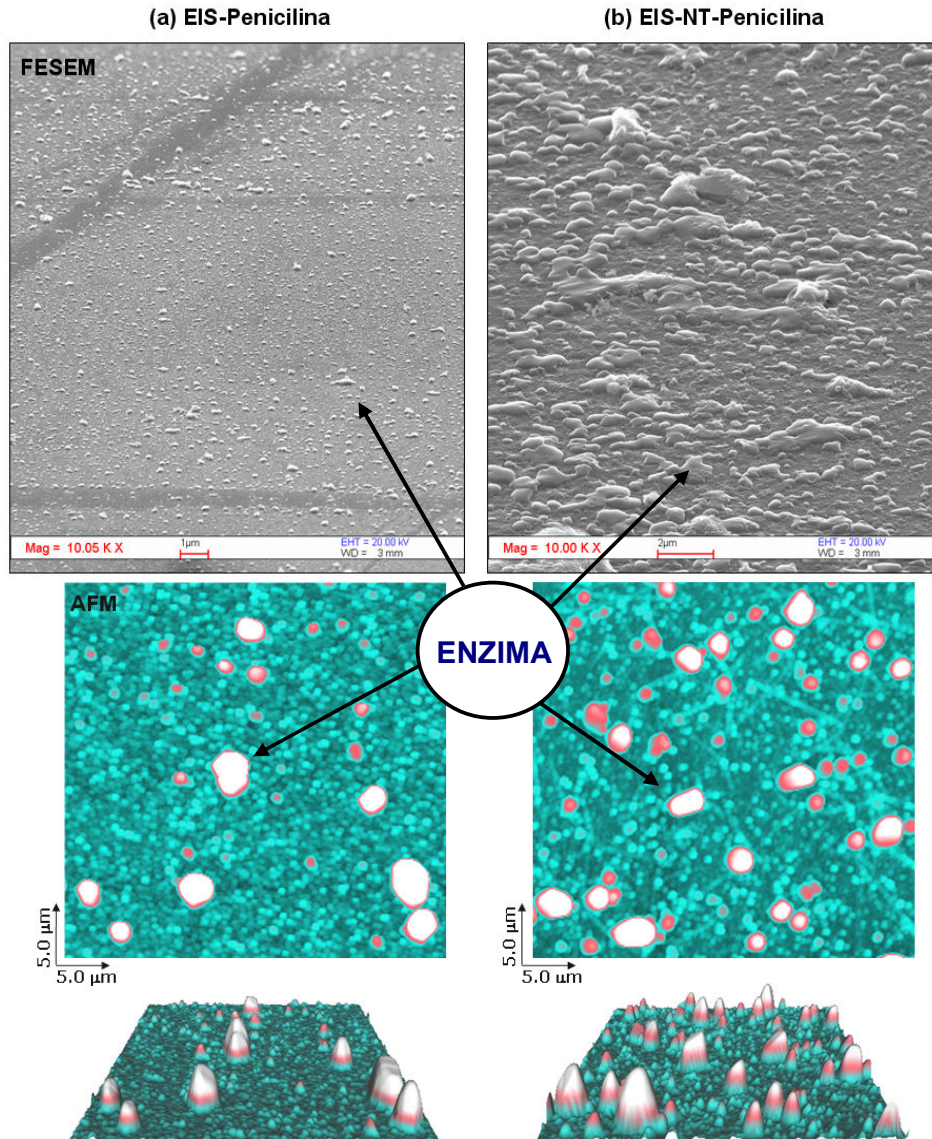


Figura 7.7 – Imagens de FESEM (mesma ampliação de 10.000 vezes) e AFM (de cima e 3D) dos biossensores (a) EIS e (b) EIS-NT, contendo a enzima penicilinase imobilizada.

Portanto, podemos inferir que a combinação de nanotubos de carbono e dendrímeros levaram à formação de uma estrutura apropriada para imobilização de enzimas. Além disso, a incorporação dos filmes nanoestruturados contendo SWNTs melhorou as propriedades do sensor EIS para a detecção de penicilina, tornando-o mais sensível e com melhor desempenho ao apresentar menor tempo de resposta e maior estabilidade. Os resultados mostraram que a modificação deste tipo de sensor com filmes nanoestruturados pode ser viável no estudo e na obtenção de novos tipos de biossensores enzimáticos com propriedades melhoradas.

Capítulo 8

FILME AUTOMONTADO DE NANOTUBOS DE CARBONO INCORPORADOS EM *LIGHT-ADDRESSABLE POTENTIOMETRIC SENSORS*

Este capítulo descreve a mesma metodologia empregada no capítulo anterior, porém utilizando outra plataforma FED promissora para fabricar múltiplos sensores em um único chip, o *Light-Addressable Potentiometric Sensors* (LAPS). Assim como no caso do EIS, esse sensor foi modificado com filme automontado de PAMAM/SWNT (LAPS-NT) e a influência dos nanotubos incorporados neste dispositivo foi analisada com medidas de fotocorrente. Diferentemente do sensor EIS, neste sistema foi realizado um estudo mais detalhado da morfologia do filme, de forma a demonstrar com maior exatidão a sua influência nas mudanças do sinal do sensor. O LAPS-NT também foi empregado como biossensor de penicilina G, com a imobilização da enzima penicilinase. Além das medidas características de detecção, empregamos métodos de visualização para tratamento dos dados e para eliminar o fenômeno de *cross talk* entre as unidades de sensor que continham enzima daquelas que não continham.

8.1 Monitorando a adsorção das multicamadas usando LAPS

A formação das camadas do filme PAMAM/SWNT foi monitorada por medidas de fotocorrente-voltagem (I/V). Analogamente ao EIS, é possível identificar a contribuição de cada camada adsorvida no sinal do sensor. Além disso, o LAPS permite monitorar diferentes lugares no chip, devido às curvas I/V obtidas de cada *spot* do conjunto de 16 IR-LEDs. A figura 8.1a mostra curvas I/V de um *spot* medido em solução tampão a pH 7 de um LAPS-NT contendo de 1 a 9 bicamadas. A ampliação correspondente à região de depleção com ponto de trabalho de ca. 1.0 μA e os respectivos potenciais de cada camada adsorvida de PAMAM e SWNTs são

mostrados na figura 8.1b e c, respectivamente. Nota-se a semelhança entre as 16 curvas I/V, que é um indicativo de uma formação homogênea do filme sobre a superfície do chip.

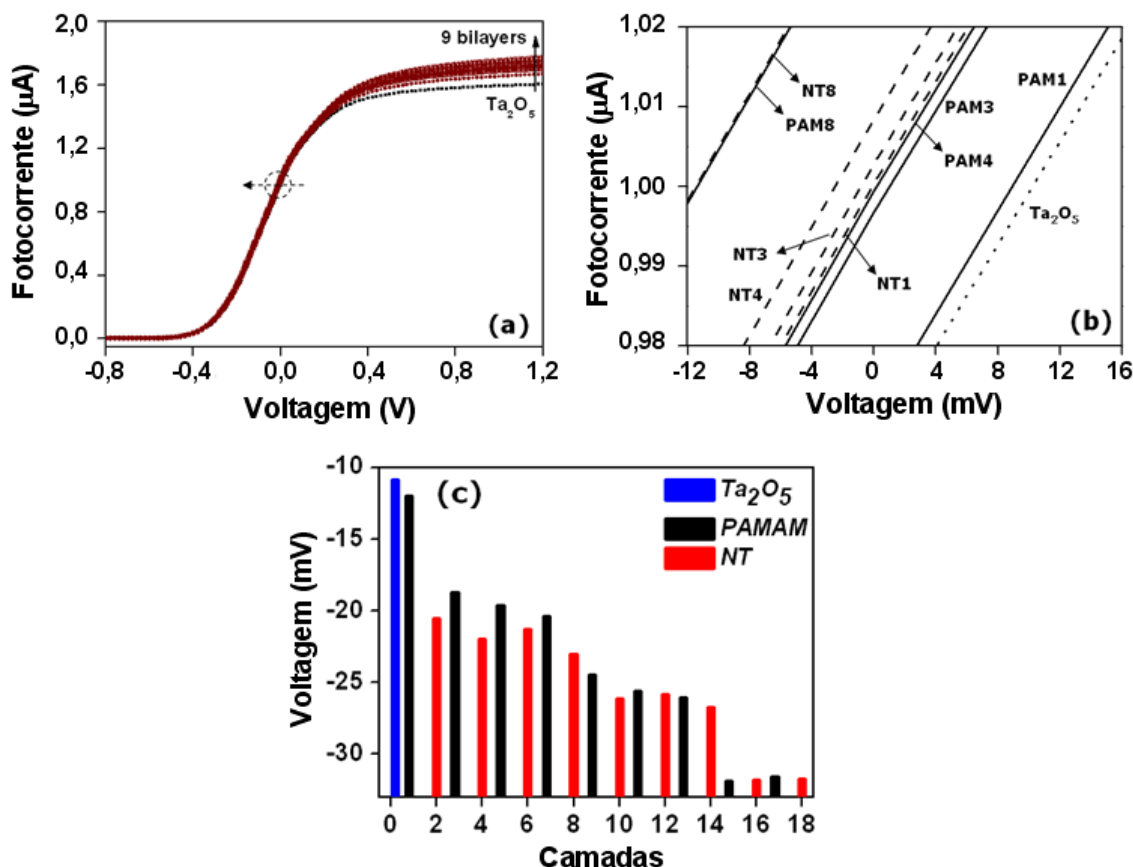


Figura 8.1 – (a) Curvas I/V de um dispositivo LAPS funcionalizado com multicamadas de PAMAM/SWNT usando solução tampão em pH, (b) ampliação da região de depleção em $1,0 \mu\text{A}$ e (c) deslocamento de potencial obtido das curvas I/V em função do número de camadas adsorvidas de PAMAM e SWNT.

A figura 8.1b também mostra que a adsorção das camadas alternadas de PAMAM (NH_3^+) e SWNTs (COO^-) causou deslocamento no eixo de tensão nas curvas I/V. Tal deslocamento pode ser explicado com o conceito empregado na detecção de macromoléculas carregadas em sensores capacitivos EIS (49,50), mencionado no capítulo anterior, uma vez que a estrutura p-Si-SiO₂-Ta₂O₅ do dispositivo é a mesma. O deslocamento do potencial nas curvas I/V é devido à carga da última camada do filme, onde se espera um excesso de cargas positivas ou negativas não compensadas do PAMAM ou SWNT, respectivamente. Este é acompanhado por uma diferença de potencial entre a interface sólido/líquido, sendo

o sentido do deslocamento dependente do sinal da carga desta última camada. Logo, o PAMAM carregado positivamente e o SWNT carregado negativamente induzem uma mudança no potencial interfacial, que resulta na alteração no potencial de *flat-band* da estrutura LAPS. Esses resultados são similares aos observados na estrutura capacitiva EIS-NT. Este último apresentou maiores potenciais de deslocamento, tendendo à saturação após 8 camadas. Um efeito similar foi observado para a estrutura LAPS-NT, mas com nova adsorção após 16 camadas, seguida de outra saturação, como mostrado na figura 8.1c. Esse novo deslocamento de potencial pode estar relacionado à redistribuição de íons nas camadas porosas do filme, devido ao rearranjo das multicamadas na superfície do filme (45,50).

8.2 Morfologia do filme PAMAM/SWNT no chip LAPS

A área ativa do LAPS é quatro vezes maior que a do EIS, com $2,25 \text{ cm}^2$. Por isso, é necessário um cuidadoso controle para obter um filme com superfície homogênea. Diferenças na morfologia do filme podem ocasionar respostas distintas nas regiões iluminadas com os 16 IR-LEDs. A figura 8.2 mostra imagens de FESEM, (a) de cima e (b) secção transversal, de um chip LAPS com 6 bicamadas de filme automontado PAMAM/SWNT. Embora contendo uma área grande, o filme exibiu sobre toda superfície do chip uma distribuição homogênea das redes de nanotubos interconectados nas camadas de PAMAM, além de alta porosidade e área superficial, inferidas da imagem de secção transversal da figura 8.2b. Conforme esperado, a morfologia do filme sobre o dispositivo LAPS foi similar à do sensor EIS, além da estabilidade sobre o chip.

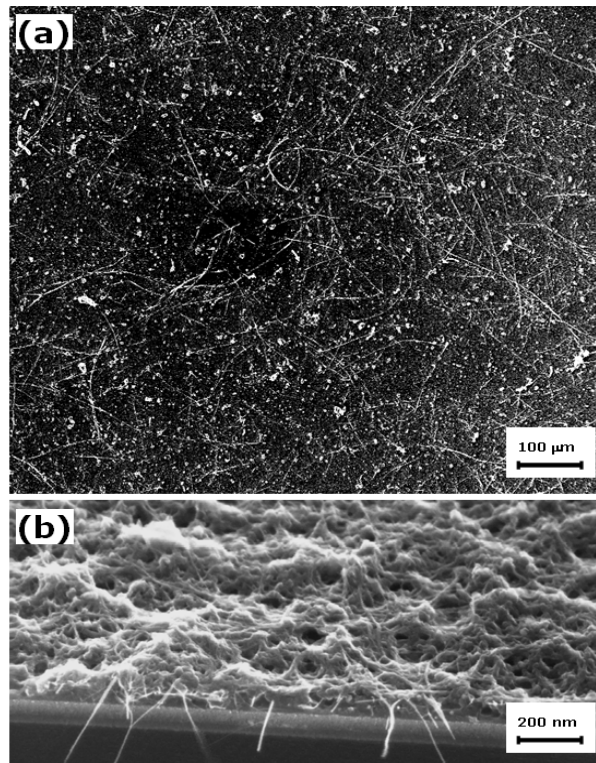


Figura 8.2 – Imagens de FESEM do filme automontado PAMAM/SWNT com 6 bicamadas em (a) de cima e (b) secção transversal.

Para compreender a influência das multicamadas no sinal da figura 8.1, a morfologia do filme PAMAM/SWNT com diferentes bicamadas foi investigada com imagens de AFM sobre uma área de $2,0 \times 2,0 \mu\text{m}^2$. Para uma bicamada de filme, a figura 8.3a mostra que a superfície do chip LAPS não está totalmente coberta, apresentando interconexão aleatória de feixes de nanotubos com diâmetro médio de 3-5 nm. Após a deposição de 3 bicamadas, o chip está totalmente coberto por um nanofilme altamente poroso, mostrado na figura 8.3b, que apresenta interpenetração da rede de SWNT entre as camadas de dendrímero. Uma morfologia similar foi observada no filme com 6 bicamadas na figura 8.3c, que mostra contudo um aumento de agregados de PAMAM. Esta tendência foi confirmada no filme com 9 bicamadas, figura 8.3d, em que é observado um denso empacotamento de agregados do polieletrólito. Este filme, embora mais espesso, apresentou menor porosidade e rugosidade, conforme indicado pelos valores de rugosidade da tabela 8.1. Além disso, a espessura também foi afetada por este empacotamento. A tabela 8.1 também mostra o pequeno aumento de espessura para os filmes com mais de 3 bicamadas. Esse resultado pode ser relacionado à saturação no deslocamento de

potencial após adsorção da oitava bicamada mostrada na figura 8.1c. A formação de uma estrutura uniforme densamente empacotada pode interferir na detecção da diferença de potencial induzida na interface sólido/líquido, sendo consistente com a perda de sensibilidade relatada em sensores obtidos com filmes automontados espessos (22,23,54).

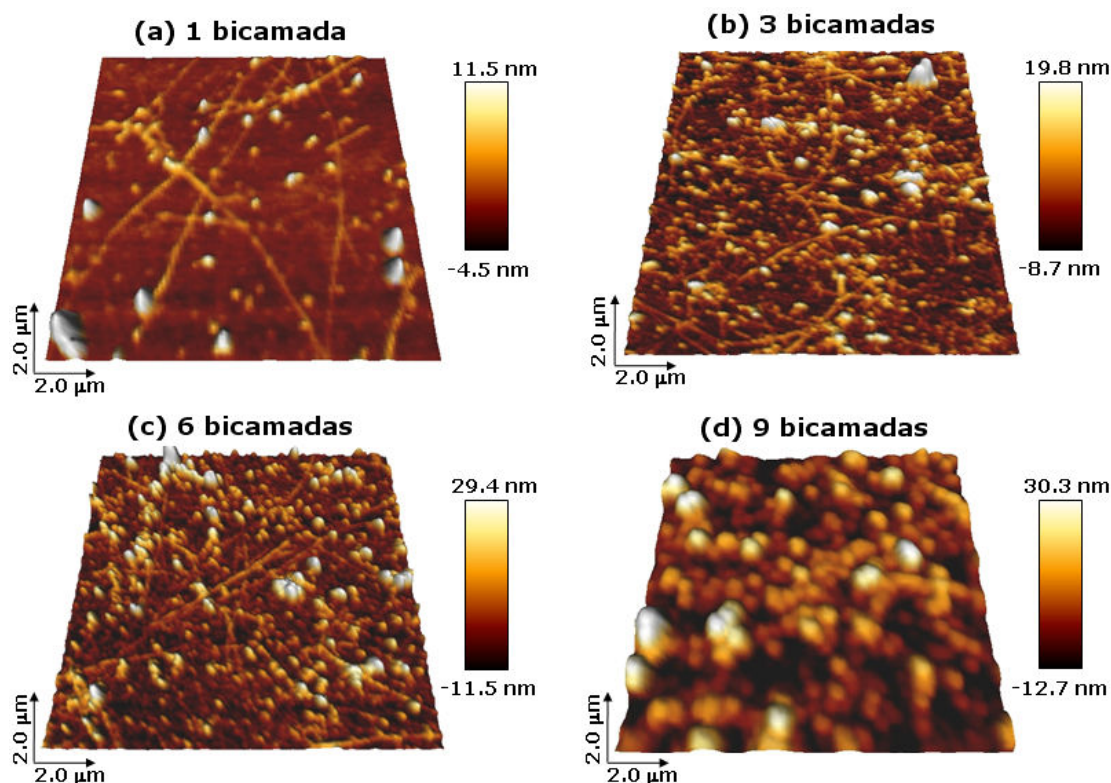


Figure 8.3 – Imagens de AFM do filme automontado PAMAM/SWNT com diferentes números de bicamadas.

Tabela 8.1 – Rugosidade e espessura de filmes automontados PAMAM/SWNT com diferentes bicamadas.

Bicamadas	Rugosidade RMS (nm)	Espessura (nm)
1	2	8
3	12	40
6	9	43
9	7	47

8.3 Sensibilidade ao pH e detecção de penicilina usando LAPS modificados

A sensibilidade ao pH dos LAPS modificados foi investigada com os mesmos chips usados nos experimentos descritos da subseção 8.1 em diferentes soluções de tampão tritisol com valores de pH entre 3 e 10. Da mesma forma que o EIS, o princípio de operação do LAPS se baseia na detecção de íons H^+ na interface transdutor/analito, sendo adequado na detecção de reações enzimáticas cujas enzimas são hidrolisadas, tais como a penicilinase e a glicose oxidase (8-10). A figura 8.4 mostra (a) curvas I/V referentes a um *spot* e (b) medidas de corrente constante (CC) para diferentes valores de pH, adquiridas nos 16 *spots*. Em ambas as medidas, as curvas foram similares para todos os *spots*, revelando boa estabilidade, pequeno *drift*, rápido tempo de resposta e baixa histerese de ca. 5 mV do sensor LAPS-NT. A sensibilidade ao pH se manteve constante até a deposição de 6 bicamadas de PAMAM/SWNT, sendo de 58 mV/pH. Houve pequena diminuição, para 55 mV/pH, da sensibilidade do filme com 9 bicamadas, que pode estar relacionada à morfologia do filme. Deve-se notar que uma espessura fina e alta porosidade são importantes para formar canais que conduzirão os íons H^+ através do filme para alcançar a superfície do Ta_2O_5 . Desta forma, o decréscimo na sensibilidade ao pH nos filmes com mais de 9 bicamadas é consistente com o empacotamento de agregados de PAMAM observados na imagem de AFM da figura 8.3d, discutido na última subseção.

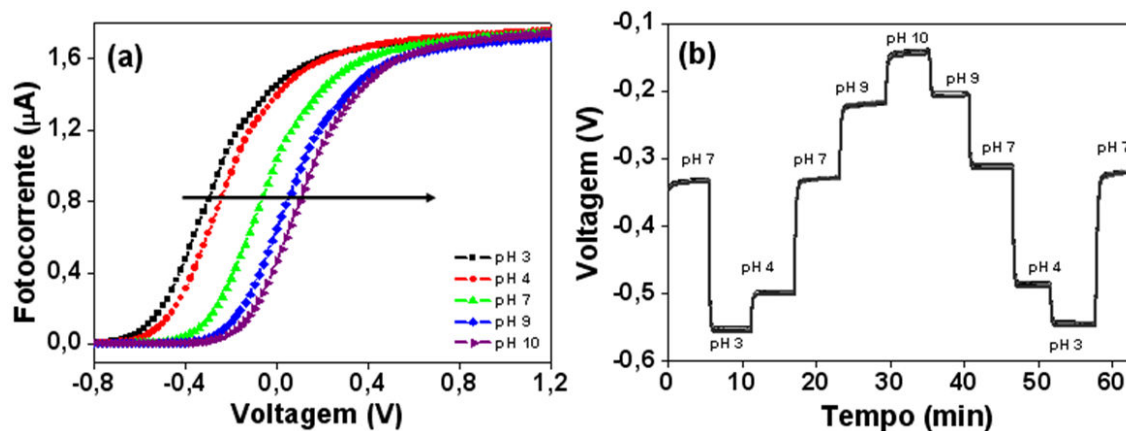


Figura 8.4 – (a) Curvas I/V e (b) resposta CC do sensor LAPS-NT em testes de sensibilidade ao pH, usando soluções de diferentes valores.

Embora as estruturas dos chips dos sensores EIS e LAPS fossem as mesmas e o procedimento experimental para fabricar os filmes realizado sob as mesmas condições, observou-se uma diferença da sensibilidade ao pH entre os sensores EIS-NT (55 mV/pH) e LAPS-NT (58 mV/pH) com mesmo número de bicamadas. Esta diferença pode ser atribuída a dois fatores: i) diferenças na estrutura do filme de Ta_2O_5 de diferentes pastilhas, que ocasiona mudanças na sua sensibilidade ao pH; ii) diferenças na porosidade do filme sobre chips com áreas distintas. Contudo, é importante notar o comportamento similar entre eles, em que ambos os dispositivos modificados mantiveram constante a sensibilidade ao pH até a sexta bicamada.

Testes de detecção de penicilina foram realizados com o sensor LAPS-NT, sendo a enzima penicilinase (PEN) imobilizada por adsorção física, seguindo o mesmo procedimento para os sensores EIS (46,47). A representação esquemática da montagem, o princípio de operação do LAPS-NT e a reação enzimática estão ilustrados na figura 8.5. Além de ter o objetivo geral de investigar os efeitos causados pelos nanotubos nas propriedades do biossensor, espera-se também que o desempenho do LAPS modificado com NT seja superior, assim como o foi com o sensor EIS-NT do capítulo anterior.

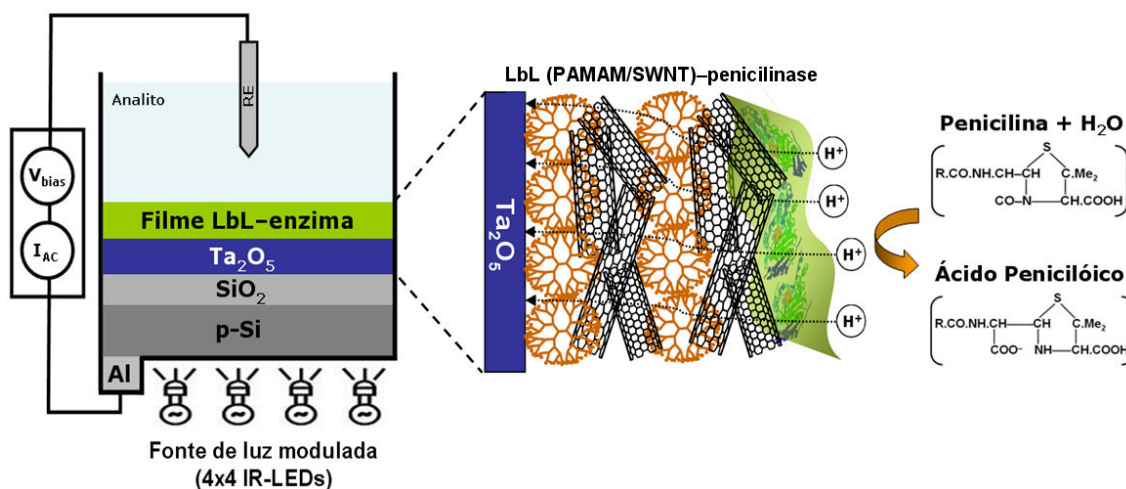


Figura 8.5 – Representação esquemática do princípio de operação de uma estrutura LAPS modificado com filme automontado PAMAM/SWNT + enzima e aplicado como biossensor de penicilina.

Medidas dinâmicas no modo CC dos sensores LAPS e LAPS-NT para detectar penicilina G, usando concentrações entre $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 10mmol L^{-1} , são mostradas na figura 8.6a. O desempenho do biossensor contendo nanotubos foi

digno de nota, com menor tempo de resposta e maior estabilidade com menor *drift*, em comparação ao chip LAPS sem SWNTs. A sensibilidade do LAPS-NT foi 100 mV/década em uma faixa linear de 0,25 a 5 mmol L⁻¹, enquanto para o LAPS puro foi de 65 mV/década para a mesma faixa de concentração, como mostram as curvas de calibração da figura 8.6b. Assim como no Capítulo 7, podemos supor que a maior sensibilidade e melhor desempenho do LAPS-NT estão associados à arquitetura do filme automontado PAMAM/SWNT. A morfologia porosa de grande área superficial do filme foi condição favorável à imobilização e distribuição da enzima sobre a superfície do sensor, além de facilitar a penetração dos íons H⁺ através do filme.

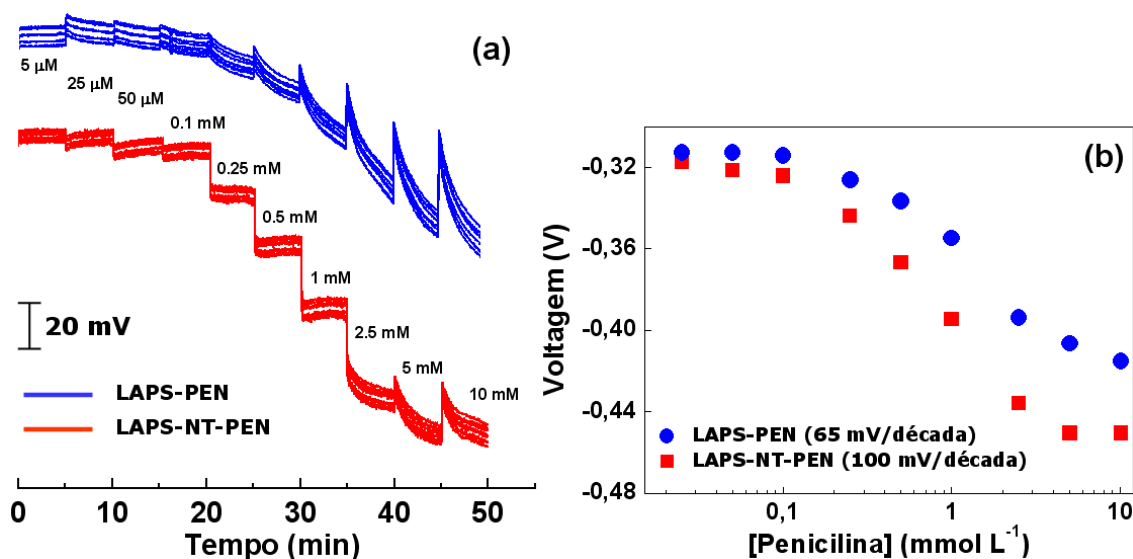


Figura 8.6 – (a) Medidas de corrente constante (CC) para diferentes concentrações de penicilina G os sensores LAPS e LAPS-NT e suas respectivas (b) curvas de calibração e sensibilidades.

A seletividade das unidades de sensor formadas por cada *spot* foi testada de forma que somente 8 dos 16 *spots* pudessem iluminar a área contendo a enzima imobilizada durante medidas no modo CC. Além disso, a seletividade de detecção do biossensor à penicilina G foi testada utilizando soluções de tampão polymix e 50 mmol L⁻¹ de glicose. A figura 8.7 mostra que não houve mudanças significativas no potencial do biossensor LAPS-NT-PEN ao utilizar soluções tampão e glicose alternadas com soluções de penicilina G com concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 mmol L⁻¹, demonstrando a seletividade do sistema. No entanto, ao contrário do esperado,

observou-se também uma resposta para as unidades de sensor que iluminavam a área do chip sem enzima, conforme mostrado nas curvas em azul da figura 8.7.

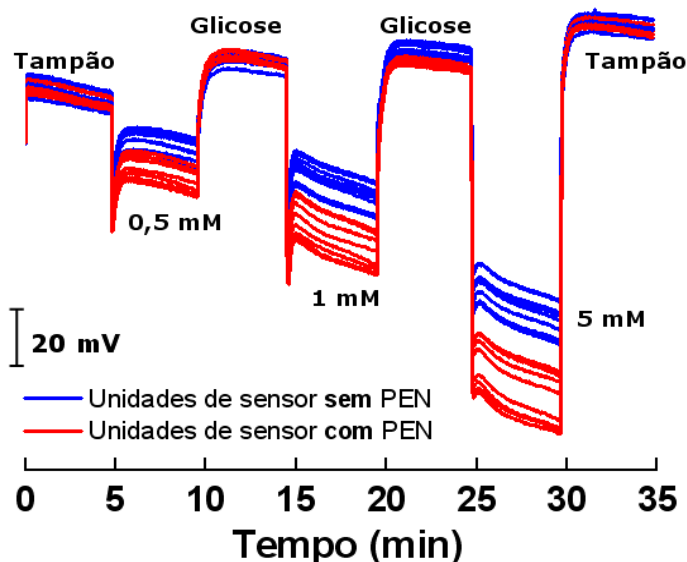


Figura 8.7 – Medidas de corrente constante (CC) do biossensor LAPS-NT-penicilina na detecção de diferentes amostras para sensores cobertos com enzima (em vermelho) e não cobertos (em azul).

As possíveis razões para esse resultado inesperado são: (i) mudança abrupta de pH da solução de penicilina imediatamente após a reação enzimática, (ii) difusão dos íons H^+ da área contendo enzima para outras sem enzima, (iii) fenômeno de *cross talk* (78-80) entre as unidades de sensor, especialmente daquelas que são adjacentes. A primeira hipótese foi descartada, pois não houve mudanças de pH das soluções de penicilina após medidas de detecção. A segunda também foi desconsiderada, pois nas condições experimentais empregadas seria necessário um longo período para obter um sinal mensurável da difusão dos íons, segundo cálculos de Schöning *et al.* (81). Portanto, o sinal não desejado nas curvas em azul da figura 8.7 foi atribuído somente ao fenômeno de *cross talk* entre as unidades de sensor, ou seja, entre os feixes de luz emitidos pelos 16 IR-LEDs. Este fenômeno, em um primeiro instante, interferiu na detecção do analito em uma área específica do chip, impossibilitando o emprego da plataforma LAPS em um sistema de multi-sensores em um único chip.

8.4 Empregando métodos de visualização para eliminar o fenômeno de *cross talk* dos sensores LAPS-NT

Métodos estatísticos podem auxiliar no tratamento de dados, permitindo a distinção de amostras similares nos casos em que a análise visual não é suficiente. Esta metodologia tem sido empregada em biossensores que se baseiam no conceito da língua eletrônica (17,82-85). Neste trabalho, em particular, foi realizado um estudo sistemático com vários desses métodos para eliminar o *cross talk* entre os *spots* do sensor LAPS-NT, por meio de técnicas implementadas numa plataforma denominada PEx (86,87). A descrição da metodologia destas técnicas de visualização usadas como ferramenta no tratamento de dados é mostrada no apêndice B. Entre as técnicas de projeção testadas, a mais empregada, chamada de Análise de Componentes Principais (PCA) (88), não foi adequada para o estudo proposto. A técnica de projeção que apresentou melhores resultados foi a *Interactive Document Map (IDMAP)* (86,89). A figura 8.8 ilustra uma projeção de IDMAP obtida dos dados de medidas CC da figura 8.7, que mostra a distinção das unidades de sensor contendo enzima daquelas que não continham (90). A numeração dos *spots* no esquema da figura representa a seqüência real da posição dos *spots* ativados na medida. A visualização mostra uma distância grande entre dois grupos distintos que correspondem ao sinal de resposta gerado pelos *spots* que faziam parte das unidades de sensor com ou sem filme automontado+enzima. Portanto, o fenômeno de *cross talk* aparente na curvas CC da figura 8.7 foi completamente eliminado ao analisar os dados com a técnica de projeção apropriada. Este resultado demonstra a aplicabilidade de métodos de projeções na validação de dados aplicados em biossensores. Ressalte-se que o efeito de *cross talk* em dispositivos LAPS pode ser minimizado por um controle mais refinado do alinhamento dos feixes de luz emitidos pelos IR-LEDs.

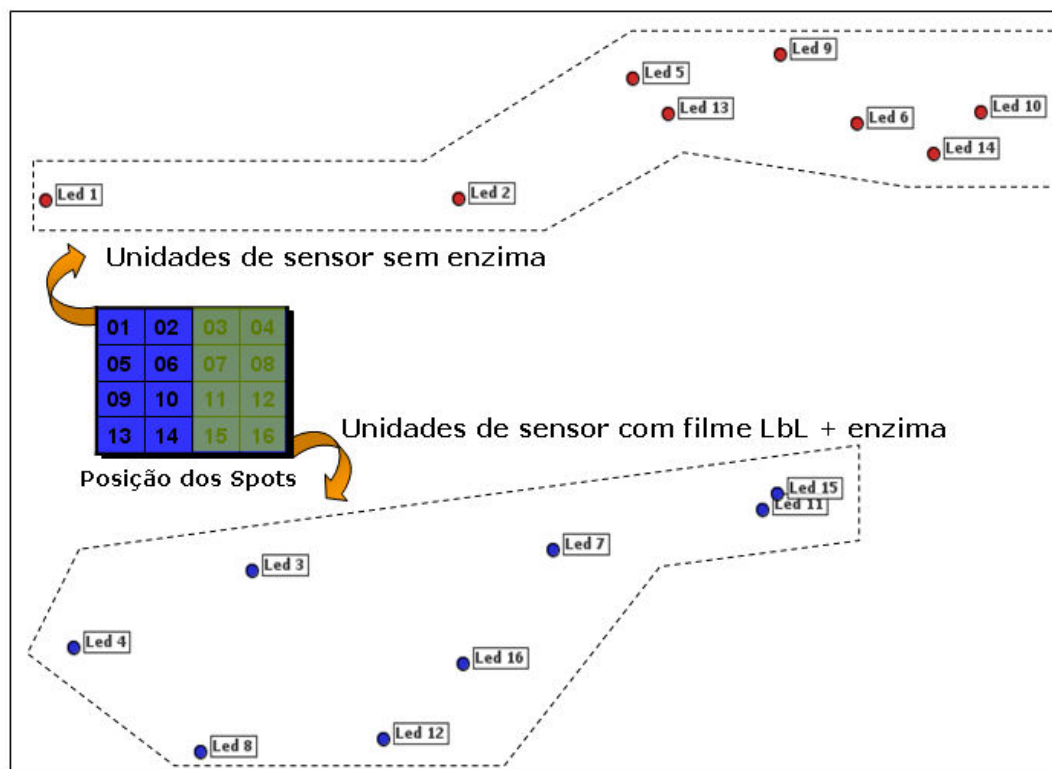


Figura 8.8 – Visualização de IDMAP para amostras de distintas unidades de sensor com e sem filme automontado de PAMAM/SWNT + enzima.

A figura 8.9 mostra que a mesma técnica de projeção permitiu distinguir amostras de penicilina com diferentes concentrações e de soluções tampão e glicose, usando os sensores (a) LAPS-NT e (b) LAPS. A melhor separação das amostras ocorreu na projeção do sensor LAPS-NT, demonstrando a seletividade do biossensor mostrada na figura 8.7, além do melhor desempenho na resposta da figura 8.6a (90).

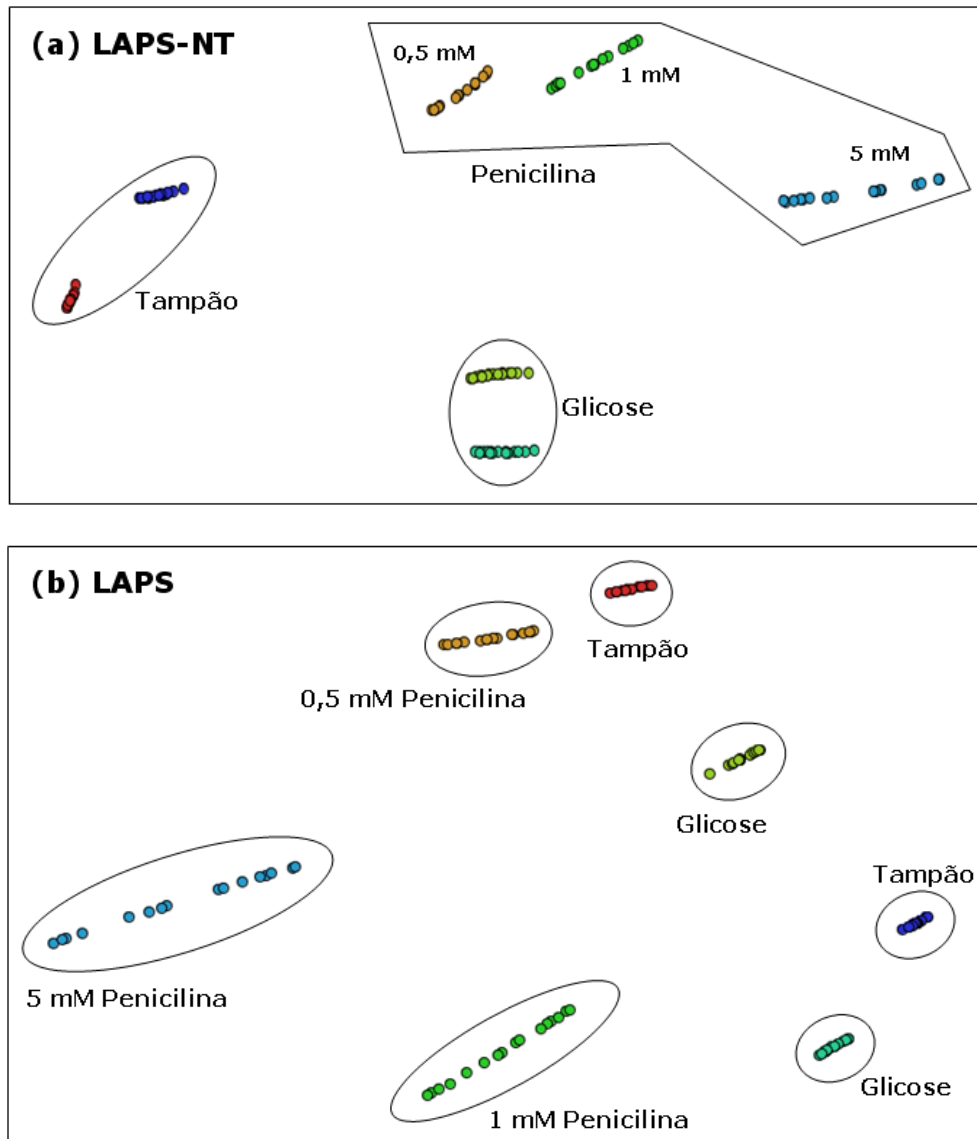


Figura 8.9 – Visualização de IDMAP para amostras distintas de tampão, glicose e penicilina usadas nos experimentos de detecção dos sensores (a) LAPS-NT e (b) LAPS.

Outro exemplo para demonstrar a aplicabilidade de técnicas de projeção em biossensores se refere à habilidade de analisar os dados e obter a distinção entre diferentes tipos de sensores utilizados. A figura 8.10 mostra uma projeção de três tipos de sensores LAPS para detectar penicilina, o LAPS-PEN (sem modificação), o LAPS-NT-PEN e um terceiro LAPS modificado somente com filme automontado de polieletrólitos PAMAM/PSS (LAPS-PE-PEN).

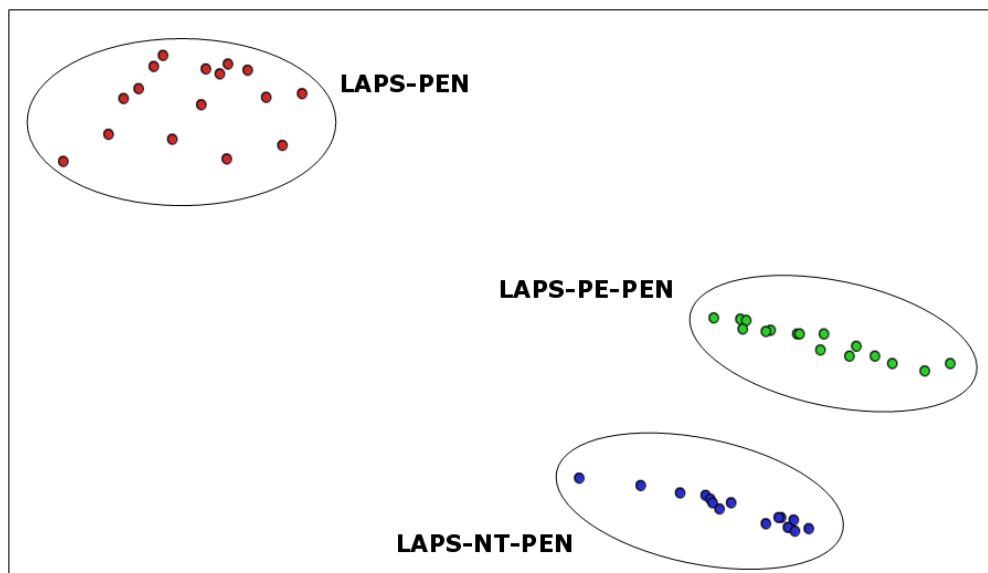


Figura 8.10 – Visualização de IDMAP de três distintos sensores LAPS utilizados na detecção de penicilina.

Do ponto de vista das técnicas de visualização, os resultados obtidos com as projeções abrem um leque enorme de possibilidades para aplicação em multi-sensores baseados na plataforma de transdução LAPS. Por exemplo, com o auxílio das projeções, biossensores com diferentes arquiteturas e enzimas imobilizadas podem ser estudados para obter sensores multi-seletivos no mesmo chip LAPS, melhorando o desempenho. Com relação à incorporação de nanotubos de carbonos sobre o chip LAPS, os resultados demonstraram que a modificação realizada é promissora para novos biossensores enzimáticos com maior sensibilidade devido à compatibilidade entre nanotubos e biomoléculas, permitindo integração de elementos de reconhecimento sobre um dispositivo de efeito de campo.

Capítulo 9

CONCLUSÕES

Este projeto de doutoramento propôs a fabricação e caracterização de filmes automontados de nanotubos de carbono e suas aplicações em dois sistemas: um sensor eletroquímico e um biossensor de efeito de campo utilizando as estruturas EIS e LAPS. Em cada sistema foi utilizado um tipo de CNTs, sendo um MWNT e outro SWNT–COOH, que exigiu estratégias diferentes em sua manipulação, levando à formação de filmes com distintas arquiteturas e funcionalidades. Enumera-se a seguir a principais conclusões de cada sistema.

1.) A obtenção de uma dispersão estável, após tratamento químico de funcionalização e purificação, de MWNTs em solução aquosa de dendrímero (PAMAM-NT) foi essencial para que os nanotubos fossem manipulados na forma de filme automontado. Os filmes de PAMAM-NT e ftalocianina de níquel (NiTsPc) exibiram fortes interações e acentuaram o processo redox da NiTsPc, conforme indicado em medidas espectroscópicas e por voltametria cíclica, respectivamente. Este último proporcionou a formação de eletrodos modificados com alta eletroatividade e maior atividade catalítica ao detectar dopamina, além de maior sensibilidade e seletividade na presença de interferente. A análise do planejamento fatorial sugeriu ser mais adequado o uso de filmes automontados com poucas bicamadas para obter eletrodos modificados com corrente de fundo reduzida, que possibilita alcançar limites de detecções menores.

2.) Filmes automontados de PAMAM/SWNT sobre dispositivos de efeito de campo (FEDs) EIS e LAPS exibiram uma nanoestrutura altamente porosa e com grande área de superfície, devido à interconexão de redes de SWNTs nas camadas de PAMAM, como mostrado nas imagens de FESEM e AFM. Essa morfologia foi adequada para imobilizar enzimas e facilitar a penetração de íons H^+ através do filme. Além disso, ambos os dispositivos EIS e LAPS modificados apresentaram alta sensibilidade ao pH até seis bicamadas de filme. Essas características foram

essenciais para o aumento da sensibilidade do biossensor de penicilina, obtido com a imobilização da enzima penicilinase sobre o filme automontado. A incorporação dos filmes nanoestruturados contendo SWNTs melhorou o desempenho dos sensores EIS e LAPS ao detectar penicilina G, tornando-os mais sensíveis, com menor tempo de resposta e sinal mais estável.

3.) As técnicas de visualização empregadas no tratamento de dados dos sensores LAPS modificados foram importantes para eliminar o fenômeno de *cross talk* entre os *spots*, gerando uma projeção capaz de distinguir as unidades de sensor com ou sem enzima. Outras visualizações demonstraram a grande aplicabilidade desta ferramenta em sensores ao mostrar projeções que distinguiam diferentes grupos de amostras e também de tipos de sensores utilizados. Esses resultados indicam ser possível ainda maior otimização de sistemas sensoriais, principalmente com tratamento de dados de multi-sensores baseados na plataforma de transdução LAPS.

4.) O conceito de funcionalização de FEDs com filmes nanoestruturados de CNTs apresentado pode ser viável para novos tipos de biossensores enzimáticos usando dispositivos EIS e LAPS. Os resultados demonstraram que a modificação desses sensores com nanotubos é promissora, devido à melhora nas características da resposta e aumento na sensibilidade do biossensor.

Em suma, a principal contribuição deste trabalho foi desenvolver novos sistemas nanoestruturados com nanotubos de carbono aplicados especificamente em sensores, aliado à compreensão do efeito causado por este nanomaterial no desempenho dos dispositivos. Além disso, a implementação de uma nova tecnologia aplicada em biossensores trouxe novas possibilidades de pesquisa, com a combinação de técnicas de nanotecnologia com as de visualização de informação.

Capítulo 10

PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Embora se tenha cada vez mais trabalhos publicados com nanotubos de carbono em biossensores, ainda há muito para se estudar nessa área. Do ponto de vista tecnológico, a integração nanotubos–biomoléculas em biossensores ainda necessita de pesquisa para obter dispositivos com alta performance e reprodutibilidade. Em particular, a incorporação de CNTs combinados com outros materiais em filme nanoestruturados em dispositivos de efeito de campo, EIS ou LAPS, é inovadora, apresentando várias possibilidades para continuação deste trabalho, das quais se vislumbram:

- 1.) Estudar novas arquiteturas de filme com CNTs e outros tipos de enzima para fabricação específica tanto de biossensores eletroquímicos como de biossensores capacitivos de efeito de campo (estrutura EIS);
- 2.) Imobilizar em um único chip LAPS diferentes enzimas sobre filmes nanoestruturados, criando unidades de multi-sensores e estudar a seletividade e reprodutibilidade dessas unidades;
- 3.) Desenvolver um software próprio para tratamento de dados dos dispositivos LAPS utilizando técnicas de visualização;
- 4.) Incorporar materiais com outras funcionalidades, por exemplo, biopolímeros, antígeno-anticorpo e nanopartículas sobre FEDs, visando a novas aplicações.

Referências

- 1 CUI, Y.; WEI, Q. Q.; PARK, H. K.; LIEBER, C. M. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science*, v. 293, n. 5533, p. 1289-1292, 2001.
- 2 PATOLSKY, F.; TIMKO, B. P.; ZHENG, G. F.; LIEBER, C. M. Nanowire-based nanoelectronic devices in the life sciences. *Mrs Bulletin*, v. 32, n. 2, p. 142-149, 2007.
- 3 SCHÖNING, M. J. "PLAYING AROUND" with field-effect sensors on the basis of EIS structures, LAPS and ISFETs. *Sensors*, v. 5, n. 3, p. 126-138, 2005.
- 4 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.
- 5 KATZ, E.; WILLNER, I. Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. *Chemphyschem*, v. 5, n. 8, p. 1085-1104, 2004.
- 6 BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M., Biosensors based on carbon nanotubes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 385, n. 3, p. 452-468, 2006.
- 7 ALLEN, B. L.; KICHAMBARE, P. D.; STAR, A. Carbon nanotube field-effect-transistor-based biosensors. *Advanced Materials*, v. 19, n. 11, p. 1439-1451, 2007.
- 8 KIM, S. N.; RUSLING, J. F.; PAPADIMITRAKOPOULOS, F. Carbon nanotubes for electronic and electrochemical detection of biomolecules. *Advanced Materials*, v. 19, n., p. 3214-3228, 2007.
- 9 HAMMOND, P. T. Form and function in multilayer assembly: new applications at the nanoscale. *Advanced Materials*, v. 16, n. 15, p. 1271-1293, 2004.
- 10 TANG, Z. Y.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials*, v. 18, n. 24, p. 3203-3224, 2006.
- 11 ARIGA, K.; HILL, J. P.; JI, Q. M. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 9, n. 19, p. 2319-2340, 2007.
- 12 LUTKENHAUS, J. L.; HAMMOND, P. T. Electrochemically enabled polyelectrolyte multilayer devices: from fuel cells to sensors. *Soft Matter*, v. 3, n. 7, p. 804-816, 2007.

13 QUINN, J. F.; JOHNSTON, A. P. R.; SUCH, G. K.; ZELIKIN, A. N.; CARUSO, F. Next generation, sequentially assembled ultrathin films: Beyond electrostatics. *Chemical Society Reviews*, v. 36, n. 5, p. 707-718, 2007.

14 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. In press. doi: 10.1016/j.bios.2009.09.43, 2009.

15 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.

16 VANENGELENBURG, S. B.; PALMER, A. E. Fluorescent biosensors of protein function. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 12, n. 1, p. 60-65, 2008.

17 ZUCOLOTTI, V.; DAGHASTANLI, K. R. P.; HAYAAKA, C. O.; RIUL JUNIOR, A.; CIANCAGLINI, P.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 5, p. 2163-2167, 2007.

18 CRESPILO, F. N.; IOST, R. M.; TRAVAIN, S. A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ZUCOLOTTI, V. Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 10, p. 3073-3077, 2009.

19 MERTENS, J.; ROGERO, C.; CALLEJA, M.; RAMOS, D.; MARTIN-GAGO, J. A.; BRIONES, C.; TAMAYO, J. Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films. *Nature Nanotechnology*, v. 3, n. 5, p. 301-307, 2008.

20 DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004.

21 CRESPILO, F. N.; HUGUENIN, F.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVI, P.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Dendrimers as nanoreactors to produce platinum nanoparticles embedded in layer-by-layer films for methanol-tolerant cathodes. *Electrochemistry Communications*, v. 8, n. 2, p. 348-352, 2006.

22 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Bifunctional electroactive nanostructured membranes. *Electrochemistry Communications*, v. 9, n. 11, p. 2676-2680, 2007.

23 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ZUCOLOTTI, V. Processing of electroactive nanostructured films incorporating carbon nanotubes and phthalocyanines for sensing. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 24, p. 9050-9055, 2008.

- 24 LEE, S. W.; KIM, B. S.; CHEN, S.; SHAO-HORN, Y.; HAMMOND, P. T. Layer-by-layer assembly of all carbon nanotubes ultrathin films for electrochemical applications. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 2, p. 671-679, 2009.
- 25 IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.
- 26 IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, v. 363, n. 6430, p. 603-605, 1993.
- 27 BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, v. 119, n. 2, p. 105-118, 2005.
- 28 THOSTENSON, E. T.; REN, Z. F.; CHOU, T. W. Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*, v. 61, n. 13, p. 1899-1912, 2001.
- 29 CHARLIER, J. C. Defects in carbon nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 12, p. 1063-1069, 2002.
- 30 DROOPA JUNIOR, R. *Síntese e caracterização de nanotubos e fulerenos nitrogenados gerados por arco elétrico*. 2004. 130 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- 31 OLEK, M.; OSTRANDER, J.; JURGA, S.; MOHWALD, H.; KOTOV, N.; KEMPA, K.; GIERSIG, M. Layer-by-layer assembled composites from multiwall carbon nanotubes with different morphologies. *Nano Letters*, v. 4, n. 10, p. 1889-1895, 2004.
- 32 SUN, Y. P.; FU, K. F.; LIN, Y.; HUANG, W. J. Functionalized carbon nanotubes: properties and applications. *Accounts of Chemical Research*, v. 35, n. 12, p. 1096-1104, 2002.
- 33 CHEN, J.; HAMON, M. A.; HU, H.; CHEN, Y. S.; RAO, A. M.; EKLUND, P. C.; HADDON, R. C. Solution properties of single-walled carbon nanotubes. *Science*, v. 282, n. 5386, p. 95-98, 1998.
- 34 MICKELSON, E. T.; CHIANG, I. W.; ZIMMERMAN, J. L.; BOUL, P. J.; LOZANO, J.; LIU, J.; SMALLEY, R. E.; HAUGE, R. H.; MARGRAVE, J. L. Solvation of fluorinated single-wall carbon nanotubes in alcohol solvents. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 103, n. 21, p. 4318-4322, 1999.

35 RIGGS, J. E.; GUO, Z. X.; CARROLL, D. L.; SUN, Y. P. Strong luminescence of solubilized carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, v. 122, n. 24, p. 5879-5880, 2000.

36 RIGGS, J. E.; WALKER, D. B.; CARROLL, D. L.; SUN, Y. P. Optical limiting properties of suspended and solubilized carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 104, n. 30, p. 7071-7076, 2000.

37 BAHR, J. L.; YANG, J. P.; KOSYNKIN, D. V.; BRONIKOWSKI, M. J.; SMALLEY, R. E.; TOUR, J. M. Functionalization of carbon nanotubes by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: a bucky paper electrode. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 27, p. 6536-6542, 2001.

38 CHEN, J.; RAO, A. M.; LYUKSYUTOV, S.; ITKIS, M. E.; HAMON, M. A.; HU, H.; COHN, R. W.; EKLUND, P. C.; COLBERT, D. T.; SMALLEY, R. E.; HADDON, R. C. Dissolution of full-length single-walled carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 105, n. 13, p. 2525-2528, 2001.

39 HUANG, W. J.; LIN, Y.; TAYLOR, S.; GAILLARD, J.; RAO, A. M.; SUN, Y. P. Sonication-assisted functionalization and solubilization of carbon nanotubes. *Nano Letters*, v. 2, n. 3, p. 231-234, 2002.

40 LIN, Y.; RAO, A. M.; SADANADAN, B.; KENIK, E. A.; SUN, Y. P. Functionalizing multiple-walled carbon nanotubes with aminopolymers. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 106, n. 6, p. 1294-1298, 2002.

41 FENG, M.; HAN, H.; ZHANG, J.; TACHIKAWA, H. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. In: ZHANG, H. J. X.; WANG, J. (Ed.) *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2008. cap. 15, p 459-501.

42 HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, v. 63, n. 9, p. 1247-1250, 1991.

43 THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification - (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

44 POGHOSSIAN, A.; SCHÖNING, M. J. Silicon-based chemical and biological field-effect devices. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.); *Encyclopedia of sensors*. Stevenson Ranch (USA): American Scientific Publishers, 2006. v.9, p 463-533.

45 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; ABOUZAR, M. H.; BÄCKER, M.; ZUCOLOTTO, V.; POGHOSSIAN, A.; OLIVEIRA JUNIOR, 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.

46 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; ABOUZAR, M. H.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, 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.

47 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; WERNER, C. F.; BÄCKER, M.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; SCHÖNING, M. J. Layer-by-layer assembly of carbon nanotubes incorporated in light-addressable potentiometric sensors. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, n. 33, p. 14765-14770, 2009.

48 POGHOSSIAN, A.; ABOUZAR, M. H.; SAKKARI, M.; KASSAB, T.; HAN, Y.; INGEBRANDT, S.; OFFENHAUSSER, A.; SCHÖNING, M. J. Field-effect sensors for monitoring the layer-by-layer adsorption of charged macromolecules. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 118, n. 1-2, p. 163-170, 2006.

49 POGHOSSIAN, A.; ABOUZAR, M. H.; AMBERGER, F.; MAYER, D.; HAN, Y.; INGEBRANDT, S.; OFFENHAUSSER, A.; SCHÖNING, M. J. Field-effect sensors with charged macromolecules: characterization by capacitance-voltage, constant-capacitance, impedance spectroscopy and atomic-force microscopy methods. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, n. 9-10, p. 2100-2107, 2007.

50 POGHOSSIAN, A.; INGEBRANDT, S.; ABOUZAR, M. H.; SCHÖNING, M. J. Label-free detection of charged macromolecules by using a field-effect-based sensor platform: experiments and possible mechanisms of signal generation. *Applied Physics A-Materials Science & Processing*, v. 87, n. 3, p. 517-524, 2007.

51 WAGNER, T.; MOLINA, R.; YOSHINOBU, T.; KLOOCK, J. P.; BISELLI, M.; CANZONERI, M.; SCHNITZLER, T.; SCHÖNING, M. J. Handheld multi-channel LAPS device as a transducer platform for possible biological and chemical multi-sensor applications. *Electrochimica Acta*, v. 53, n. 2, p. 305-311, 2007.

52 WAGNER, T.; RAO, C.; KLOOCK, J. P.; YOSHINOBU, T.; OTTO, R.; KEUSGEN, M.; SCHÖNING, M. J. "LAPS card" - a novel chip card-based light-addressable potentiometric sensor (LAPS). *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 118, n. 1-2, p. 33-40, 2006.

53 LEZNOFF, C. C.; LEVER, A. B. P. *Phthalocyanines - properties and applications* New York: John Wiley & Sons, 1989. v.3.

54 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; CRESPILO, F. N.; CARVALHO, A. J. F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 45, p. 22690-22694, 2006.

55 ZUCOLOTTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; MOREIRA, W. C.; OLIVEIRA, O. N. Nanoscale processing of polyaniline and phthalocyanines for sensing applications. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 113, n. 2, p. 809-815, 2006.

56 PICART, C.; MUTTERER, J.; RICHERT, L.; LUO, Y.; PRESTWICH, G. D.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C.; LAVALLE, P. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 20, p. 12531-12535, 2002.

57 GARZA, J. M.; SCHAAF, P.; MULLER, S.; BALL, V.; STOLTZ, J. F.; VOEGEL, J. C.; LAVALLE, P. Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir*, v. 20, n. 17, p. 7298-7302, 2004.

58 DEUTSCH, D. S.; SIANI, A.; FANSON, P. T.; HIRATA, H.; MATSUMOTO, S.; WILLIAMS, C. T.; AMIRIDIS, M. D. FT-IR investigation of the thermal decomposition of poly(amidoamine) dendrimers and dendrimer-metal nanocomposites supported on Al₂O₃ and ZrO₂. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 11, p. 4246-4255, 2007.

59 PAN, B. F.; CUI, D. X.; GAO, F.; HE, R. Growth of multi-amine terminated poly(amidoamine) dendrimers on the surface of carbon nanotubes. *Nanotechnology*, v. 17, n. 10, p. 2483-2489, 2006.

60 ZUCOLOTTO, V.; FERREIRA, M.; CORDEIRO, M. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; BALOGH, D. T.; ZANATTA, A. R.; MOREIRA, W. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Unusual interactions binding iron tetrasulfonated phthalocyanine and poly(allylamine hydrochloride) in layer-by-layer films. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 16, p. 3733-3737, 2003.

61 DRESSELHAUS, M. S.; DRESSELHAUS, G.; SAITO, R.; JORIO, A. Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters*, v. 409, n. 2, p. 47-99, 2005.

62 ALVAREZ, W. E.; POMPEO, F.; HERRERA, J. E.; BALZANO, L.; RESASCO, D. E. Characterization of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) produced by co disproportionation on co-mo catalysts. *Chemistry of Materials*, v. 14, n. 4, p. 1853-1858, 2002.

63 WANG, Y. D.; JOSHI, P. P.; HOBBS, K. L.; JOHNSON, M. B.; SCHMIDTKE, D. W. Nanostructured biosensors built by layer-by-layer electrostatic assembly of enzyme-coated single-walled carbon nanotubes and redox polymers. *Langmuir*, v. 22, n. 23, p. 9776-9783, 2006.

64 IRVINE, J. T. S.; EGGINS, B. R.; GRIMSHAW, J. The cyclic voltammetry of some sulfonated transition-metal phthalocyanines in dimethylsulfoxide and in water. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 271, n. 1-2, p. 161-172, 1989.

- 65 LAURENT, D.; SCHLENOFF, J. B. Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes. *Langmuir*, v. 13, n. 6, p. 1552-1557, 1997.
- 66 CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; NART, F. Electrochemistry of layer-by-layer films: a review. *International Journal of Electrochemistry Science*, v. 1, n. 5, p. 194-214, 2006.
- 67 ALENCAR, W. S.; CRESPILO, F. N.; SANTOS, M.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; SILVA, W. C. Influence of film architecture on the charge-transfer reactions of metallophthalocyanine layer-by-layer films. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 111, n. 34, p. 12817-12821, 2007.
- 68 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. *Electroquímica: princípios, métodos e aplicações*. Coimbra : Almedina, 1996.
- 69 LIN, X. Q.; ZHANG, L. Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid at glutamic acid modified graphite electrode. *Analytical Letters*, v. 34, n. 10, p. 1585-1601, 2001.
- 70 BRUNS, R. E.; SCARMINIO, L. S.; BARROS NETO, B. *Statistical design-chemometrics*. Amsterdam: Elsevier, 2006.
- 71 POGHOSSIAN, A.; ABOUZAR, M. H.; CHRISTIAENS, P.; WILLIAMS, O. A.; HAENEN, K.; WAGNER, P.; SCHÖNING, M. J. Sensing charged macromolecules with nanocrystalline diamond-based field-effect capacitive sensors. *Journal of Contemporary Physics-Armenian Academy of Sciences*, v. 43, n. 2, p. 77-81, 2008.
- 72 POGHOSSIAN, A.; SCHÖNING, M. J.; SCHROTH, P.; SIMONIS, A.; LUTH, 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.
- 73 POGHOSSIAN, A.; THUST, M.; SCHROTH, P.; STEFFEN, A.; LUTH, H.; SCHÖNING, M. J. Penicillin detection by means of silicon-based field-effect structures. *Sensors and Materials*, v. 13, n. 4, p. 207-223, 2001.
- 74 ABOUZAR, M. H.; POGHOSSIAN, A.; RAZAVI, A.; BESMEHN, A.; BIJNENS, N.; WILLIAMS, O. A.; HAENEN, K.; WAGNER, P.; SCHÖNING, M. J. Penicillin detection with nanocrystalline-diamond field-effect sensor. *Physica Status Solidi A-Applications and Materials Science*, v. 205, n. 9, p. 2141-2145, 2008.
- 75 ABOUZAR, M. H.; POGHOSSIAN, A.; RAZAVI, A.; WILLIAMS, O. A.; BIJNENS, N.; WAGNER, P.; SCHÖNING, M. J. Characterization of capacitive field-effect sensors with a nanocrystalline-diamond film as transducer material for multi-parameter sensing. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 5, p. 1298-1304, 2009.

76 LEE, S. R.; RAHMAN, M. M.; SAWADA, K.; ISHIDA, M. Fabrication of a highly sensitive penicillin sensor based on charge transfer techniques. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 7, p. 1877-1882, 2009.

77 STRED'ANSKY, M.; PIZZARIELLO, A.; STRED'ANSKA, S.; MIERTUS, S. Amperometric pH-sensing biosensors for urea, penicillin, and oxalacetate. *Analytica Chimica Acta*, v. 415, n. 1-2, p. 151-157, 2000.

78 OUDRARI, H.; XIONG, S. X.; CHE, N. Z.; XIONG, X. X.; BUTLER, J. Sensitivity study for sensor optical and electric cross-talk based on spectral measurements: an application to developmental sensors using heritage sensors such as MODIS. In: IEEE. INTERNATIONAL GEOSCIENCE AND REMOTE SENSING SYMPOSIUM, IGARSS, 2007, Barcelona. *Proceedings...* Barcelona: IEEE, 2007. v.1-12, p 2856-2859.

79 OHTAKE, F.; BABA, A.; FUJII-KURIYAMA, Y.; KATO, S. Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 370, n. 4, p. 541-546, 2008.

80 WADA, T.; KANG, H. S.; ANGERS, M.; GONG, H.; BHATIA, S.; KHADEM, S.; REN, S.; ELLIS, E.; STROM, S. C.; JETTEN, A. M.; XIE, W. Identification of oxysterol 7 alpha-hydroxylase (Cyp7b1) as a novel retinoid-related orphan receptor alpha (ROR alpha) (NR1F1) target gene and a functional cross-talk between ROR alpha and liver X receptor (NR1H3). *Molecular Pharmacology*, v. 73, n. 3, p. 891-899, 2008.

81 POGHOSSIAN, A.; SCHÖNING, M. J. Detecting both physical and (bio-)chemical parameters by means of ISFET devices. *Electroanalysis*, v. 16, n. 22, p. 1863-1872, 2004.

82 RIUL JUNIOR, A.; DOS SANTOS JUNIOR, D. S.; WOHNATH, K.; DI TOMMAZO, R.; CARVALHO, A.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; TAYLOR, D. M.; MATTOSO, L. H. C. Artificial taste sensor: efficient combination of sensors made from Langmuir-Blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene-containing polymer. *Langmuir*, v. 18, n. 1, p. 239-245, 2002.

83 RIUL JUNIOR, A.; MALMEGRIM, R. R.; FONSECA, F. J.; MATTOSO, L. H. C. An artificial taste sensor based on conducting polymers. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 18, n. 11, p. 1365-1369, 2003.

84 ZUCOLOTTO, V.; PINTO, A. P. A.; TUMOLO, T.; MORAES, M. L.; BAPTISTA, M. S.; RIUL JUNIOR, A.; ARAUJO, A. P. U.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 21, n. 7, p. 1320-1326, 2006.

85 PERINOTTO, A. C.; CASELI, L.; HAYASAKA, C. O.; RIUL JUNIOR, A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ZUCOLOTTO, V. Dendrimer-assisted immobilization of alcohol dehydrogenase in nanostructured films for biosensing: ethanol detection using electrical capacitance measurements. *Thin Solid Films*, v. 516, n. 24, p. 9002-9005, 2008.

86 PAULOVICH, F. V., *Mapeamento de dados multi-dimensionais – integrando mineração e visualização*. 2008. 144 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

87 PAULOVICH, F. V.; OLIVEIRA, M. C. F.; MINGHIM, R. The projection explorer: a flexible tool for projection-based multidimensional visualization. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON COMPUTER GRAPHICS AND IMAGE PROCESSING, 20, 2007, Belo Horizonte. *Proceedings...* Belo Horizonte, 2007. p 27-34.

88 JOLLIFFE, I. T. *Principal component analysis*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1986.

89 MINGHIM, R.; PAULOVICH, F. V.; LOPES, A. D. A. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. In: *VISUALIZATION AND DATA ANALYSIS - IS&T/SPIE SYMPOSIUM ON ELECTRONIC IMAGING*, 2006, San Jose. *Proceedings...* San Jose, CA, 2006. v. 6060, p S1-S12.

90 SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; MAKI, R. M.; PAULOVICH, F. V.; WERNER, C. F.; POGHOSSIAN, A.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; SCHÖNING, M. J. Use of information visualization methods eliminating cross talk in multiple sensing units investigated for a light-addressable potentiometric sensor. *Analytical Chemistry*. In press. doi: 10.1021/ac9024076, 2009.

Apêndice A

PUBLICAÇÕES ORIGINADAS NO PERÍODO DE DOUTORAMENTO

1. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; MAKI, R. M.; PAULOVICH, F. V.; WERNER, C. F.; POGHOSSIAN, A.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; SCHÖNING, M. J. Use of information visualization methods eliminating cross talk in multiple sensing units investigated for a light-addressable potentiometric sensor. *Analytical Chemistry*, doi: 10.1021/ac9024076, 2009.
2. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, doi: 10.1016/j.bios.2009.09.43, 2009.
3. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; BÄCKER, M.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, 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-Applications and Materials Science*. Aceito para publicação.
4. ABOUZAR, M. H.; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; POGHOSSIAN, A.; OLIVEIRA JUNIOR, 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-Applications and Materials Science*. Aceito para publicação.
5. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; ABOUZAR, M. H.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, 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.
6. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; WERNER, C. F.; BÄCKER, M.; POGHOSSIAN, A.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; SCHÖNING, M. J. Layer-by-Layer assembly of carbon nanotubes incorporated in light-addressable potentiometric sensors. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, n. 33, p. 14765-14770, 2009.
7. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; ABOUZAR, M. H.; BÄCKER, M.; ZUCOLOTTI, V.; POGHOSSIAN, A.; OLIVEIRA JUNIOR, 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.

8. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ZUCOLOTTO, V. Processing of electroactive nanostructured films incorporating carbon nanotubes and phthalocyanines for sensing. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 24, p. 9050-9055, 2008.
9. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Bifunctional electroactive nanostructured membranes. *Electrochemistry Communications*, v. 9, n. 11, p. 2676-2680, 2007.
10. SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; GASPAROTTO, L. H. S.; CRESPILO, F. N.; CARVALHO, A. J. F.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Physicochemical properties and sensing ability of metallophthalocyanines/chitosan nanocomposites. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 110, p. 22690-22694, 2006.
11. CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CARVALHO, A. J. F.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Using electrochemical data to obtain energy diagrams for layer-by-layer films from metallic phthalocyanines. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 1, n. 4, p. 151-159, 2006.
12. CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTO, V.; SIQUEIRA JUNIOR, J. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Immobilization of humic acid in nanostructured layer-by-layer films for sensing applications. *Environmental Science and Technology*, v. 39, n. 14, p. 5385-5389, 2005.

Apêndice B

TÉCNICAS DE PROJEÇÃO DE DADOS

A técnica de projeção de dados é uma ferramenta computacional para análise de dados multidimensionais. Esta técnica mapeia dados de um espaço multidimensional \mathfrak{R}^m ($m > 3$) e os projeta em um espaço visual \mathfrak{R}^p ($p = \{1, 2, 3\}$), procurando preservar, dentro do possível, a similaridade ou relações de vizinhança entre as instâncias (objetos) de dados (86). Uma representação gráfica é criada para visualizar estruturas ou padrões de similaridade, tais como relações de elementos similares ou entre grupos.

A forma como a distância entre os objetos multidimensionais é calculada desempenha papel central na aplicação das técnicas de projeção. Formalmente, pode ser definida como: dada $\delta(x_i, x_j)$, a distância entre um par de instâncias e $d(f(x_i), f(x_j))$ uma distância, normalmente euclidiana, entre suas projeções para \mathfrak{R}^p , a técnica de projeção é uma função $f: \mathfrak{R}^m \rightarrow \mathfrak{R}^p$, que visa a minimizar $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(x_j))|$, $\forall x_i, x_j \in \mathfrak{R}^m$ (xx). Usando a capacidade visual humana, é possível explorar dados em muitas dimensões, para verificar se os grupos de instâncias semelhantes correspondem à expectativa do usuário. Ou seja, se os grupos de dados originais que se sabe são similares são de fato separados dos demais. De forma geral, o resultado de uma projeção multidimensional é um conjunto de pontos na reta, plano (utilizado na tese) ou volume, sem perda de generalidade. Idealmente, pontos posicionados próximos entre si devem ser similares, de acordo com a distância (dissimilaridade) escolhida (δ). Por outro lado, pontos projetados distantes representam objetos não relacionados, ou dissimilares (86).

Existem várias técnicas de projeção de dados com diferentes abordagens para minimizar a diferença $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(x_j))|$ (86). No sistema descrito no capítulo 8, em particular, utilizamos a técnica *Interactive Document Map (IDMAP)*. Inicialmente concebido para criar representações visuais de coleções de documentos, o IDMAP compreende duas etapas principais: Primeiro, as instâncias m-dimensionais são projetadas em um espaço bidimensional com uma abordagem de redução de dimensão muito rápida, chamada *FastMap* (86). Em segundo lugar, o posicionamento inicial das instâncias no gráfico em duas dimensões é melhorado

com uma estratégia chamada *Force Scheme* (86). O *FastMap* mapeia os dados m -dimensional para um espaço p -dimensional, projetando as instâncias em p direções ortogonais entre si. A idéia é projetar repetidamente as instâncias para espaços hiperplanos p , em que as coordenadas de cada dimensão p são dadas pela projeção dos dados m -dimensional em linhas retas pertencentes a estes hiperplanos. O *Force Scheme* imita o comportamento de atração e repulsão de forças para melhorar o posicionamento.

O raciocínio por trás dessa estratégia é o seguinte: dado $Y = (y_1, y_2, \dots, y_n)$ como projeção inicial de um conjunto de dados m -dimensional $X = (x_1, x_2, \dots, x_n) \in \mathbb{R}^m$, para cada instância projetada $y_i \in Y$, um vetor $\vec{v}_{ij} = (y_j - y_i), \forall y_i \neq y_j$ é calculado; então, y_i é movido na direção de \vec{v}_{ij} . A quantidade de movimento é proporcional à diferença entre a distância $d(y_i, y_j)$ entre as instâncias projetadas e da distância ideal $\delta(x_i, x_j)$. Uma iteração da *Force Scheme* ocorre quando esse processo é aplicado a todas as instâncias. Por iterações sucessivas deste algoritmo, a diferença $|\delta(x_i, x_j) - d(y_i, y_j)| \forall y_i, y_j \in \mathbb{R}^p$ é gradualmente reduzida, resultando em uma projeção mais precisa. A descrição detalhada sobre a montagem desse algoritmo, assim como o emprego e aplicação das diferentes técnicas são encontradas na ref. 86.

Nos experimentos relatados no capítulo 8 $\delta(x_i, x_j)$ é definido como a função de distância euclidiana, de forma que pudéssemos avaliar o posicionamento das instâncias. O regime de força foi executado até que o sistema de forças de atração e repulsão atingisse um estado estável, ou quando um número fixo de iterações (normalmente 50) fosse realizado.

