

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Marília de Campos Bataglini

**BIOSENSORES DE HEMOMETABÓLITOS
BASEADOS EM ISFETs HÍBRIDOS
BIOORGÂNICOS**

Itajubá, junho de 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Marília de Campos Bataglini

**BIOSENSORES DE HEMOMETABÓLITOS
BASEADOS EM ISFETs HÍBRIDOS
BIOORGÂNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia como requisito parcial à obtenção do título de *Mestre em Materiais para Engenharia*

B328b

Área de concentração: não metais

Orientador: Prof. Demétrio A. Werner Soares, Dr.

Junho de 2013

Itajubá

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Mauá
Bibliotecária Jacqueline Rodrigues de Oliveira Balducci- CRB_6/1698

Bataglini, Marília de Campos
Biossensores de Hemometabolitos baseado em ISFET'S
híbridos bioorganicos./ Marília de Campos Bataglini. – Itajubá,
(MG) : [s.n.], 2013.
71 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Demétrio Artur Werner Soares.
Co-orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio A. de Queiroz.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Itajubá.

1. Biossensor. 2. ISFET. 3. Glicose. I. Soares, Demétrio
Artur Werner, orient. II. Queiroz, Alvaro Antonio A. de. III.
Universidade Federal de Itajubá. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Marília de Campos Bataglini

**BIOSENSORES DE HEMOMETABÓLITOS
BASEADOS EM ISFETs HÍBRIDOS
BIOORGÂNICOS**

Dissertação aprovada por banca examinadora em de junho de 2013, conferindo ao autor o título de *Mestre em Materiais para Engenharia*

Banca Examinadora:

Prof. Demétrio A. Werner Soares, Dr (Orientador)

Prof. Wagner Souza Machado

Prof. Egon Luiz Muller Jr.

Prof. Álvaro A. A. de Queiróz

Itajubá

2013

RESUMO

Neste trabalho, foi realizado um estudo da caracterização elétrica do biossensor de glicose baseado em transistor de efeito campo sensível à íons(ISFETs), utilizando um eletrodo sensível (membrana de poliglicerol dendrítico eletrofiado -PGLD-f-PEGDE- com enzima imobilizada sobre um vidro de óxido de estanho e índio -ITO) no papel de porta do transistor e um eletrodo de referência padrão de Ag/AgCl. A partir das curvas I_xV obtidas, foram empregados dois métodos reportados na literatura (extrapolação linear para obtenção da tensão de limiar e segunda derivada para obtenção da tensão de limiar) com o objetivo de obter a sensibilidade dos ISFETs (mV/mM) e comparar com os valores de sensibilidade, para biossensores baseados em ISFETs, reportados na literatura. Além da caracterização elétrica, um estudo de termogravimetria (TGA) e micrografias (MEV) foram realizados nas membranas dendríticas de PGLD-f-PEGDE e enzima imobilizada na membrana de PGLD-f-PEGDE, respectivamente. O objetivo da análise termogravimétrica (TGA) foi de analisar o comportamento térmico do dendrímero durante o aquecimento do mesmo e poder aferir uma faixa de temperatura em que ele permanece estável. A estrutura física do dendrímero pode ser observada por meio das micrografias obtidas pelo MEV. Como resultados se obteve uma sensibilidade de 6,43 mV/mM, uma estabilidade térmica do dendrímero até 250°C, duas etapas de perda de massa do mesmo; e se observou a estrutura de nanofibras do PGLD-f-PEGDE eletrofiado.

Palavras-chave: ISFET, Biossensor, Tensão de limiar, Sensibilidade.

ABSTRACT

In this work, a study of the electrical characterization of the glucose biosensor based on ISFETs using a sensitive electrode (membrane HPGL-f-PEGDE enzyme immobilized on a glass ITO) in the role of the port transistor and a reference electrode standard Ag / AgCl. From the curves obtained I_xV were employed two methods reported in the literature (linear extrapolation to obtain the threshold voltage and second derivative to obtain the threshold voltage) in order to obtain the sensitivity of ISFETs (mV / mM) and compare with the sensitivity for biosensors based on ISFETs, reported in the literature. In addition to the electrical characterization, a study by thermogravimetric analysis (TGA) and micrographs (SEM) were performed on the membranes of dendritic HPGL-f-PEGDE and the immobilized enzyme membrane HPGL-f-PEGDE, respectively. The goal of thermogravimetric analysis (TGA) was to analyze the thermal behavior of the dendrimer during heating of it and be able to assess a temperature range in which it remains stable. The physical structure of the dendrimer can be observed by means of SEM micrographs. As results are obtained a sensitivity of 6.43 mV / mM, two phases of mass loss of the same, and noted the structure of the nanofiber HPGL-f-PEGDE electrospun.

Keywords: ISFET, Biosensor, Threshold voltage, Sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1- Esquema de um biossensor.	18
Figura 2-2- Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.	21
Figura 2-3- Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase	22
Figura 2-4- Ilustração de um dendrímero de 3º geração	23
Figura 2-5 - Diferentes tipos de síntese de dendrímeros.	26
Figura 2-6 Estrutura do poliglicerol dendrítico de geração 3 (PGLD G3).	27
Figura 2-7- Representação esquemática do MOSFET (a), ISFET (b), do símbolo de ambos em um circuito (c) e do eletrodo de referência (d).	27
Figura 2-8- Estrutura de um transistor com canal tipo n- NMOS	28
Figura 2-9 - Transistor NMOS em acumulação	29
Figura 2-10- Camada de depleção em um transistor NMOS	30
Figura 2-11 - Curva I_{DS} x V_{DS} típica do transistor NMOS.	31
Figura 2-12 - NMOS operando na região de saturação com <i>pinch-off</i>	32
Figura 2-13-Curva I_{DS} x V_{DS} onde V_{GS} é constante (a) curva I_{DS} x V_{GS} para $V_{DS} = 100$ mV (b)	33
Figura 3-1 Ilustração do processo de síntese do PGLD (G=3) a partir do glicerol (G=0) e funcionalização do dendrímero com grupos epoxídicos. Os reagentes são descritos a seguir: Bromoeteno (a), Brometo de tetrabutyl amônio (b), Hidróxido de sódio (c), N-metil Morfolina (d), tetróxido de ósmio (e), Diglicidil éter do poli(etileno glicol) (PEGDE) (n= 10), Na° = sódio metálico e DMSO = dimetilsufóxido.	40
Figura 3-2 Espectros H-RMN (A) e C-RMN (B) do PGLD (G=3) sintetizado e seu perfil cromatográfico CLAE (C). CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência.	41
Figura 3-3 Espectro Maldi-Tof do PGLD (G3)	42

Figura 3-4 Ilustração da morfologia do PGLD-f-PEGDE eletrofiado.	43
Figura 3-5 Ilustração do processo de imobilização da enzima na superfície das nanofibras eletrofiadas.	44
Figura 3-6 Curvas de inativação térmica a 50°C comparando a enzima imobilizada (A) e a enzima livre (B). As medidas das atividades relativas foram efetuadas utilizando-se o método da o-dianisidina.	45
Figura 3-7 Sistema de medição para caracterização elétrica do biossensor.	47
Figura 4-1 Curva Termogravimétrica e DTG para PGLD-f-PEGDE . Taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera inerte de N ₂	49
Figura 4-2 Curva I _{DS} x V _{ref} para diversas concentrações de glicose.	50
Figura 4-3 Curva I _{DS} x V _{ref} com V _{DS} = 50 [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 4 mM.	52
Figura 4-4 Curva V _T x Concentração de glicose	53
Figura 4-5 Curva I _{DS} x V _{ref} com V _{DS} = 50 [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 4 mM.	54
Figura 4-6 Curva V _T x Concentração de glicose.	55
Figura 4-7 Imagens MEV da malha de PGLD-f-PEGDE eletrofiada.	56
Figura 4-8 Micrografia MEV da malha de PGLD-f-PEGDE eletrofiada (filme superficial).	57
Figura A.1 Curva I _{DS} x V _{ref} com V _{DS} = 50 [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 8 mM.	61
Figura A.2 Curva I _{DS} x V _{ref} com V _{DS} = 50 [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 10 mM.	62
Figura A.3 Curva I _{DS} x V _{ref} com V _{DS} = 50 [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 12 mM.	63

Figura A.4 Curva I_{DS} x V_{ref} com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 8 mM. 64

Figura A.5 Curva I_{DS} x V_{ref} com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 10 mM. 65

Figura A.6 Curva I_{DS} x V_{ref} com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 12 mM. 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1- Classificação de sensores e biossensores a partir do transdutor utilizado.	18
Tabela 4-1 Valores de V_T obtidos pela extrapolação linear	52
Tabela 4-2Valores de V_T obtidos pelo método da segunda derivada utilizando $V_{DS} = 50$ mV	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI	Circuito Integrado
EGFET	<i>Extended gate Field Effect Transistor</i>
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GOx	Glicose oxidase
ISFET	<i>Ion Sensitive Field Effect Transistor</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MOS	Metal – Óxido – Semicondutor
MOSFET	<i>Metal – Oxide – Semiconductor Field Effect Transistor</i>
NMOS	Estrutura Metal – Óxido – Semicondutor canal N
PGLD	Poliglicerol dendrítico
SEGFET	<i>Separated Extended gate Field Effect Transistor</i>
TGA	Análise termogravimétrica
PEGDE	Diglicidil éter do poli(etileno glicol)

LISTA DE SÍMBOLOS

C_{ox}	Capacitância do óxido de porta (F/cm ²)
D	Dreno
$d_{máx}$	Largura máxima de depleção de cargas no silício (μm)
E_{ref}	Potencial do eletrodo de referência (V)
E	Potencial de eletrodo (V)
ϵ_{ox}	Permissividade do óxido (3,9 x 8,854 x 10 ⁻¹⁴ F/cm)
ϵ_{si}	Permissividade do silício (11,7 x 8,854 x 10 ⁻¹⁴ F/cm)
G	Porta
I_{DS}	Corrente entre fonte e dreno (A)
K	Constante de Boltzmann (1,381 x 10 ⁻²³ J/K)
L	Comprimento de canal do transistor (μm)
μ	Mobilidade dos portadores (cm ² /V.s)
N	Designação de material dopado com impurezas doadoras
N_a	Concentração de impurezas aceitadoras (cm ⁻³)
P	Designação de material dopado com impurezas aceitadoras
q	Carga do elétron (1,602 x 10 ⁻¹⁹ C)
Q_{SS}	Cargas efetivas no óxido (C/cm ²)
S	Fonte
V_{DS}	Tensão entre dreno e fonte (V)
V_{FB}	Tensão de banda plana (V)
V_{GS}	Tensão entre porta e fonte (V)
V_{ref}	Tensão do eletrodo de referência (V)
V_T	Tensão de limiar (V)
ϕ_F	Potencial de Fermi (V)
ϕ_S	Potencial/Função trabalho do semiconductor (V)
ψ	Potencial na interface dielétrico-eletrólito (V)
W	Largura de canal do transistor (μm)
X_{ox}	Espessura do óxido de porta (nm)

χ_{sol}

Potencial superficial dipolar da solução (V)

ϕ_{MS}

Diferença de função trabalho entre metal e semicondutor (V)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Biossensores	17
2.1.1	Biossensores enzimáticos	19
2.1.2	Biossensores de glicose	21
2.2	Dendrímeros	22
2.2.1	Propriedades dos dendrímeros	23
2.2.2	Síntese de dendrímeros	24
2.2.3	Dendrímero utilizado neste trabalho: PGLD	26
2.3	A estrutura do transistor de efeito de campo sensível à íons – ISFET	27
2.3.1	Transistor MOSFET	28
2.3.1.1	Funcionamento e operação do MOSFET	28
2.3.1.2	Curvas características do NMOSFET	32
2.3.1.3	Extração da Tensão de Limiar do Transistor NMOS	34
2.3.2	V_T e a variação do pH de um eletrólito	35
2.3.3	Sensibilidade dos ISFET's	35
2.3.4	EGFET	36
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	37
3.1	Materiais	37
3.2	Síntese do PGLD e imobilização enzimática	39
3.3	Métodos de Medição	45
3.3.1	Caracterização elétrica	46
3.3.2	TGA	47

3.3.3	MEV	48
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1	Análise termogravimétrica e obtenção da porcentagem de perda de massa.	49
4.2	Análise dos métodos de obtenção da sensibilidade do ISFET	50
4.2.1	Método da Extrapolação Linear	51
4.2.2	Método da Segunda Derivada	53
4.3	Análise das microscopias eletrônicas de varredura	55
5.	CONCLUSÕES	58
6.	TRABALHOS FUTUROS	60
	APÊNDICE A	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do último século se pôde constatar o aumento da longevidade humana e, por consequência, o crescimento do número de indivíduos que atingem uma idade crítica para o desenvolvimento de inúmeras doenças relacionadas, em sua maioria, ao envelhecimento. Hipercolesterolemia, hiperglicemia e elevação nos níveis de uréia no sangue são exemplos dessas doenças. Tais doenças necessitam de monitoramento contínuo.

Por essa razão, nas últimas duas décadas o desenvolvimento de biossensores para a monitoração de hemometabólitos tem se intensificado, e visando a miniaturização para diversas aplicações no campo da nanomedicina esforços têm sido feitos para aliar os biossensores às técnicas comuns de microeletrônica.

A história dos biossensores inicia-se em 1962 quando Clark e Lyons sugeriram, em um artigo tratando sobre o monitoramento contínuo do sangue, que uma camada muito fina de enzima solúvel poderia ser retida na superfície de um eletrodo de oxigênio, com o uso de uma membrana dialítica. (CLARK, L. C.; LYONS, 1962) Estes autores foram os primeiros a introduzirem o termo “eletrodo enzimático”. Já em 1967, Updike e Hicks, foram os primeiros a utilizar o eletrodo de oxigênio sugerido por Clark para imobilizar a enzima glicose oxidase em gel de poliacrilamida para a medição do sensoriamento de glicose em soluções biológicas e em tecidos *in vitro*. (TOMALIA, D. A.; NAYLOR, A. M.; GODDARD III, W. A., 1990)

No campo da microeletrônica, as primeiras pesquisas com a utilização de substrato de silício para aplicações biomédicas tiveram início na década de 60. Bergveld (BERGVELD, P., 2003), introduziu o uso dos ISFETs como substitutos aos eletrodos de pH (de vidro) convencionais, devido à possibilidade de se medir concentrações de íons (H^+ , NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) em volumes muito pequenos, e por possuírem uma resposta muito mais rápida. Um ISFET consiste de um transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor (MOSFET) cujo eletrodo de porta foi substituído por uma membrana sensível a íons, um eletrodo de referência e a solução. Apresenta várias vantagens tais como: tamanho reduzido, durabilidade e reprodutibilidade. O potencial de íons na interface membrana/solução é medido pela mudança de corrente através do canal do MOSFET.

Assim, a construção de biossensores é possível com a modificação da porta do ISFET com a utilização de agentes biológicos. Com o acréscimo de uma camada enzimática, obtém-se um biossensor enzimático baseado em transistor de efeito de campo. Caras e Janata

(CARAS, S.D., JANATA, J ,1980) , em 1980, foram os primeiros a utilizar biossensores baseados em transistor de efeito de campo para detecção de penicilina.

O objetivo desse trabalho foi obter biossensores baseados em ISFETs para a monitoração do hemometabólito glicose. Para tal, um trabalho de caracterização elétrica dos ISFETs, na detecção da concentração do hemometabólito glicose através de medidas elétricas foi desenvolvido. A partir das medidas elétricas se pode obter a sensibilidade dos ISFETs quanto ao material de porta em contato com o hemometabólito. A confiabilidade dos resultados foi garantida pelo uso de um eletrodo de referência convencional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossensores

Um sensor é um dispositivo que responde a um estímulo físico/químico de maneira específica e mensurável analogicamente. Os sensores podem ser divididos em sensores físicos, químicos e bioquímicos. Sensores físicos servem para medição de parâmetros físicos tradicionais, tais como temperatura, pressão, umidade, e por vezes, não são considerados como verdadeiros sensores. Já os sensores químicos são dispositivos compactos miniaturizados que transformam a informação química, tal como uma variação de concentração, em um sinal analiticamente útil e mensurável, como por exemplo um sinal de corrente elétrica.

Biossensores são sensores químicos especiais, em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico. O sistema de reconhecimento biológico (bio-receptor), geralmente uma proteína do receptor, anticorpo, enzima, em contato íntimo a um transdutor, irá converter a concentração de um determinado analito em sinal de saída físico mensurável, com uma sensibilidade definida. Portanto, um biossensor tem como finalidade produzir um sinal proporcional à concentração da espécie a ser detectada ao interagir com o bio-receptor. (OLIVEIRA,2008) Um esquema de um biossensor pode ser visto na **Figura 2.1**, a qual mostra os componentes constituintes do dispositivo completo. Estes podem ser classificados quanto ao tipo de bio-receptor em biossensores enzimáticos, imunossensores, genossensores, etc, e também podem ser classificados de acordo com o método de detecção em transdutores ópticos, elétricos, eletroquímicos e térmicos, entre outros. Na **Tabela 2.1** constam os principais tipos de transdutores e suas descrições. (OLIVEIRA,2008)

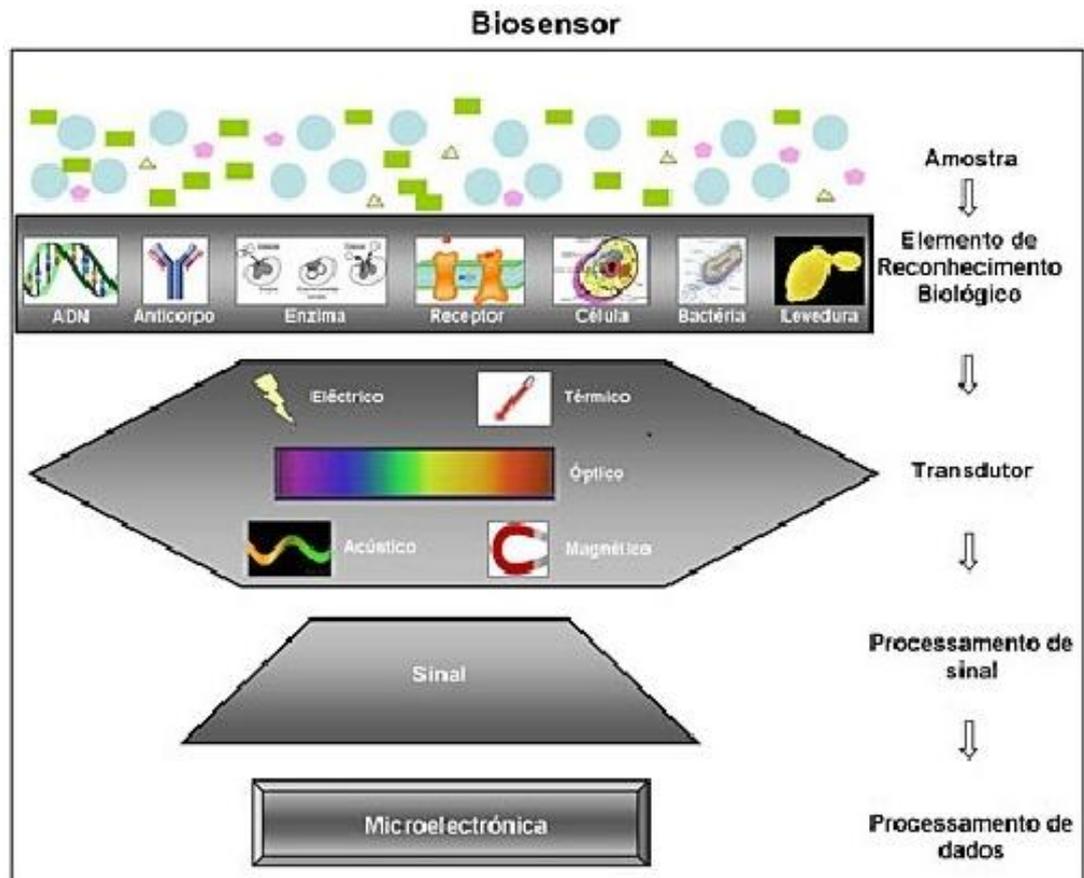


Figura 2.1- Esquema de um biosensor.
Fonte: (OLIVEIRA,2008)

Tabela 2-1- Classificação de sensores e biosensores a partir do transdutor utilizado. Fonte: (OLIVEIRA,2008)

Tipos de Transdutores	Descrição
Ópticos	O sinal é devido às interações entre o analito e a energia radiante.
Eletroquímicos	O sinal formado é devido a uma interação eletroquímica entre o analito e o eletrodo
Térmicos	Dispositivos capazes de medir a diferença de temperatura
Piezelétricos	Dispositivos que transformam a diferença de massa que ocorre sobre o eletrodo modificado com propriedades piezelétricas

Biossensores eletroquímicos são os mais comuns para o uso em análises clínicas. Esses podem ser amperométricos, potenciométricos, condutimétricos ou impedancimétricos. Dentre esses, os amperométricos são a classe mais difundida, seja pela fácil manipulação, seja pelo fato de a concentração do analito ser proporcional a alteração da corrente elétrica.

Biossensores amperométricos são baseados na medida de corrente resultante da oxidação ou redução de espécies eletroativas. Durante as análises, o potencial é mantido constante, as alterações de corrente verificadas são correlacionadas diretamente com a concentração das espécies eletroativas presentes, com a sua produção, ou com a taxa de consumo na camada biocatalítica. (SANTOS, Jaciara C. de Carvalho, 2012)

Os sensores amperométricos podem ser classificados, de acordo com o processo envolvido na transferência de carga, em três principais grupos: primeira, segunda e terceira geração. A seguir são apresentadas as descrições de cada grupo. (SANTOS, Jaciara C. de Carvalho, 2012)

- Primeira geração: Sensores baseados na medida da concentração de substratos naturais ou de um produto de uma reação enzimática;
- Segunda geração: Sensores que utilizam mediadores como transportadores de elétrons do centro ativo da enzima para o eletrodo;
- Terceira geração: Sensores que utilizam transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo.

Neste trabalho foram utilizados biossensores de primeira geração.

2.1.1 Biossensores enzimáticos

Há pelos menos meio século numerosos esforços vem sendo realizados para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos. Tal fato possibilitou o surgimento de novas técnicas de imobilização enzimática, novos materiais utilizados como matriz para imobilização enzimática e novas técnicas de transdução. Vários analitos de interesse, como a glicose, podem ser detectados por biossensores enzimáticos. (SANTOS, Jaciara C. de Carvalho, 2012)

A grande vantagem da utilização de biossensores enzimáticos reside no fato de que as reações enzimáticas são altamente específicas, de modo que biossensores baseados nestes biocatalisadores podem ser utilizados mesmo na presença de outras substâncias na amostra. Assim, dispensam-se os processos de separação e purificação das amostras, muitas vezes

necessários em análises químicas. Ainda que a atividade enzimática seja reduzida até certo ponto pela imobilização, biossensores enzimáticos têm vantagem como a possível reutilização do mesmo. (SANTOS, Jaciara C. de Carvalho,2012)

A possibilidade de reutilização da enzima deriva de se ter diferentes técnicas de imobilização da mesma, que são:

a. **Adsorção física**

Método simples e rápido de imobilização enzimática, onde a enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, através de interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas.(LAGOEIRO,Leonardo,2013) Nesse método a atividade enzimática observada é próxima à atividade natural da enzima. Vantagens: simplicidade e baixo custo experimental.(MARQUES, P. R. B. D. O.;YAMANAKA, H,2008)

b. **Ligação covalente**

Neste caso a retenção da enzima na superfície do suporte é efetuada por ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. Neste caso há perda de parte da atividade enzimática devido a mudanças nas conformações dos sítios ativos das enzimas. (MARQUES, P. R. B. D. O.;YAMANAKA, H,2008)

c. **Entrecruzamento**

Este método é baseado na formação de um reticulado das moléculas da enzima de modo a formar uma rede rígida (por se ter uma ligação enzima-enzima mais sólida). (MARQUES, P. R. B. D. O.;YAMANAKA, H,2008)

d. **Encapsulação**

Método em que é feito um confinamento da enzima em uma membrana localizada na superfície do eletrodo. Tal membrana irá reter a enzima de forma a permitir livre difusão do substrato e dos produtos da reação da mesma. (MORAIS, Marcela Cristina de,2008)

2.1.2 Biossensores de glicose

O desenvolvimento de biossensores para o monitoramento de glicose no sangue é um importante avanço no sistema de monitoração pelos pacientes diabéticos. Hoje, testes do nível de glicose no sangue podem ser feitos de forma rápida e prática através de biossensores comerciais. Estes dispositivos (biossensores amperométricos) baseiam-se na medida da corrente elétrica gerada pela oxidação da glicose feita pela enzima glicose oxidase.

A glicose oxidase (GOx) é uma flavoproteína, produzida naturalmente por alguns fungos e insetos, que catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em d-gluconolactona. Esta enzima contém um grupo prostético, FAD – flavina adenina dinucleótido - que confere a proteína a capacidade de catalisar reações de oxidação-redução.

A reação ocorre em duas etapas, na primeira a coenzima oxidada sofre uma redução a $FADH_2$, que é acompanhada pela oxidação da β -D-glicose a d-gluconolactona. No segundo passo a flavina reoxida-se por ação de oxigênio, que, por sua vez, se converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A **Figura 2.2** mostra a reação de oxidação da glicose pela GOx.(MACDOWALL, Jennifer, 2013; SANTOS, Alessandra Nogueira ,2008)

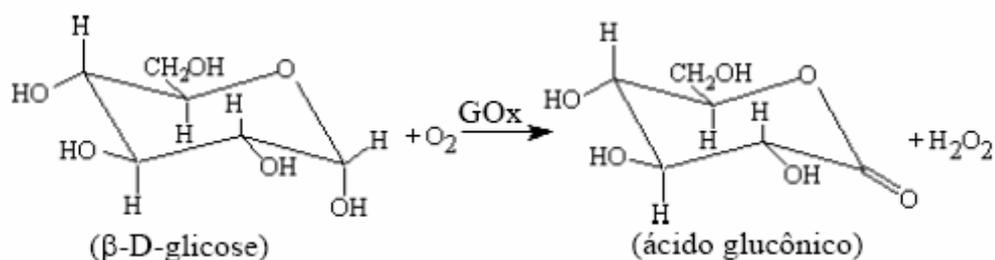


Figura 2.2- Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.
Fonte: (SANTOS, Alessandra Nogueira,2008)

A **Figura 2.3** representa a simulação computacional da molécula de GOx, obtida a partir do fungo *Aspergillus niger*, através de um modelo de fitas. Em vermelho e preto pode-se ver o sítio ativo desta enzima, no qual a FAD está contida.

O pH ótimo da glicose oxidase é 5,5. Entretanto possui uma faixa de boa atividade entre pH 4-7.(YIN, L.; CHOU, J.; CHUNG, W.; SUN, T.; HSIUNG, S,2000)

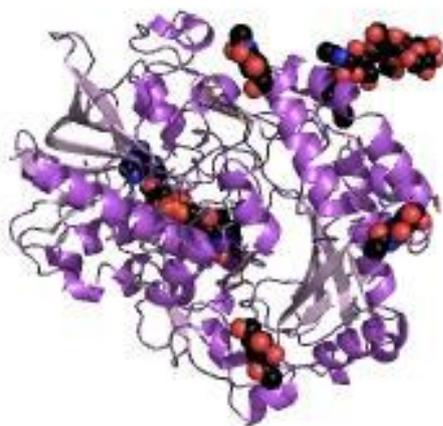


Figura 2.3- Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase
Fonte:(SANTOS, Jaciara C. de Carvalho,2012)

2.2 Dendrímeros

Dendrímeros são macromoléculas poliméricas de tamanhos nanométricos de 10 a 30 Å, extremamente ordenadas, globulares, com grande número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos, com características que os tornam úteis em sistemas biológicos. O primeiro dendrímero, reportado em 1985 por Tomalia e colaboradores, foi o de poliamidoamina, conhecido com a sigla PAMAM.(LAPEN,2013)

Os dendrímeros, como estruturas altamente ramificadas e simétricas, diferem dos polímeros clássicos no que se refere à simetria, grau de ramificação, funcionalização terminal e monodispersão. (LAPEN,2013) Assim, compreendem estruturas controladas, com uniformidade molecular, superfície multifuncional (grupos funcionais terminais) e massa molecular única, características interessantes para aplicação destes na imobilização de enzimas, que são biocatalisadores essenciais para o desenvolvimento de biossensores. Compreendem três partes: uma superfície com elevado número de sítios reativos, uma camada de ligações repetidas partindo do centro e o foco central ou núcleo. São classificados em gerações, ou seja, pelo número de ramificações, que crescem a partir do núcleo. Assim, um dendrímero geração N é aquele onde N unidades monoméricas foram adicionadas a partir do núcleo (designado geração 0), conforme ilustrado na **Figura 2.4**. Esta adição torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter uma estrutura globular e densa.

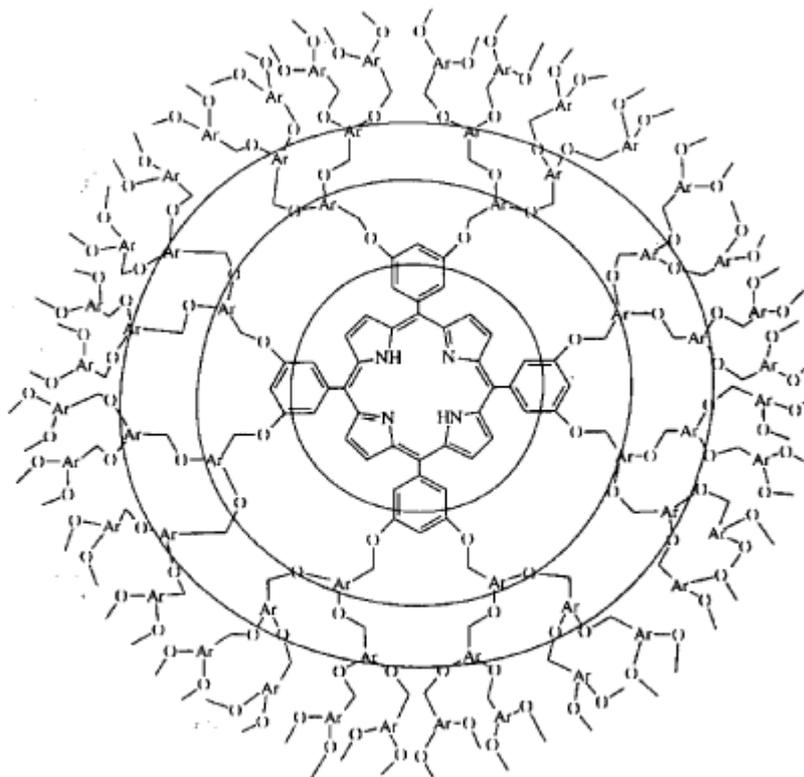


Figura 2.4- Ilustração de um dendrímero de 3º geração

Fonte: (MONTANARI, M. L.C.; MONTANARI, C. A.; PILÓ-VELOSO, D., 1998)

2.2.1 Propriedades dos dendrímeros

As principais propriedades dos dendrímeros são : (SANTOS, Alessandra Nogueira, 2008)

- a. Dendrímeros em solução formam esferas concêntricas
- b. A viscosidade dos polímeros aumenta com o aumento do número de monômeros, mas a partir de uma certa geração (em geral, a partir da geração 4), a viscosidade volta a diminuir, de tal forma que os dendrímeros de geração mais alta apresentam mais grupos terminais, porém menor viscosidade que os dendrímeros de geração mais baixa. Esta é uma das características mais importantes dessas macromoléculas.
- c. Possuem uma alta solubilidade, micibilidade e reatividade por terem muitas cadeias terminais. A sua solubilidade é fortemente influenciada pela natureza dos grupos da superfície. Os dendrímeros terminais em grupos hidrofílicos são solúveis em solventes polares

enquanto os dendrímeros terminais com grupos hidrofóbicos são solúveis em solventes apolares.

d. A massa molar, M , dos dendrímeros é expressa pela seguinte relação matemática:

$$M = M_c + n_c \left[M_m \left(\frac{n_m^G - 1}{n_m - 1} \right) + M_t n_m^G \right]$$

sendo M_c a massa molar do núcleo, n_c é a multiplicidade do núcleo, M_m é a massa molar do monômero ramificado, M_t é a massa molar do grupo terminal, n_m é a multiplicidade da ramificação e G é o número de geração.

e. O aumento do número de grupos terminais é descrito por uma progressão geométrica:

$$Z = n_c \cdot n_m^G$$

onde n_c é a multiplicidade do núcleo e n_m é a multiplicidade da ramificação e G é o número de geração.

f. Capacidade de encapsulamento de moléculas na macromolécula interior devido a sua forma globular e a presença de cavidades internas.

g. O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros muito importantes para a determinação e explicação do comportamento físico desses sistemas macromoleculares. Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente apresentam uma menor área superficial, o que é indesejável para o projeto de biossensores. Já as macromoléculas de peso molecular muito elevado são pouco solúveis e, por isso, geralmente não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas. (BOSMAN, A.W.; JANSSEN, H.M.; MEIJER, E.W,1999; JAGDALE, S. C.;GAWALI, V. U.;CHEDE, S. M.;KUCHEKAR, B. S.;CHABUKSWAR, A. R.;LOKHANDE, P. D,2010)

2.2.2 Síntese de dendrímeros

Há dois métodos de preparação dos dendrímeros: o método divergente ou o método convergente. O método divergente, desenvolvido por Tomalia (TOMALIA, D. A.;NAYLOR, A. M.;GODDARD III, W. A, 1990), é aquele no qual o dendrímero cresce para fora de um núcleo central e o método convergente de Fréchet (HAWKER, C. J.;FRECHET, J. M. J,1990), é aquele no qual o dendrímero é sintetizado da periferia para o interior terminando no núcleo.

No método divergente, o dendrímero cresce para o exterior a partir de uma molécula de núcleo multifuncional.(JAGDALE, S. C.;GAWALI, V. U.;CHEDE, S. M.;KUCHEKAR, B. S.;CHABUKSWAR, A. R.;LOKHANDE, P. D,2010) A molécula central reage com moléculas de monômero reativas contendo um e dois grupos dormentes, dando origem ao dendrímero de primeira geração. A nova periferia da molécula é ativada para reações com mais monômeros. O processo é repetido por várias gerações, camada por camada.(SANTOS, Alessandra Nogueira,2008)

Os principais inconvenientes do método divergente são que as reações dos grupos terminais podem ficar incompletas, introduzindo defeitos na macromolécula. Para impedir a formação de defeitos, normalmente se utilizam grandes quantidades de precursores, o que dificulta a purificação do produto final.

Na síntese convergente, o dendrímero é construído por etapas, a partir das ramificações para o núcleo. O princípio básico do método envolve a construção de pequenos fragmentos denominados dendrons que sofrem policondensação e constituem o núcleo central e que evoluem para a formação final do dendrímero. O monômero de partida contém um grupo reativo de um lado da subunidade estrutural e um grupo terminal na outra extremidade formando, na geração final, a camada externa do dendrímero. Esse fragmento pode, então, reagir com grupos reativos do monômero, que também contém sítios protegidos. Depois da conversão para um novo grupo reativo a síntese pode ser continuada por reação com uma segunda unidade de repetição. A repetição do ciclo de reação leva à construção de grandes dendrons. A reação dos dendrons com grupos reativos de um núcleo terminal constitui o dendrímero final.(OLIVEIRA, Katharina C. Santos,2008)

Na **Figura 2.5** é mostrado o esquema idealizado das sínteses a partir dos métodos divergente e convergente.

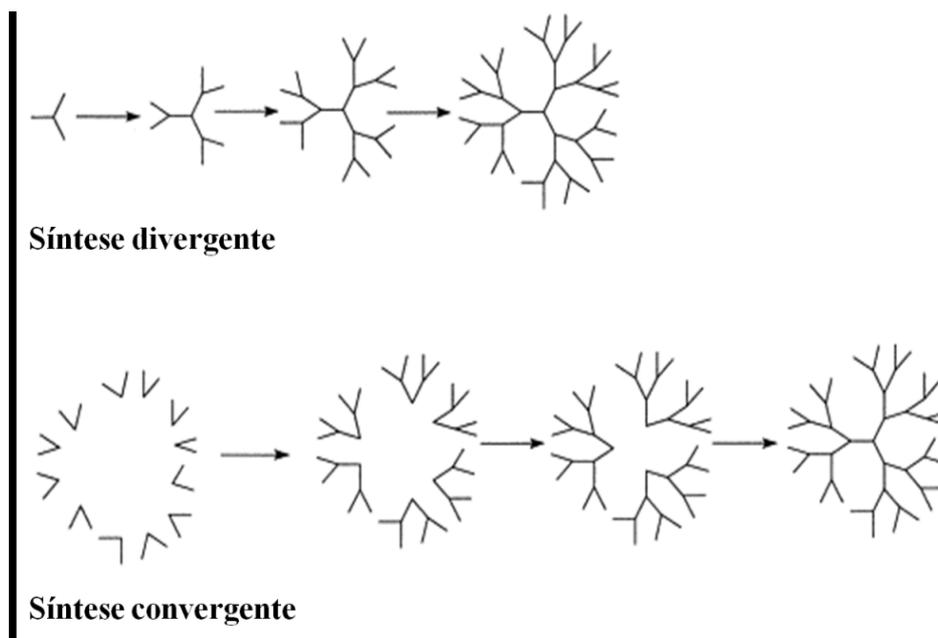


Figura 2.5 - Diferentes tipos de síntese de dendrímeros.
 Fonte: (SANTOS, Jaciara C. de Carvalho,2012)

2.2.3 Dendrímtero utilizado neste trabalho: PGLD

Um dendrímtero é considerado suporte ideal para utilização como biossensor se possuir características que não interfiram na atividade da enzima a ser imobilizada. Essa macromolécula dendrítica deve possuir alta funcionalidade, o que facilita a imobilização da enzima, baixo custo e biocompatibilidade.

Em nosso trabalho o dendrímtero utilizado foi o políglicerol dendrítico (PGLD). Ele é caracterizado pela combinação de uma arquitetura dendrítica bem definida, estável, compacta e por possuir elevada funcionalidade dos grupos terminais; o que leva a uma baixa dispersão do peso molecular. Ele é altamente solúvel em água e em solventes orgânicos polares e, em temperatura ambiente, ele é altamente viscoso. Além disso, o PGLD possui uma baixa temperatura de transição vítrea (T_g) e apresenta também uma alta densidade de grupos hidroxilas (-OH) locais. (GIAROLA, Vanessa. M.,2007) A Figura 2.6 ilustra o PGLD de geração 3 (G3).

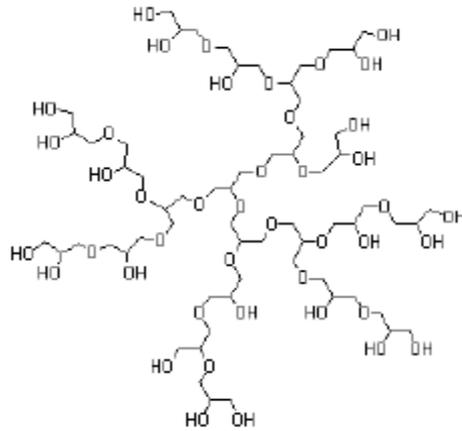


Figura 2.6 Estrutura do políglicerol dendrítico de geração 3 (PGLD G3).
Fonte: (GIAROLA, Vanessa. M.,2007)

2.3 A estrutura do transistor de efeito de campo sensível à íons – ISFET

O ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) - transistor de efeito de campo sensível a íons - é um dispositivo com características muito próximas do transistor MOSFET (Metal – Óxido- Semiconductor Field Effect Transistor)- transistor de efeito campo do tipo metal óxido semicondutor - sendo diferenciado em apenas um aspecto: a porta. O ISFET não apresenta o contato de porta como num dispositivo MOSFET convencional, conforme mostra a **Figura 2.7**.

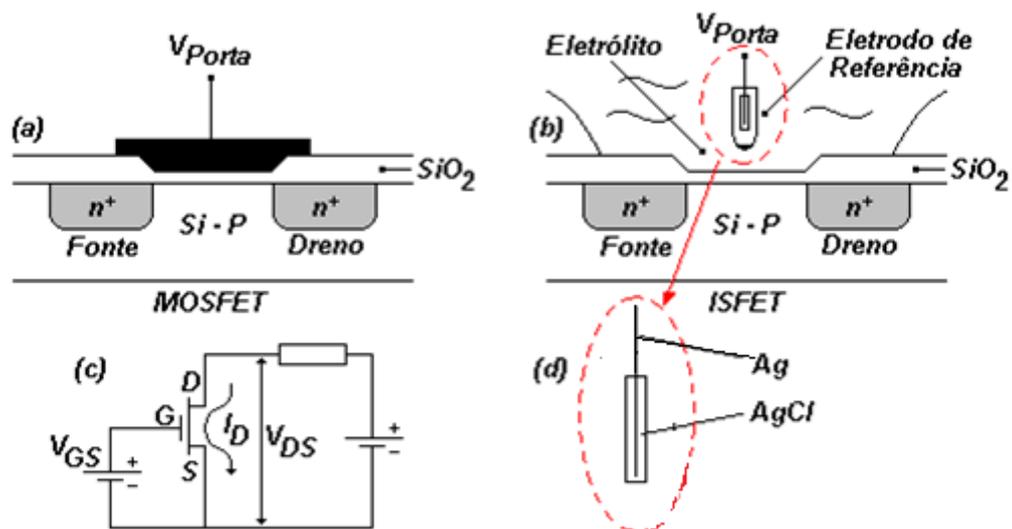


Figura 2.7- Representação esquemática do MOSFET (a), ISFET (b), do símbolo de ambos em um circuito (c) e do eletrodo de referência (d). Fonte: (SCAFF, Robson,2008)

Mas em muitos outros aspectos (princípio de funcionamento e operação, curva característica, etc) o ISFET possui uma semelhança grande com MOSFET, de modo que é interessante fazermos uma breve revisão do mesmo, onde também destacaremos as características que o diferencia do ISFET.

2.3.1 Transistor MOSFET

O MOSFET permitiu uma grande miniaturização dos circuitos, o que culminou no aumento da capacidade de processamento de informações. Ele é atualmente a base de toda a microeletrônica.[36] Assim, para entendermos a sua importância, vamos analisar os princípios de funcionamento e as curvas características do transistor MOSFET, estrutura na qual será baseada a exposição do ISFET.

2.3.1.1 Funcionamento e operação do MOSFET

A estrutura básica de um dispositivo MOSFET é ilustrada na **Figura 2.8**.

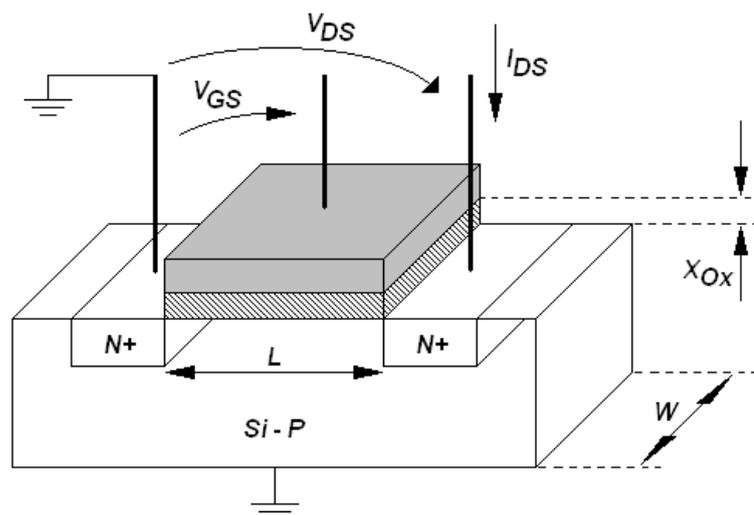


Figura 2.8- Estrutura de um transistor com canal tipo n- NMOS
Fonte: (SCAFF, Robson,2008)

Este transistor pode ser classificado segundo o portador predominante que pode ser elétron ou lacuna/buraco de acordo com o tipo de canal (tipo n ou tipo p, respectivamente)

do transistor. A corrente, por sua vez, circula entre fonte (em inglês, source) e dreno (em inglês, drain). Em um transistor com substrato do tipo p, as regiões de fonte e dreno devem ser do tipo n. Este é caso correspondente da **Figura 2.8**.

Para que haja circulação de corrente no dispositivo duas tensões são importantes parâmetros elétricos: a tensão V_{GS} (entre porta e fonte) e a tensão V_{DS} (entre dreno e fonte). Além disso, as dimensões mais importantes do transistor MOS são a espessura do óxido de porta (X_{Ox}), a largura do canal (W) e o comprimento de canal (L).

A condução no transistor NMOS (condução pelo canal tipo n) tipo enriquecimento, só acontece se a tensão de porta for maior que a tensão de faixa plana (V_{FB}). A tensão de faixa plana é definida como sendo o valor de tensão em que a função trabalho do metal (ϕ_M) e do semiconductor (ϕ_s) assumem a relação:

$$V_{FB} \leq 0 \text{ quando } \phi_M = \phi_s$$

$$V_{FB} \text{ qualquer valor para } \phi_M < \phi_s$$

o que significa dizer que V_{FB} é o valor de tensão em que não há concentração de portadores minoritários (elétrons livres) na superfície semiconductor/isolante. Assim, se $V_{GS} < V_{FB}$ são atraídos no substrato portadores majoritários (buracos). A esta situação dá-se o nome de acumulação, **Figura 2.9**. (SCAFF, Robson,2008)

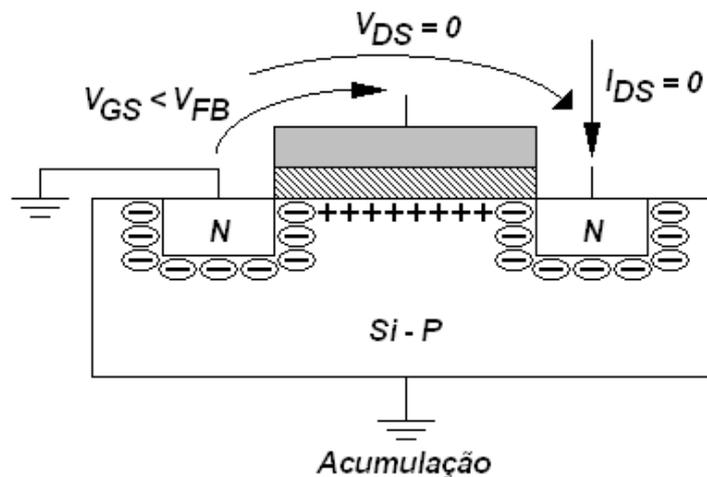


Figura 2.9 - Transistor NMOS em acumulação
Fonte : (SCAFF, Robson,2008)

Agora, se $V_{GS} > V_{FB}$ mas $V_{GS} < V_T$, onde V_T é a tensão de limiar do transistor, ou seja, é a tensão de porta a partir da qual ocorre a inversão de portadores formando a região de canal, no qual há circulação de corrente entre dreno e fonte (I_{DS}) se $V_{DS} \neq 0$, aparece a

camada de depleção, **Figura 2.10**. Esta é a situação em que os buracos são repelidos da superfície do substrato, deixando apenas cargas fixas negativas em sua proximidade.

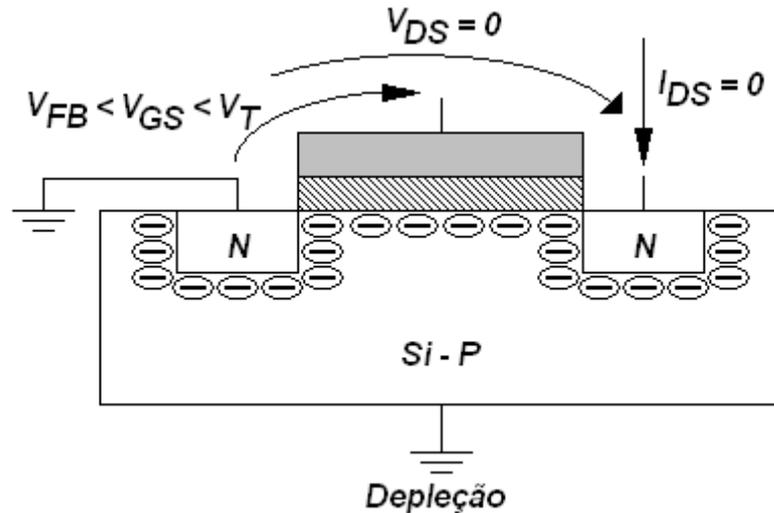


Figura 2.10- Camada de depleção em um transistor NMOS
Fonte: (SCAFF, Robson,2008)

Para $V_{GS} > V_T$ e $V_{DS} \neq 0$, ocorre inversão dos portadores junto à interface dielétrico/silício formando um canal entre fonte e dreno do transistor NMOS. A partir desse ponto, há a passagem de corrente entre fonte e dreno. As condições de operação do transistor são estabelecidas para a situação em que o canal já está formado. A largura da região de depleção junto à fonte permanece aproximadamente constante com a variação de V_{DS} . (SCAFF, Robson,2008)

O NMOS possui duas condições possíveis de operação: triodo e na região de saturação. Na primeira, uma tensão V_{DS} é mantida constante em um valor não nulo e menor do que $(V_{GS} - V_T)$, o canal de condução é mantido ininterrupto e a corrente nesta situação pode ser definida como:

$$I_{DS} = C_{OX} \mu \frac{W}{L} \left[(V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{V_{DS}^2}{2} \right] \quad (1)$$

onde C_{OX} é a capacitância do óxido de porta e μ é a mobilidade dos portadores.

Esta equação só é válida para $V_{DS} \leq (V_{GS} - V_T)$. (SCAFF, Robson,2008) A curva característica do transistor NMOS nas duas condições de operação é ilustrada na **Figura 2.11**.

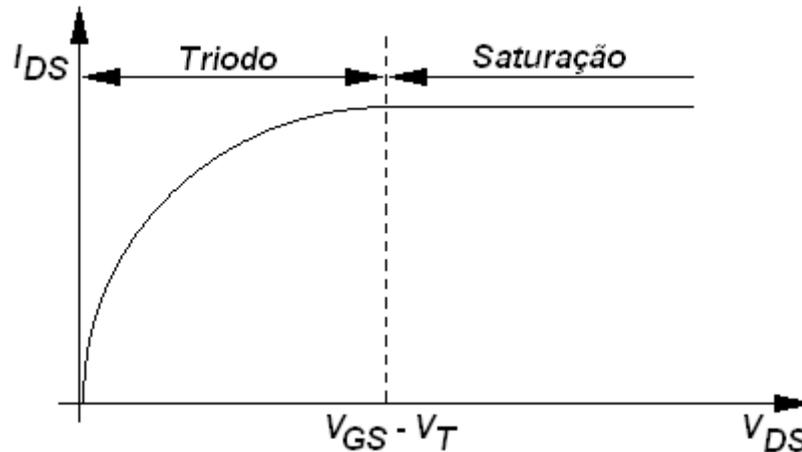


Figura 2.11 - Curva I_{DS} x V_{DS} típica do transistor NMOS.
Fonte: (SCAFF, Robson,2008)

Se $V_{DS} \geq (V_{GS} - V_T)$, o transistor entra na região de saturação, onde a camada de inversão apresenta um ponto de estrangulamento. O campo elétrico horizontal é muito forte, injetando os portadores no dreno.

A velocidade dos portadores pode atingir a velocidade limite junto a esse ponto de estrangulamento resultando em uma máxima corrente. (SCAFF, Robson,2008) No ponto de estrangulamento (*pinch-off*), temos a transição do triodo para a saturação. A **Figura 2.12** ilustra o transistor operando nesta situação.

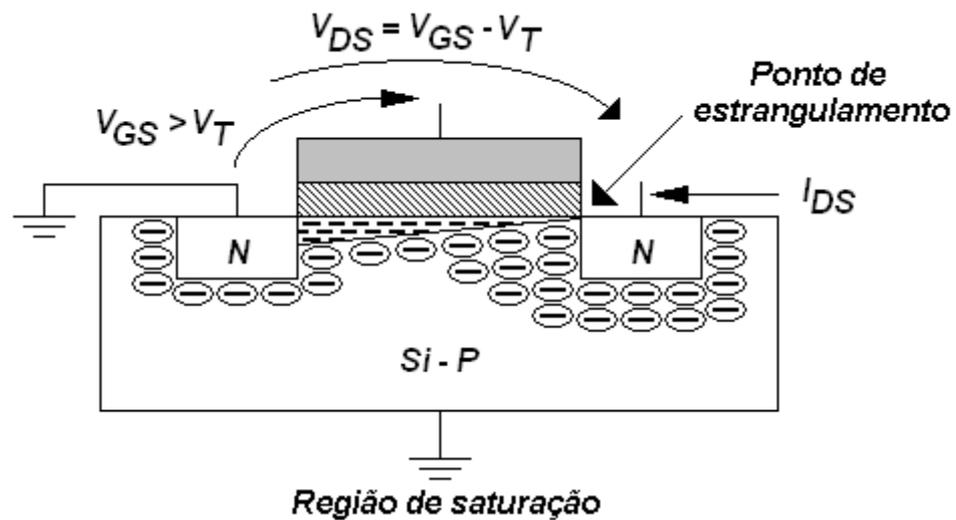


Figura 2.12 - NMOS operando na região de saturação com *pinch-off*
 Fonte: (SCAFF, Robson,2008)

A equação para a corrente na saturação é:

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

A variação da tensão V_{DS} permite a operação, seja na região de triodo, seja na região de saturação. A variação da tensão V_{GS} permite modular a quantidade de portadores disponíveis no canal. (SCAFF, Robson,2008)

2.3.1.2 Curvas características do NMOSFET

A partir das equações (1) e (2), pode-se traçar as curvas características do transistor NMOS tipo enriquecimento, **Figura 2.13**.

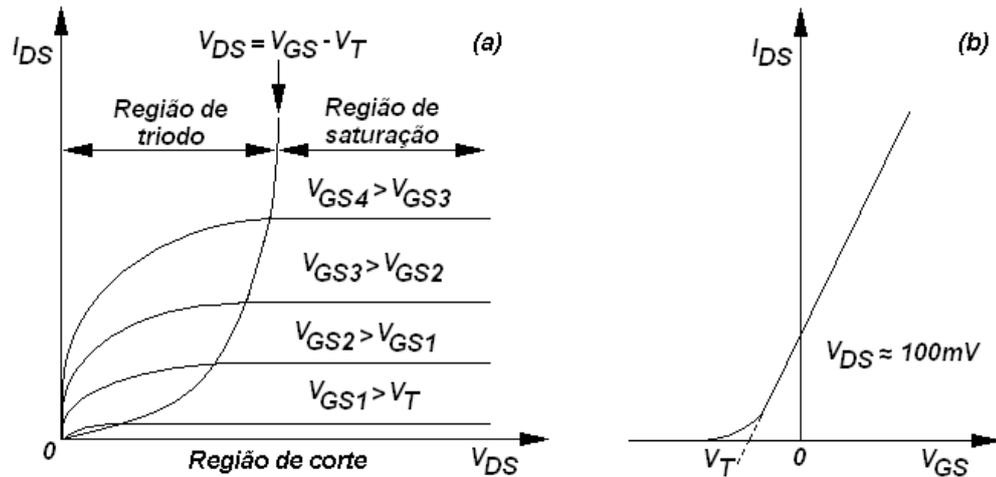


Figura 2.13-Curva I_{DS} x V_{DS} onde V_{GS} é constante (a) curva I_{DS} x V_{GS} para $V_{DS} = 100$ mV (b)
Fonte: (MARTINO, J. A.; PHAVANELLO, M. A.; VERDONCK, P. B, 2003)

A curva I_{DS} x V_{GS} , para $V_{GS} > V_T$, permite extrair a tensão de limiar a partir da extrapolação linear da mesma até o encontro do eixo das abscissas. Da curva I_{DS} x V_{DS} observamos as regiões de saturação e triodo.

Uma expressão para a tensão de limiar é dada por:

$$V_T = \frac{qN_A d_{máx}}{C_{OX}} + 2\phi_F - \frac{Q_{SS}}{C_{OX}} + \phi_{MS} \quad (3)$$

onde a largura de depleção máxima, a capacitância do óxido, o potencial de Fermi e a diferença de função trabalho entre metal e semiconductor são, respectivamente: (MARTINO, J. A.; PHAVANELLO, M. A.; VERDONCK, P. B, 2003)

$$d_{máx} = \sqrt{\frac{2\epsilon_{Si} 2\phi_F}{qN_A}}$$

$$C_{OX} = \frac{\epsilon_{OX}}{X_{OX}}$$

$$\phi_F = \frac{KT}{q} \ln \frac{N_A}{n_i} \quad (4)$$

$$\phi_{MS} = \phi_M - \phi_S$$

2.3.1.3 Extração da Tensão de Limiar do Transistor NMOS

Há vários métodos para extração de V_T em transistores NMOSFET. O método da extrapolação linear consiste na obtenção de V_T a partir da curva I_{DS} x V_{GS} da forma que se segue.

A partir da equação (1) e colocando V_{DS} em evidência, temos:

$$I_{DS} = C_{OX} \mu \frac{W}{L} V_{DS} \left[(V_{GS} - V_T) - \frac{V_{DS}}{2} \right] \quad (5)$$

A curva I_{DS} x V_{GS} tem uma região linear de coeficiente angular $C_{OX} \mu \frac{W}{L} V_{DS}$ que intercepta o eixo V_{GS} ($I_{DS} = 0$) em:

$$C_{OX} \mu \frac{W}{L} V_{DS} \left[(V_{GS} - V_T) - \frac{V_{DS}}{2} \right] = 0$$

ou

$$V_{GS} = V_T + \frac{V_{DS}}{2}$$

Isolando V_T :

$$V_T = V_{GS} - \frac{V_{DS}}{2} \quad (6)$$

Para valores de $\underline{V_{DS} \cong 0}$, a tensão de porta (V_{GS}) obtida a partir desta extrapolação linear é aproximadamente V_T . Outro método para a obtenção de V_T é o método da segunda derivada. Neste, o valor de V_{GS} correspondente ao pico máximo da segunda derivada da curva I_{DS} x V_{GS} é aproximadamente o valor de V_T . (TERAO, A.; FLANDRE, D.; TAMAYO, E. L.; WIELE, F. V, 1991) A desvantagem deste método, que é bem prático, é que os ruídos da curva podem interferir na posição exata dos picos, de modo que um tratamento cuidadoso deve ser feito para aplicá-lo.

Além desses métodos reportados na literatura, outras técnicas podem ser empregadas para a extração de V_T ou até mesmo de outros parâmetros que indiretamente estejam

relacionados a V_T . (CONDE, A. O.; SÁNCHEZ, F. J. G.; LIOU, J. J.; CERDEIRA, A.; ESTRADA, M.; YUE, Y, 2002)

2.3.2 V_T e a variação do pH de um eletrólito

A tensão de limiar para um ISFET diferencia-se um pouco da tensão de limiar de um MOSFET (equação 3), como segue:

$$V_T = E_{ref} - \psi + \chi_{sol} - \phi_s + \frac{qN_A d_{máx}}{C_{OX}} + 2\phi_F - \frac{Q_{SS}}{C_{OX}} \quad (7)$$

onde E_{ref} é a queda de potencial no eletrodo de referência, χ_{sol} é o potencial superficial dipolar da solução e ψ é o potencial superficial na interface dielétrico-eletrólito.

O acréscimo desses três termos, em substituição ao termo referente à diferença de função trabalho do metal, dá a soma total de potencial do eletrodo até o nível de Fermi da solução. O termo ψ está diretamente relacionado com a quantidade de íons H^+ dentro do eletrólito, ou seja, com o pH da solução. (SCAFF, Robson,2008)

2.3.3 Sensibilidade dos ISFET's

Os ISFET's, na literatura, apresentam diferentes materiais na camada sensível aos íons, conforme sua aplicação. Em sua grande maioria são materiais isolantes, como: óxido de silício (SiO_2), o nitreto de silício (Si_3N_4), o óxido de alumínio (Al_2O_3) e o óxido de tântalo (Ta_2O_5). [36]

A sensibilidade de um ISFET (em mV/pH) varia de acordo com o material da camada sensível do mesmo. Neste trabalho, foram utilizados ISFET's com óxido de silício (SiO_2) como material na camada sensível aos íons.

A variação da tensão de limiar (V_T) deve ser linear com o logaritmo da concentração de íons do eletrólito (pH) a ser analisado. Este comportamento é chamado de "Resposta de Nernst". [11] Segundo a literatura, o valor de sensibilidade ideal é de 59,15 mV/pH a 25°C. Para o óxido de silício a sensibilidade máxima atingida é de 25 – 48 mV/pH e para o SiO_2/Si_3N_4 é de 46 – 56 mV/pH. (SCAFF, Robson,2008)

Em nosso trabalho, procuramos a variação da tensão de limiar com a concentração do eletrólito analisado, isto é, a sensibilidade em mV/mM, conforme já foi reportado na literatura.(SEUNG-RO, L.; KAZUAKI, S.; HIDEKUNI, T.; MAKOTO, I , 2008) Por outro lado, a sensibilidade (em mV/pH) também pode ser encontrada já que há variações no pH do eletrólito devido à reação enzimática, que converte a glicose à ácido glicônico.

2.3.4 EGFET

Os dispositivos transistores de efeito de campo de porta estendida (EGFETs) possuem a mesma funcionalidade de um ISFET, portanto apresentam as mesmas características de funcionamento (I_{DS} x V_{GS} ou V_{DS}) deste. Porém, a vantagem do uso dos EGFETs em relação ao ISFET é que este evitam o contato do transistor com a solução e diminuem a influência da temperatura e da luz sobre o mesmo, já os dispositivos baseados em ISFET possuem muita sua sensibilidade à luz, instabilidade química e sinal altamente dependente do pH do meio.(FERNANDES, E. G. R, 2012)

Desta forma, em nosso trabalho usaremos um EGFET para as caracterizações elétricas, a fim de levantarmos a curva de corrente em função da tensão aplicada na porta do dispositivo. A partir deste momento o uso do termo ISFET possui o mesmo significado que EGFET, pois este último trata-se de uma simplificação operacional do ISFET, mas que possui as mesmas características funcionais deste.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental consistiu de duas etapas. Na primeira foi feito todo o processo de sintetização, caracterização e eletrofição do PGLD, assim como a imobilização da enzima sobre a membrana eletrofiada de PGLD. Por último, a membrana de PGLD com a enzima imobilizada sobre a mesma, foi fixada no vidro de ITO.

A segunda etapa consistiu na caracterização elétrica (curva I x V) do biossensor, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da membrana de PGLD com a enzima imobilizada sobre a mesma, afim de obter micrografias de alta resolução desta amostra para analisarmos a estrutura da mesma, e por análise termogravimétrica (TGA) do PGLD, para obtermos a perda de massa do mesmo conforme há um aquecimento do mesmo, o que nos permite inferir sobre a estabilidade do PGLD a determinada temperatura ou variação de temperatura.

3.1 Materiais

Os seguintes materiais foram utilizados no presente trabalho:

- Membrana dendrítica de PGLD (G3) e enzima glicose oxidase
- Vidro de ITO de resistência 50 ~ 70 Ω adquirido da empresa Sigma-Aldrich (Brasil). Dimensões: 20,10 x 4,90 [mm]. Espessura: 1,1 [mm].

Óxido de índio e estanho (ITO) é popular por suas propriedades elétricas e ópticas exclusivas, ou seja, alta condutividade elétrica e alta transmitância na região do visível (YIN, L.; CHOU, J.; CHUNG, W.; SUN, T.; HSIUNG, S, 2000). Além disso, já foi comprovado que o mesmo pode ser utilizado como um filme de sensibilidade ao pH para o ISFET.(YIN, L.; CHOU, J.; CHUNG, W.; SUN, T.; HSIUNG, S,2000; YIN, Li-Te; CHOU, Jung-Chuan; CHUNG, Wen-Yaw; SUN, Tai-Ping; HSIUNG, Shen-Kan, 2012)

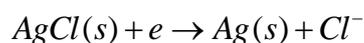
- Circuito integrado de especificação HCF4007UBE adquirido da empresa SGS-Thomson Microelectronics.
- Eletrodo de referência Ag/AgCl

O eletrodo de referência apresenta um potencial fixo que não varia durante um dado experimento independentemente da corrente que circula através do mesmo.(SCAFF, Robson, 2008)

Um eletrodo de referência deve possuir as seguintes propriedades: estabilidade de forma que os componentes químicos do eletrodo não reagem com as espécies do meio em que o eletrodo se encontra; reprodutibilidade de forma que com a passagem de corrente (polarização), o eletrodo volte rapidamente ao equilíbrio inicial; reversibilidades termodinâmica e química; baixo coeficiente de temperatura; baixa histerese com a temperatura ou concentração da espécie ativa; deve ser de fácil preparação e manuseio; e potenciais de junção pequenos e reprodutíveis.(SCAFF, Robson, 2008)

O eletrodo de Ag/AgCl consiste num fio de prata recoberto por cloreto de prata em contato com uma solução de íons cloreto saturada. É um eletrodo que responde a íons Cl⁻ provenientes do equilíbrio de solubilidade do AgCl.

A representação do eletrodo é Ag/AgCl/Cl⁻ e a reação do eletrodo é dada por:



Através do eletrodo de referência pode haver passagem de corrente elétrica.

Um bom eletrodo de referência mantém seu potencial constante mesmo com alguma corrente da ordem de μ A circulando. Podemos avaliar a qualidade de um eletrodo de referência através de sua reversibilidade. Sua calibração é feita com a aplicação de um potencial variável no eletrodo, gerando uma resposta linear de corrente com o potencial. Qualquer efeito de histerese está relacionado com a irreversibilidade do eletrodo de referência.

A utilização do eletrodo de Ag/AgCl neste trabalho foi adotada, uma vez que comprovações que este funciona adequadamente sob as condições deste trabalho foram obtidas de outras fontes confiáveis.[36,45,46]

- Soluções de 50 mL de glicose (pH 7,4), preparadas por mestrandos do grupo de biomateriais da UNIFEI, de concentração 4mM; 8mM; 10 mM e 12 mM.

3.2 Síntese do PGLD e imobilização enzimática

a) Síntese, caracterização e funcionalização do dendrímero de poliglicerol de geração 3 (PGLD-G3):

O dendrímero de poliglicerol (PGLD) de geração 3 foi obtido a partir da síntese de Williamsom modificada pela utilização de um catalisador de transferência de fase seguindo-se uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação de acordo com nossos trabalhos anteriores (MOURA, R. M., 2011) Nesse caso, foi utilizado um processo iterativo de seis etapas onde a alilação de um núcleo de poliglicerol seguido da dihidroxilação catalítica com óxido de N-metilmorfolina da ligação alílica foi adotado. A reação de alilação sob condições de transferência de fase permitiu a formação quantitativa do dendrímero com bons rendimentos, próximo a 80%, reduzindo assim, o número de defeitos na cadeia macromolecular (**Figura 3. 1**). O produto final, PGLD, foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel. Após purificação o PGLD foi funcionalizado com grupos epoxídicos utilizando-se o diglicidil éter do poli(etileno glicol) (PEGDE) para reticulação durante o processo de eletrofiação e posterior imobilização da enzima glicose oxidase (GOx). A **Figura 3.1** ilustra o processo de síntese do PGLD G3, sua purificação cromatográfica e sua funcionalização com grupos epoxídicos.

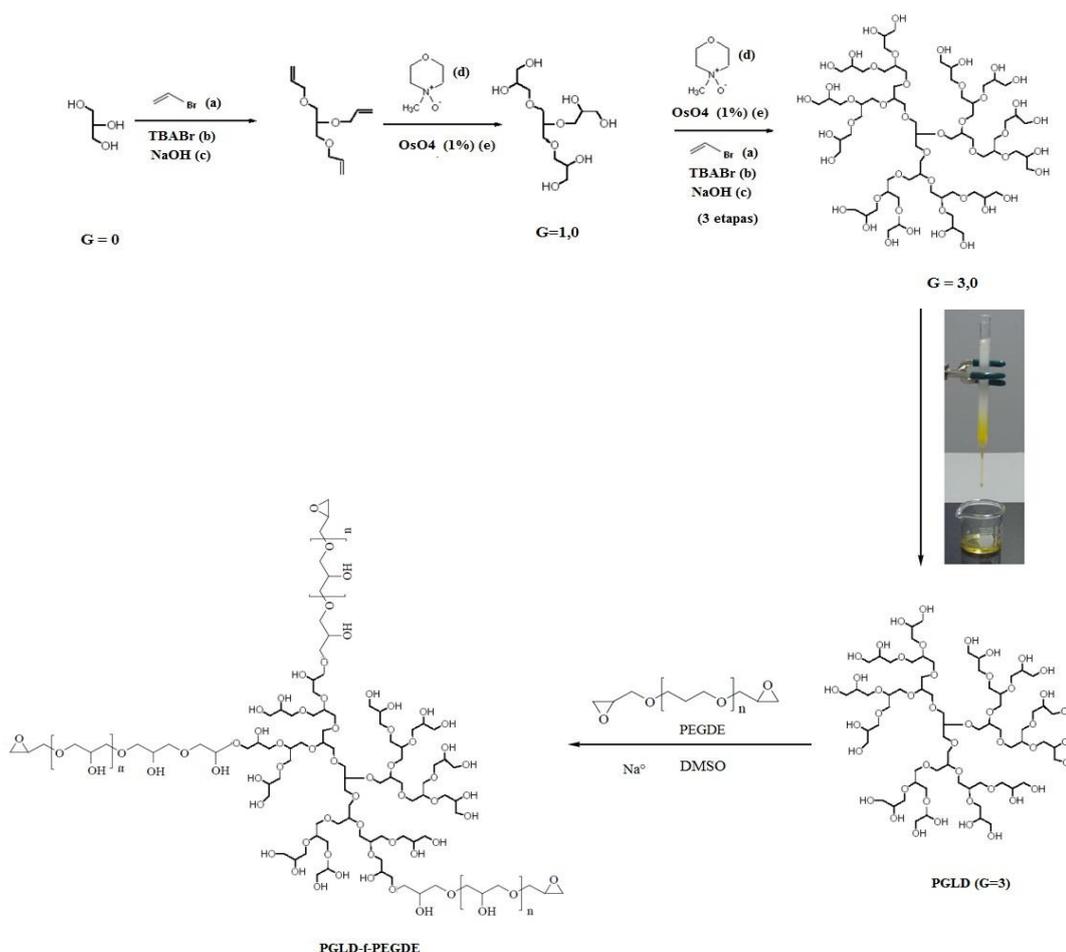


Figura 3.1 Ilustração do processo de síntese do PGLD ($G=3$) a partir do glicerol ($G=0$) e funcionalização do dendrímero com grupos epoxídicos. Os reagentes são descritos a seguir: Bromoeteno (a), Brometo de tetrabutil amônio (b), Hidróxido de sódio (c), N-metil Morfolina (d), tetróxido de ósmio (e), Diglicidil éter do poli(etileno glicol) (PEGDE) ($n=10$), Na^0 = sódio metálico e DMSO = dimetilsulfóxido. Fonte: (DE QUEIROZ, A.A.A.; BARACHO, N.C.V.; VARGAS, E.A.T.; BRITO, J, 2009)

A purificação cromatográfica do PGLD ($G3$) forneceu um rendimento de 88% (**Figura 3.2-C**), tendo o produto obtido as seguintes características espectroscópicas: H-NMR (**Figura 3.2-A**): (Bruker, 300 MHz, D_2O). Deslocamentos (δ , ppm): 4,8 (OH); 4.04 ($OCH_2-CH-CH_2$); 3,95-3,40 (CH_2-O-CH_2). C-NMR (**Figura 3.2-B**): (Bruker, 75 MHz, D_2O): Deslocamentos (δ , ppm): 62,9 (CH_2-OH , unidade terminal); 82,0-81,5; 80,6-79,8; 74,7-73,9; 73,8-72,2; 71,8-70,7; 64,7; 63,1 (CH_2-O-CH_2 , poliéter).

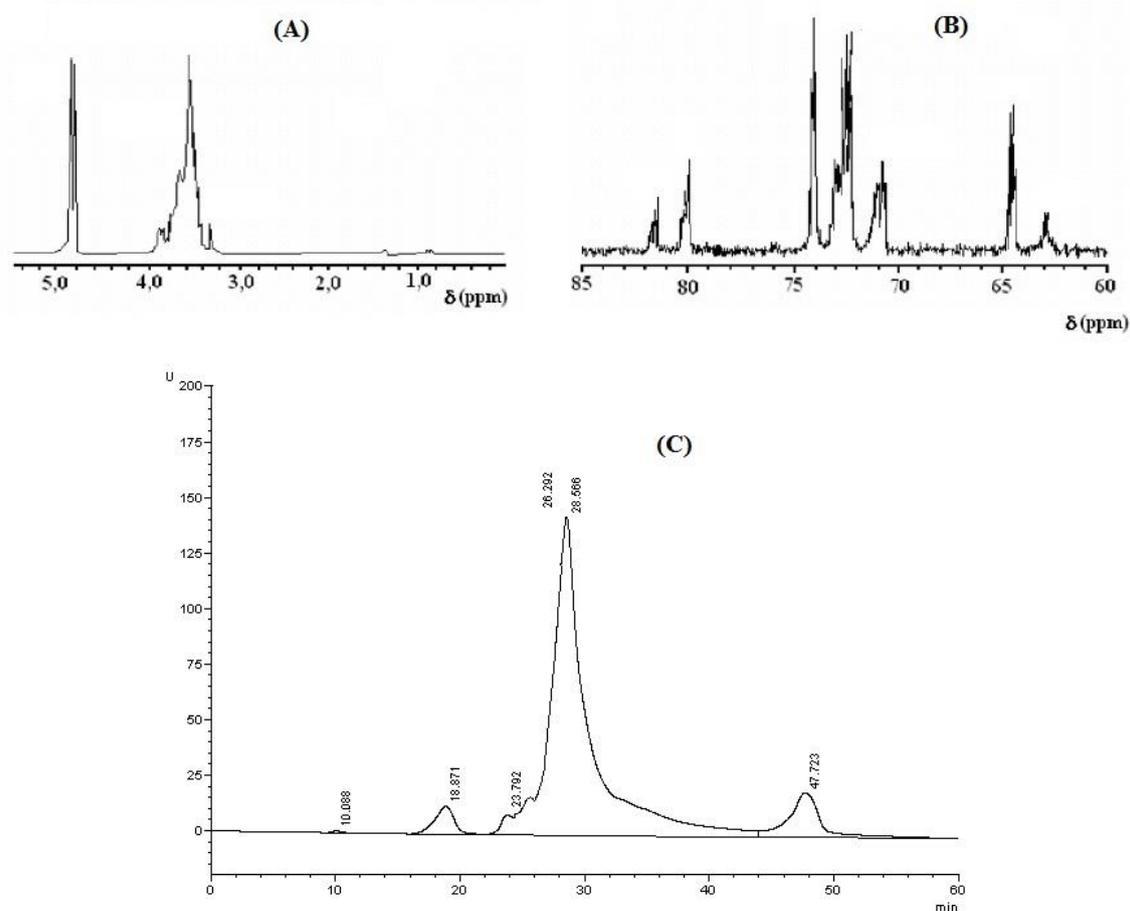


Figura 3.2 Espectros H-RMN (A) e C-RMN (B) do PGLD (G=3) sintetizado e seu perfil cromatográfico CLAE (C). CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte:[31]

A análise da isomolecularidade do PGLD foi avaliada utilizando-se a técnica de dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (Maldi-Tof). Utilizou-se um espectrômetro Bruker Maldi-MS com analisador de tempo de voo e detector tipo microcanal de placas (MCP). A fonte de energia foi um laser de nitrogênio de comprimento de onda de 337 nm e pulso de 3 ns. A matriz utilizada foi o ácido indolacrílico em solução saturada de acetona. A **Figura 3.3** ilustra o espectro Maldi-Tof do PGLD (G3). A massa real determinada foi igual a 1,72 kDa (Na^+) e um número médio de 26 hidroxilas por molécula. Utilizou-se na funcionalização do PGLDE, 3 hidroxilas por molécula de dendrímero, o que equivale à um rendimento de 11,54%.

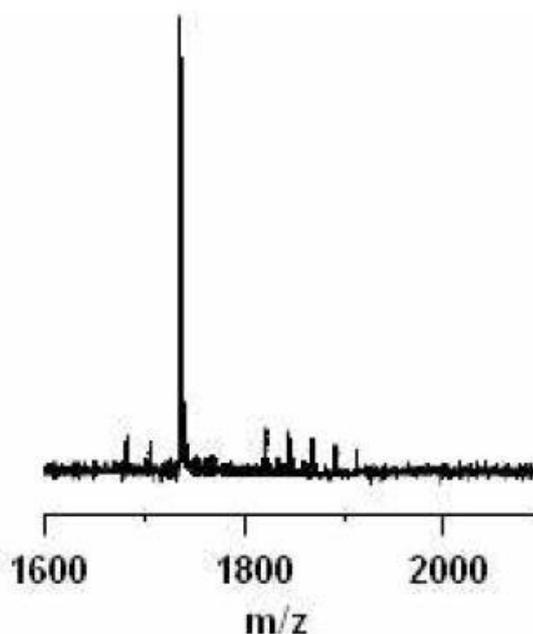


Figura 3.3 Espectro Maldi-Tof do PGLD (G3)
Fonte: (MOURA, R. M.,2011)

b) Eletrofiação do PGLD-f-PEGDE

O procedimento de eletrofiação do PGLD-f-PEGDE ocorreu segundo processo desenvolvido em nossos laboratórios em equipamento “home made” para eletrofiação de soluções poliméricas a temperatura ambiente (25 °C) segundo nossos trabalhos anteriores (MOURA, R. M.,2011). Uma solução a 20 % (m/v) de PGLD-f-PEGDE em uma solução formada por metanol:dimetilformamida (1:1 v/v) foi adicionada em uma seringa de vidro de 10 mL, provida com agulha de 0,91 mm de diâmetro. A solução foi bombeada através da seringa utilizando uma bomba de infusão na velocidade de 1,5 mL.h⁻¹. O alvo consistiu de uma folha de alumínio aterrada ao pólo negativo e a fonte. A agulha da seringa foi conectada ao polo positivo, formando uma diferença de potencial entre a ponta da seringa e o alvo. Uma alta voltagem (15 kV) foi aplicada na agulha através de uma fonte de alta tensão para gerar um campo elétrico de 75 kV.m⁻¹ (a distância entre a ponta da agulha e o alvo de alumínio foi de 20 cm). Após o processo de eletrofiação a membrana foi removida da folha de alumínio e seca sob vácuo por 48 h à temperatura ambiente (25 °C) para remoção do solvente residual. Em seguida, a membrana foi imersa em solução tampão salina fosfato (PBS) pH 7,4 seguido de liofilização. As membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Shimadzu SS50) e a morfologia de sua microestrutura é apresentada na **Figura 3.4**.

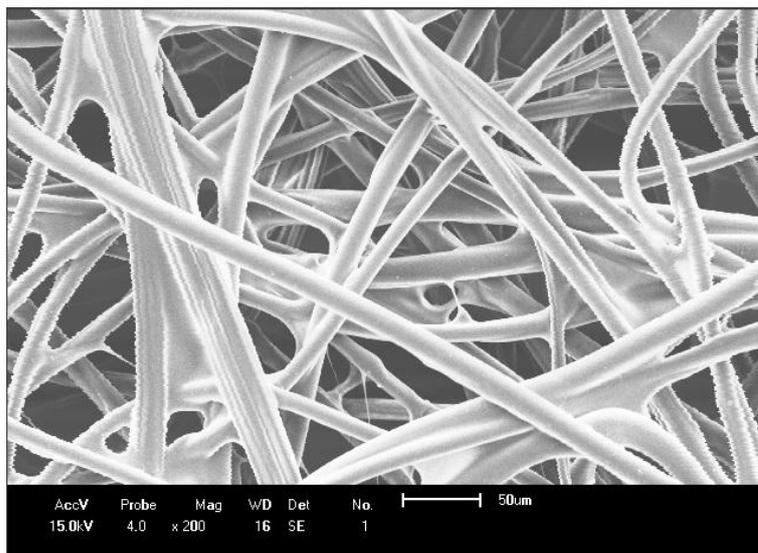


Figura 3.4 Ilustração da morfologia do PGLD-f-PEGDE eletrofiado.

c) Imobilização da Enzima

Para a imobilização covalente da enzima na membrana eletrofiada de PGLD-f-PEGDE foram utilizados 5,75 mg de proteína por grama de membrana eletrofiada. As soluções enzimáticas foram preparadas em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, pH 10,05, na proporção 1:10 e mantidos em agitação durante 24 horas a 25 °C. Após o procedimento de imobilização a membrana eletrofiada foi lavada com água destilada em abundância para remoção da enzima residual e em seguida incubada com solução de glicina a 3M e pH 8,0 para bloqueio dos grupos epóxi não reagidos. Ao final, as membranas foram lavadas exaustivamente com água bidestilada e liofilizadas.

A concentração de proteínas presentes no sobrenadante após o processo de imobilização determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, M.M.A , 1976) sendo usada uma curva de calibração padrão soro albumina bovina (BSA) válida numa faixa de concentração de 0,0 a 0,6 g.L⁻¹.

O Rendimento de Imobilização (RI%) foi calculado com base na concentração inicial de proteína e a concentração de proteína presente no meio reacional após o processo de imobilização de acordo com a equação:

$$RI(\%) = \frac{P_o - P_f}{P_o} \times 100$$

sendo p_0 a concentração de proteína no tempo inicial e p_f é a concentração de proteína no tempo final (mg.mL^{-1}).

Nesse trabalho, o rendimento de imobilização (RI) obtido no sistema PGLD-f-PEGDE foi de 97,5%. A característica isomolecular do PGLD faz com que a imobilização da enzima ocorra de maneira organizada e a presença dos grupos epóxi na periferia do dendrímero favorece a configuração enzima-nanofibras.

A escolha da funcionalização do PGLD com grupos epóxi se deve ao fato de que o sistema PGLD-f-PGEDE pode estabilizar a enzima por ligação covalente e ao mesmo tempo não altera significativamente a superfície da enzima. Os grupos epóxi na periferia do PGLD sofrem ataque nucleofílico de diferentes grupos presentes na superfície da enzima a exemplo dos grupos amina e tiol o que proporciona uma maior interação entre a enzima e o PGLD-f-PEGDE, o que proporciona um elevado rendimento no processo de imobilização.

A escolha do PGLD de geração 3 ($G=3$) deve-se ao seu caráter hidrofóbico que proporciona uma elevada adsorção da enzima na superfície das nanofibras, proporcionado pela elevada força iônica do meio no pH ótimo da enzima. Após o processo de adsorção da enzima na superfície das nanofibras o pH do meio é elevado a 10. A **Figura 3.5** ilustra o processo de imobilização da enzima na superfície das nanofibras eletrofiadas.

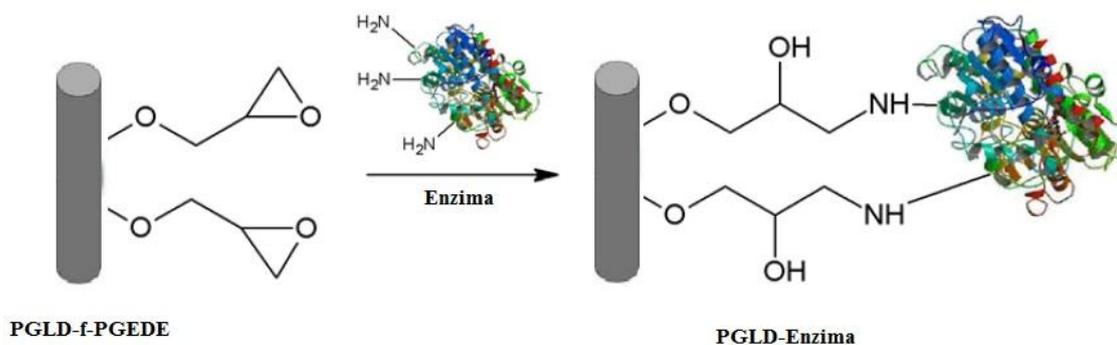


Figura 3.5 Ilustração do processo de imobilização da enzima na superfície das nanofibras eletrofiadas. Fonte: (DE QUEIROZ, A.A.A.; BARACHO, N.C.V.; VARGAS, E.A.T.; BRITO, J., 2009)

Para a modificação da porta do ISFET foi analisado previamente a estabilidade da enzima imobilizada. Para isso, foram comparadas a enzima livre e a enzima imobilizada no sistema PGLD-f-PGEDE quanto às suas estabilidades térmicas. Ressalta-se que o rendimento de imobilização observado nesse trabalho foi de 97,5%. De acordo com a **Figura 3.6**, a enzima imobilizada manteve-se significativamente mais estável que a enzima livre ao longo dos 250 minutos de incubação a 50°C. Como pode ser observado na **Figura 3.5**, a estratégia de imobilização teve grande influência na estabilização da enzima, uma vez que os derivados

resultantes de imobilização apresentaram maior estabilidade que a enzima livre, possivelmente devido à formação de ligações adicionais enzima-nanofibras durante o processo de imobilização.

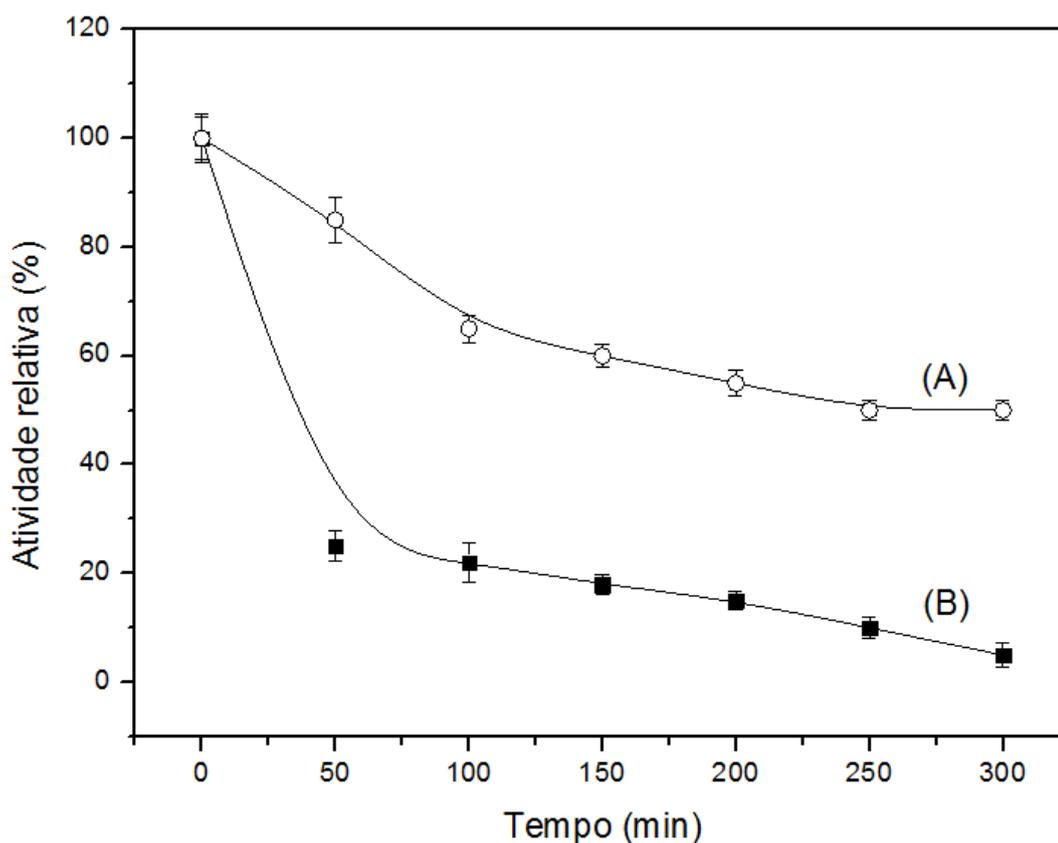


Figura 3.6 Curvas de inativação térmica a 50°C comparando a enzima imobilizada (A) e a enzima livre (B). As medidas das atividades relativas foram efetuadas utilizando-se o método da o-dianisidina.

Fonte: (DAHLQVIST, A, 1968)

3.3 Métodos de Medição

Os biossensores foram caracterizados elétrica (levantamento de curva da corrente elétrica em função da tensão), térmica, através de análise termogravimétrica, TGA e morfologicamente, por Microscopia eletrônica de varredura, MEV.

3.3.1 Caracterização elétrica

O esquema de ligação utilizado foi o mesmo proposto por Yin et al. [45,46] no qual a estrutura do EGFET simplificada era composta de duas partes: uma estrutura pH-sensível de SnO₂/Al/Si, e a outra sendo um MOSFET comercial (HCF4007UBE) (FET de porta estendida e separada, SEG-FET).

As medidas elétricas foram feitas através do equipamento Yokogawa 7561, como fonte de tensão constante de 50[mV] entre o dreno e a fonte, e Keithley 237 como analisador e extrator de parâmetros. O objetivo foi extrair as curvas $I_{DS} \times V_{ref}$ do transistor para diferentes concentrações de glicose conhecidas variando desde 4 até 12 mM. Aqui o conceito de tensão do eletrodo de referência (V_{ref}) é a substituição da tensão de porta do dispositivo e a corrente medida pelo Keithley 237 é proporcional, por uma constante igual a 10 (comprovado experimentalmente no laboratório), a corrente que circula entre o dreno e a fonte, de modo que a denominamos por I_{DS} já que não há nenhum prejuízo no cálculo da sensibilidade do ISFET com isso.

A configuração de polarização (**Figura 3.1**) foi tal que usou-se o eletrodo sensível (ITO contendo a enzima imobilizada na membrana de PGLD-f-PEGDE) no papel de porta do transistor. Este ficou imerso na solução de glicose juntamente com o eletrodo de Ag/AgCl. A distância entre o eletrodo de referência e o eletrodo sensível foi de 0,5 ~ 1cm para todas as medidas. A temperatura em todas as medições foi de 23°C.

A tensão entre fonte e dreno V_{DS} foi mantida em um valor constante, enquanto que V_{ref} foi variada. No presente trabalho, a tensão V_{ref} variou tipicamente de 0 V a 4,5V para valores fixos de V_{DS} de 50 [mV].

O procedimento de enxágue dos dispositivos a cada troca de solução foi devidamente controlado com o intuito de evitar o efeito de memória. Para cada troca de solução, o eletrodo sensível e o eletrodo de referência passaram por um enxágue com uma solução de pH = 7,4 e solução 3M de KCl, respectivamente.

Ao fim de toda a medição, as curvas características $I_{DS} \times V_{ref}$ para V_{DS} fixo foram analisadas num programa de tratamento de dados (*Origin Pro 7.0*).

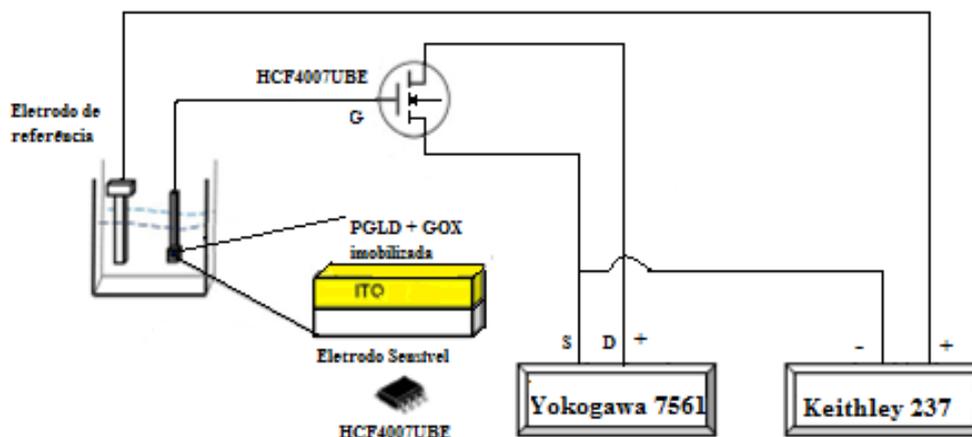


Figura 3.7 Sistema de medição para caracterização elétrica do biossensor.
Fonte: Adaptado de (FERNANDES, E. G. R., 2012).

3.3.2 TGA

Análise termogravimétrica é uma técnica de análise instrumental que mede a perda de massa da amostra em relação à temperatura e/ou tempo enquanto é submetido a uma programação controlada. Esta técnica possibilita conhecer a faixa de temperatura em que a amostra adquire uma composição química fixa, a temperatura em que se decompõe e o andamento das reações de desidratação, oxidação, combustão, decomposição etc. As análises termogravimétricas podem ter três modos: TG isotérmica, TG quasi-isotérmica, e TG dinâmica. (CABREIRA, Vinicius, 2013)

Uma TG é isotérmica quando a variação da massa em função do tempo é constante e quasi-isotérmica quando a amostra é aquecida a uma taxa constante até que haja uma variação de massa. Neste momento a temperatura para de aumentar, até que haja uma estabilização da massa, então a temperatura volta a aumentar até a próxima perda de massa. Por fim, a TGA é dinâmica quando a taxa de aquecimento é pré-programada, geralmente é de maneira linear. (CABREIRA, Vinicius, 2013)

A análise termogravimétrica da membrana de PGLD-f-PEGDE eletrofiada foi dinâmica. As amostras foram aquecidas em panelas (cadinhos) de alumina sob as condições de taxa de aquecimento 10°C/min, atmosfera inerte de N₂ e temperatura inicial e final de 25°C e 800°C, respectivamente.

3.3.3 MEV

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução (até 300.000 x). As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual estamos habitualmente acostumados. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 KV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons, e também provoca o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio (eletrodo positivo) atrai fortemente os elétrons gerados, resultando numa aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras que alinham os feixes em direção à abertura da objetiva. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes dos elétrons atingirem a amostra analisada. (LAGOEIRO, Leonardo, 2013)

O MEV utilizado neste trabalho pertence ao grupo de biomateriais da UNIFEI. As amostras do eletrodo sensível foram previamente recobertas com Au, pela técnica de sputtering, por 3 minutos. O recobrimento com ouro se faz necessário, pois os biossensores são mau condutores e o filme de ouro tem a função de evitar o carregamento da amostra por elétrons do feixe. O filme de ouro recobre acompanhando a geometria da amostra e permite que os elétrons que incidem sobre a amostra se escoem para o terra, evitando que ocorra distorções na imagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados experimentais foram divididos em duas etapas.

Na primeira, quantitativa, temos a análise de perda de massa (TGA) e da caracterização elétrica dos ISFETs com o eletrodo sensível e a utilização de dois métodos diferentes para extração das sensibilidades dos ISFETs em mV/mM.

Na segunda etapa, qualitativa, são apresentados os resultados referentes às análises de microscopia da membrana de PGLD-f-PEGDE com enzima imobilizada sobre a mesma.

4.1 Análise termogravimétrica e obtenção da porcentagem de perda de massa.

Um estudo da perda de massa por termogravimetria foi feito para avaliar a estabilidade térmica do PGLD-f-PEGDE. A **Figura 4.1** mostra a curva obtida a uma velocidade de aquecimento de 10°C/min.

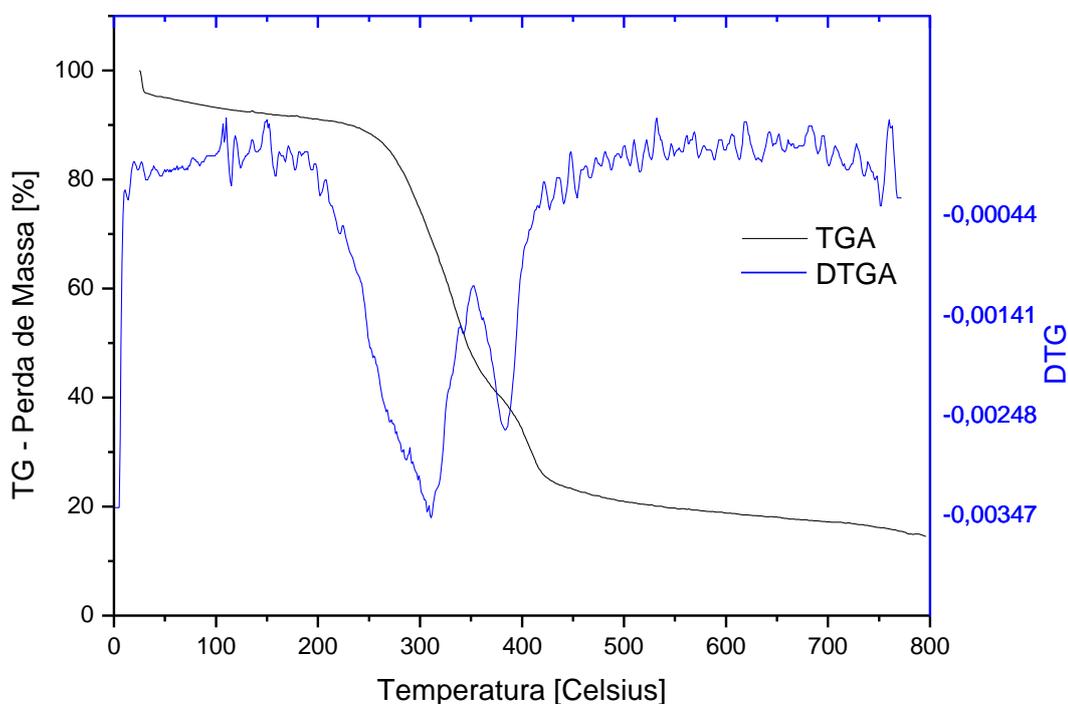


Figura 4.1- Curva Termogravimétrica e DTG para PGLD-f-PEGDE . Taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera inerte de N₂

Na **Figura 4.1** é observado uma perda de massa de aproximadamente 10% no intervalo de temperaturas de 25°C a 200 °C, correspondente à perda de água ligada ao material por ligações de hidrogênio. As curvas TG/DTG (**Fig. 4.1**) indicam que o dendrímero funcionalizado PGLD-f-PEGDE (G=3) é termicamente estável até a aproximadamente 250 °C e a decomposição térmica ocorrem em dois eventos. O primeiro evento se processa com cinética rápida e se inicia a aproximadamente 250°C com perda de massa de aproximadamente 50%. O segundo evento ocorre de forma gradativa e mais lenta entre 300 °C e 450 °C, e a perda de massa são próximas de 20%. Observa-se um teor de resíduo de aproximadamente 15% que pode ser devido à formação parcial de carbono elementar durante a segunda etapa de decomposição térmica do material e pode estar associado à elevada densidade de reticulação proporcionada pelo PEGDE.

4.2 Análise dos métodos de obtenção da sensibilidade do ISFET

Por meio do equipamento Keithley 237 funcionando como fonte de tensão e medidor de corrente, extraímos as curvas $I_{DS} \times V_{ref}$ para $V_{DS} = 50$ [mV]. A **Figura 4.2** mostra tais curvas.

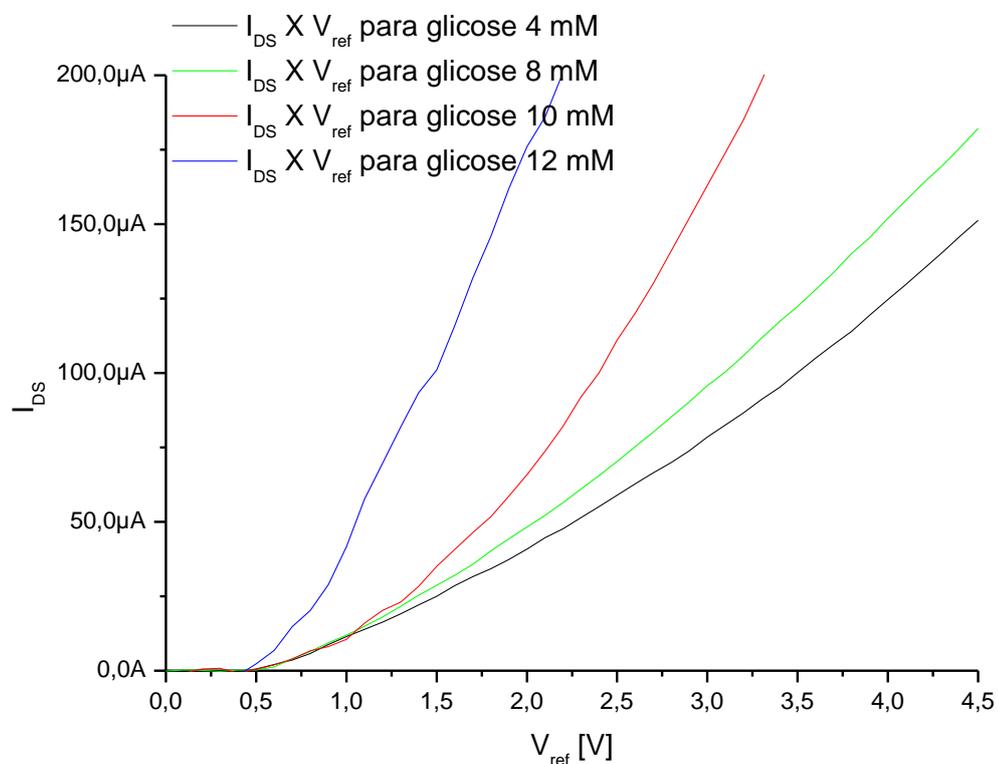


Figura 4.2 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ para diversas concentrações de glicose.

Para obter a sensibilidade do ISFET quando o eletrodo sensível faz o papel de porta do mesmo, foram empregados dois procedimentos de análise das curvas (extrapolação linear e segunda derivada). Os métodos de extrapolação linear e segunda derivada permitem a extração da tensão de limiar (V_T). [28,39] Em particular, comparamos os dois métodos quanto à precisão na extração da sensibilidade em mV/mM utilizando eletrodo de referência padrão de Ag/AgCl e o eletrodo sensível como porta do ISFET.

4.2.1 Método da Extrapolação Linear

Método válido para baixos valores de V_{DS} . [39] Consiste na obtenção da tensão de limiar (V_T) através do prolongamento de uma reta tangente ao trecho da região de comportamento linear da curva $I_{DS} \times V_{ref}$.

Para obter maior precisão de qual é a região linear da curva $I_{DS} \times V_{ref}$ no programa *Origin Pro 7.0*, foi traçada sua derivada. Nesta, foram selecionados aqueles pontos com derivada aproximadamente constante, para cada concentração de glicose. Com estes pontos, foi traçada uma reta para cada curva de diferente concentração de glicose. A confirmação da escolha dos melhores pontos foi por meio do melhor coeficiente de correlação que se pode obter. Assim o coeficiente de correlação variou entre 0,996 e 1.

Por fim, foram obtidos os valores dos pontos de cruzamento no eixo das abscissas. Estes pontos encontrados correspondem aos valores de V_{ref} onde:

$$V_T = V_{ref} - \frac{V_{DS}}{2}$$

A **Figura 4.3** ilustra a aplicação do método de extrapolação linear, tomando como exemplo a curva $I_{DS} \times V_{ref}$ para $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrólito de 4 mM.

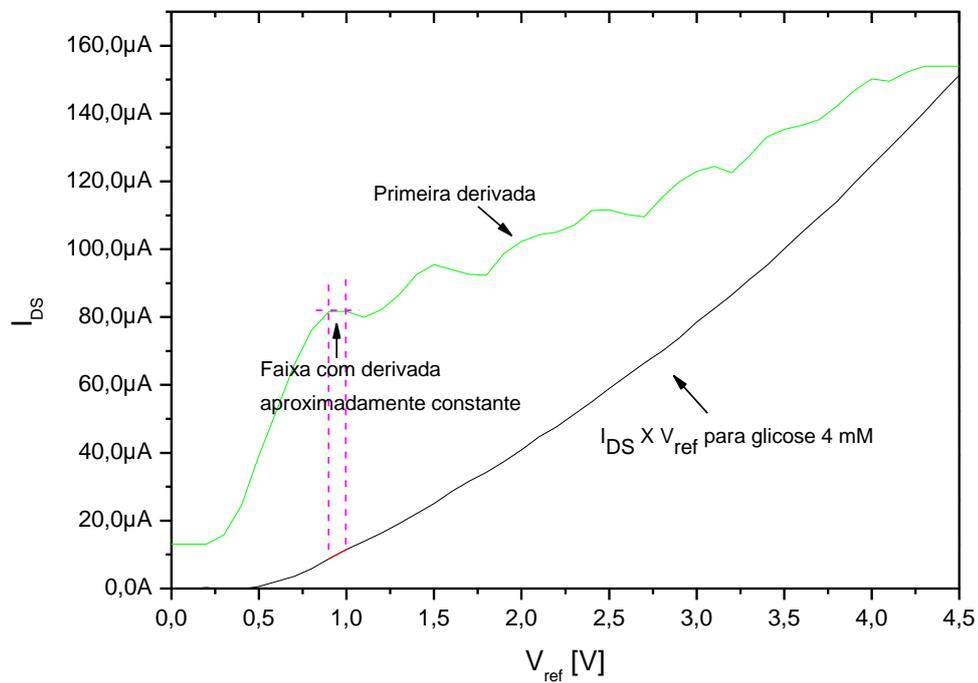


Figura 4.3 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 4 mM.

As demais curvas do método de extrapolação linear para diferentes valores de concentração de glicose podem ser vistas no Apêndice A.

Com os valores obtidos da tensão de limiar montamos a Tabela 4.1 a seguir.

Tabela 4-1 Valores de V_T obtidos pela extrapolação linear

$V_{DS} = 50$ m V	4 mM	8 mM	10 mM	12 mM	Sensibilidade [mV/mM]
V_T [V]	0,58	0,69	0,8	0,6	6,43

A **Figura 4.4** mostra o gráfico de $V_T \times$ Concentração de glicose para o valor de $V_{DS} = 50$ mV, sendo que os pontos experimentais foram traçados a partir da Tabela 4.1.

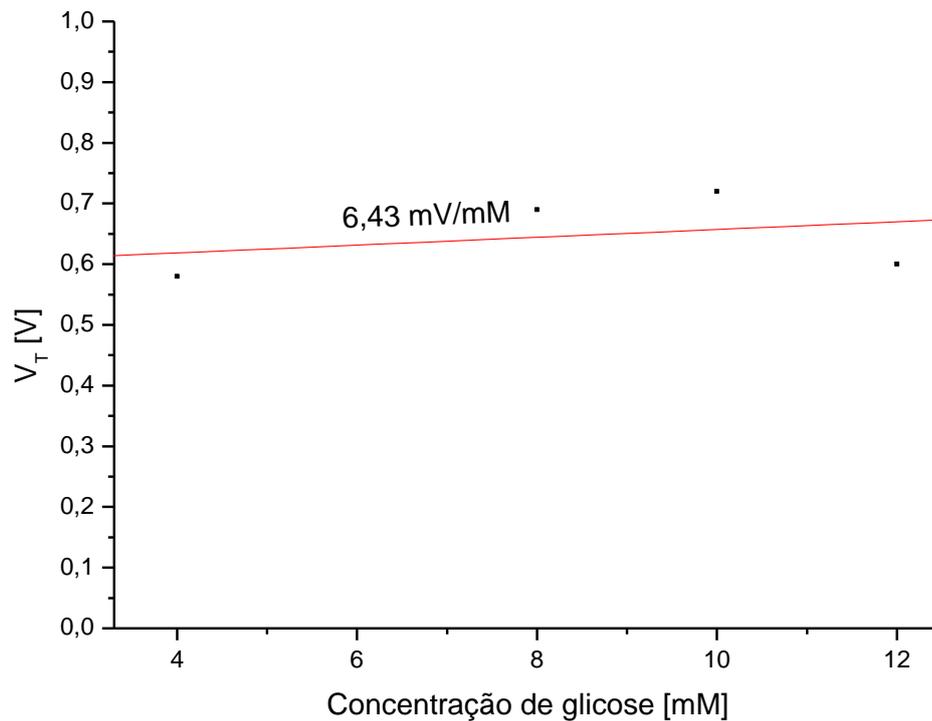


Figura 4.4 Curva V_T x Concentração de glicose

O gráfico de V_T x Concentração de glicose nos mostra uma variação linear da tensão de limiar com a variação do valor em miliMolar da glicose.

4.2.2 Método da Segunda Derivada

O método da segunda derivada se baseia na extração de V_T através do valor do ponto de máximo do pico existente na segunda derivada da curva I_{DS} x V_{ref} . Este método é válido apenas para baixos valores de V_{DS} . [39]

Da curva da derivada utilizada no método anterior, foi passado um filtro na mesma com o intuito de minimizar o ruído existente e proporcionar maior precisão na obtenção do ponto de máximo na segunda derivada. O filtro usado foi o FFT (*Fast Fourier Transform*) de 5 pontos. Por fim, foi traçada a segunda derivada a partir da curva filtrada.

Na segunda derivada de I_{DS} x V_{ref} , o ponto de máximo do pico corresponde a um valor de V_{ref} obtido graficamente igual a V_T . [39]

A **Figura 4.5** ilustra a aplicação do método da segunda derivada, tomando como exemplo a curva $I_{DS} \times V_{ref}$ para $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrólito de 4 mM.

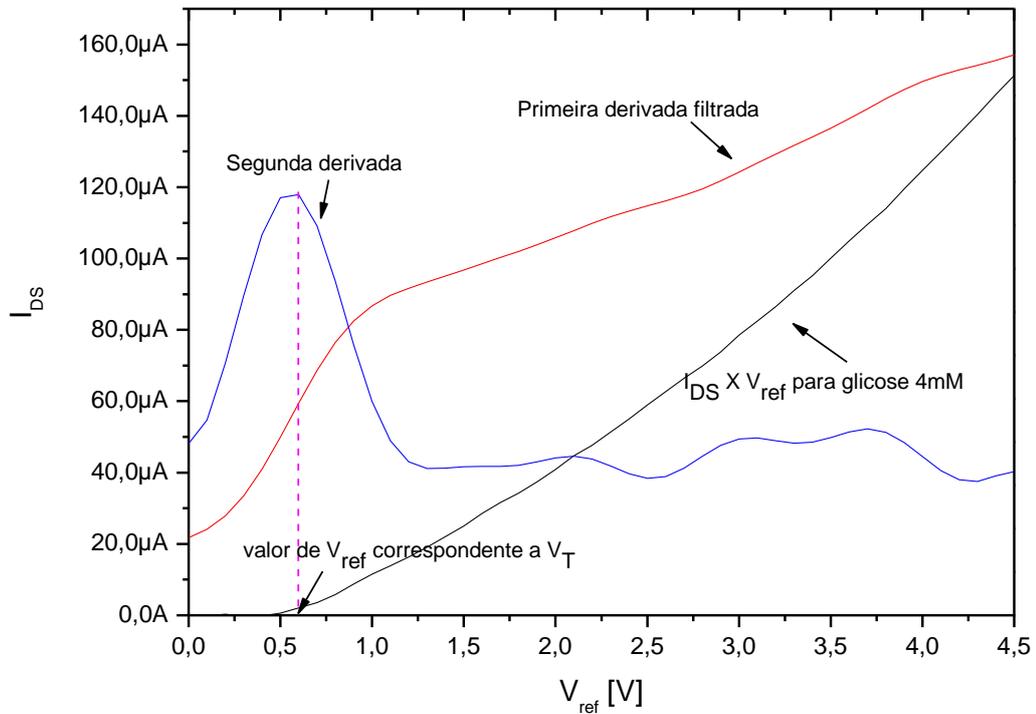


Figura 4.5 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 4 mM.

As demais curvas para a obtenção da tensão de limiar pelo método da segunda derivada estão no Apêndice A. Os valores de V_T obtidos estão mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4-2 Valores de V_T obtidos pelo método da segunda derivada utilizando $V_{DS} = 50$ mV

$V_{DS} = 50$ m V	4 mM	8 mM	10 mM	12 mM	Sensibilidade [mV/mM]
V_T [V]	0,6	0,6	0,75	0,6	6,43

A **Figura 4.6** representa graficamente os pontos da Tabela 4.2, a partir dos quais a sensibilidade foi extraída pela regressão linear dos mesmos.

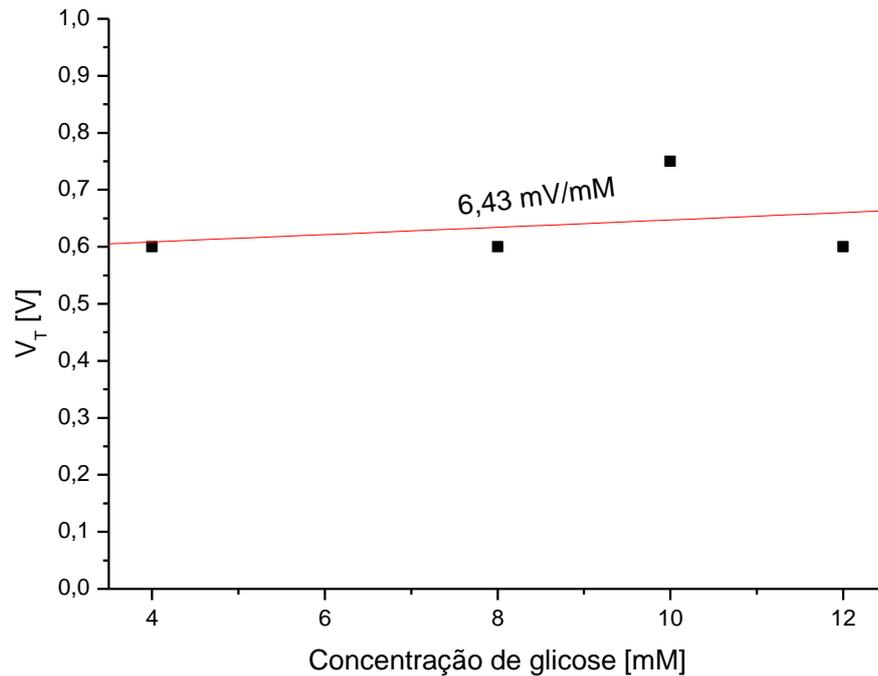


Figura 4.6 Curva V_T x Concentração de glicose.

Os valores da tensão de limiar obtidos pelo método em questão estão bem próximos daqueles obtidos pelo método de extrapolação linear com erro próximo de 10%. O valor da sensibilidade encontrada coincidiu com o encontrado no método anterior. O valor de sensibilidade encontrado não diverge muito do valor reportado na literatura de 1mV/mM para biossensores de glicose baseados em ISFETs de sensibilidade 45mV/pH.[38] Esta diferença de sensibilidade (mV/mM) certamente se deve a sensibilidade, em mV/pH, medida por meio do eletrodo de referência que utilizamos no sistema de medição (**Figura 3.7**), que difere da encontrada na literatura. (SEUNG-RO, L.; KAZUAKI, S.; HIDEKUNI, T.; MAKOTO, I. , 2008) A obtenção da sensibilidade (mV/pH) do biossensor de glicose baseado em ISFET utilizado será feita em trabalhos futuros.

4.3 Análise das microscopias eletrônicas de varredura

A micrografia MEV do PGLD-f-PEGDE é apresentado na **Figura 4.7**.

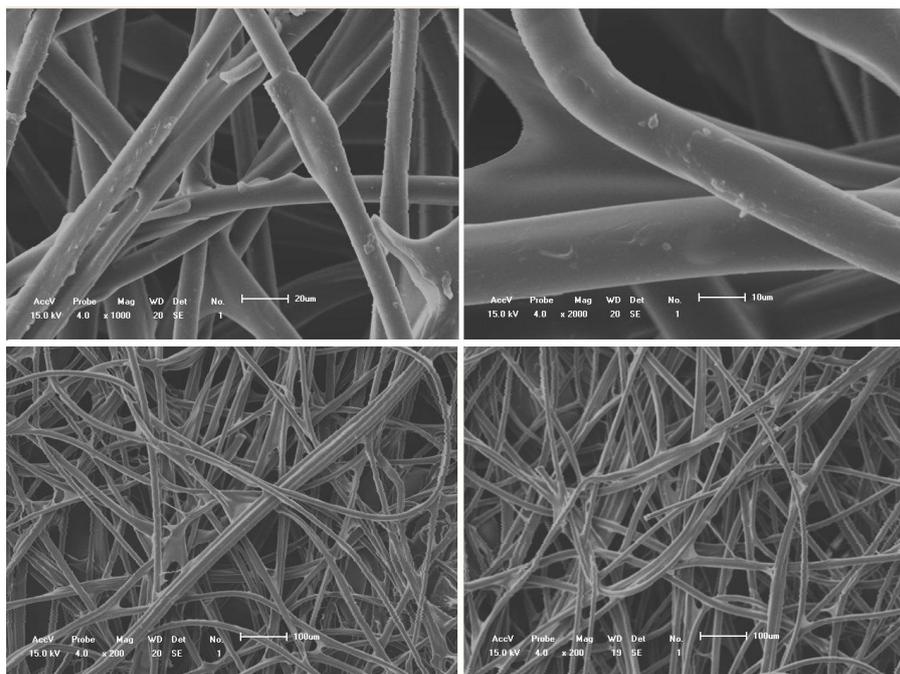


Figura 4.7 Imagens MEV da malha de PGLD-f-PEGDE eletrofiada.

Observa-se uma malha eletrofiada, cujo diâmetro médio aproximado é $17,9 \mu\text{m}$ e o desvio padrão é $4,9 \mu\text{m}$. Os valores dos diâmetros, de 33 secções transversais das fibras, foram medidos utilizando a micrografia de PGLD-f-PEGDE (**Figura 4.7**).

Os diferentes valores de diâmetro das fibras, pode estar associado à viscosidade da solução polimérica empregada na eletrofiação, uma vez que o aumento da viscosidade representa uma força contrária ao estiramento da fibra.

O processo de imobilização da enzima na malha de PGLD-f-PEGDE eletrofiada altera significativamente a estrutura superficial das nanofibras (**Figura 4.8**). As malhas eletrofiadas adquirem uma característica densamente empacotada, que recorda a formação de um filme superficial, provavelmente devido à aglutinação das fibras na superfície da malha como resultado da ativação dos grupos epóxi para imobilização da enzima.

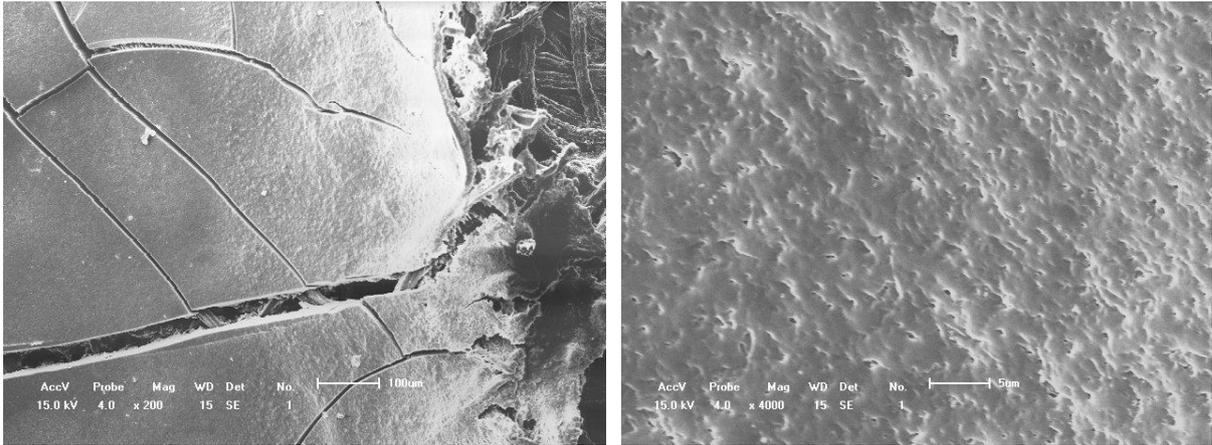


Figura 4-8 Micrografia MEV da malha de PGLD-f-PEGDE eletrofiada (filme superficial).

5. CONCLUSÕES

As curvas de corrente elétrica entre dreno e fonte em função da tensão de referência, obtidas na caracterização elétrica do biossensor com o eletrodo sensível conectado a porta do transistor, permitiram a obtenção da tensão de limiar do dispositivo através dos dois métodos de extração da tensão apresentados. A relação entre a tensão de limiar e a concentração da solução de glicose nos forneceu o mesmo valor da sensibilidade, de 6,43 mV/mM, pelos dois métodos.

É importante notar que esta sensibilidade (mV/mM) é uma medida indireta, que se pode obter da verdadeira sensibilidade aferida pelo eletrodo de referência, já que o ISFET tem a característica de medir o valor das concentrações de íons (H^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^-) do eletrólito (pH).

O valor de sensibilidade obtido através da medida da tensão de limiar em função do pH do eletrólito no eletrodo de referência utilizado no sistema deste trabalho, não pôde ser calculado. Este resultado permitiria que fizéssemos uma comparação detalhada dos valores de sensibilidade encontrado neste trabalho com o reportado na literatura.[38] Assim, os próximos passos seriam: (i) a aferição da sensibilidade (mV/pH) do eletrodo de referência utilizado sob as mesmas condições impostas que forneceram os demais indicadores de sensibilidades; (ii) a verificação de que o valor encontrado segue ou não o modelo de Resposta de Nernst (a variação da tensão de limiar (V_T) deve ser linear com o logaritmo da concentração de íons do eletrólito (pH) a ser analisado) e, por fim; (iii) a comparação dos valores obtidos de sensibilidade (em mV/pH e mV/mM) com os dos biossensores de glicose baseados em ISFETs reportados na literatura.

As micrografias do PGLD-f-PEGDE comprovaram a forma de nanofibras do dendrímero sintetizado pelo método de eletrofiação, além exibir que as fibras deste dendrímero não possuem um diâmetro mono disperso, cujo valores médio e desvio padrão do diâmetro foram de 17,9 e 4,9 μm , respectivamente.

A análise termogravimétrica TGA mostrou que a amostra de PGLD-f-PEGDE apresentou boa estabilidade térmica até cerca de 250°C. Também revelou que houve decomposição térmica do dendrímero em duas etapas, sendo a primeira, compreendida entre 250 - 300°C, mais significativa, tanto na velocidade da reação, quanto na perda de massa do

que a segunda etapa (de 300 a 450°C). No total a perda de massa do dendrímero funcionalizado PGLD-f-PEGDE foi de 80%.

Por fim, podemos concluir que o modelo de biossensor proposto neste trabalho é viável, principalmente pelo alto valor de sensibilidade, do mesmo, à concentração da solução de glicose, que é desejável, pois quanto maior a sensibilidade mais sensível e confiável é a resposta do biossensor.

6. TRABALHOS FUTUROS

Visando a continuação deste trabalho pretendemos encontrar a sensibilidade (em mV/pH) do biossensor utilizado. Também estudaremos um modo de fixar a distância entre o eletrodo de referência e o eletrodo sensível depositados no eletrólito, de modo que a influência desta distância sob a tensão de limiar, obtida através do eletrodo de referência, seja sempre a mesma e, portanto haverá reprodutibilidade dos valores de tensão de limiar e corrente elétrica entre dreno e fonte do transistor.

APÊNDICE A

Para o método de extrapolação linear as curvas obtidas para cada concentração de glicose estão abaixo.

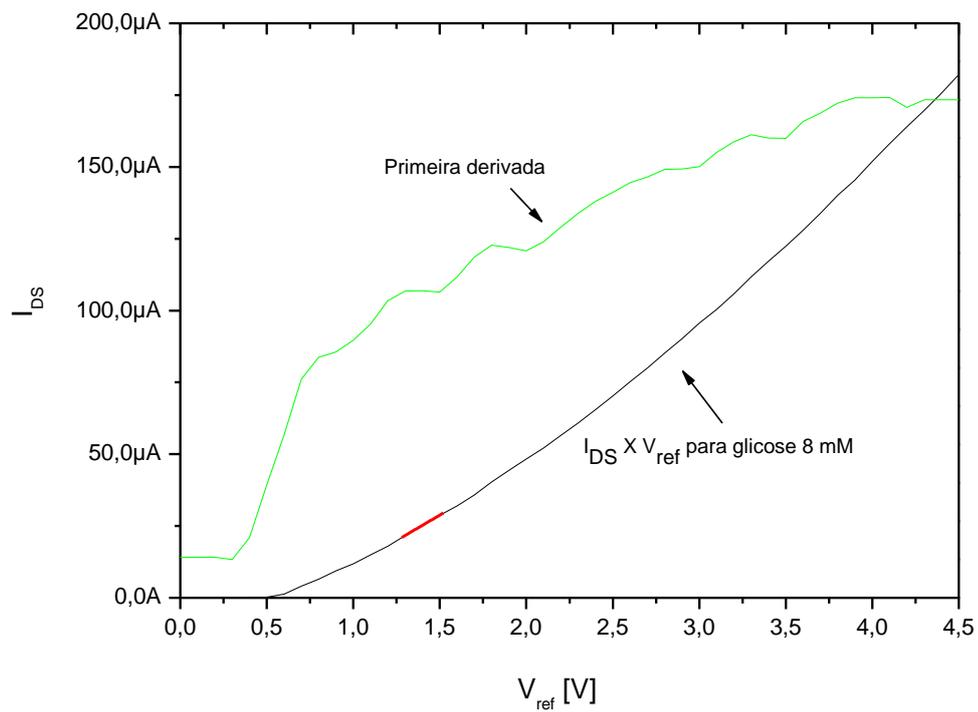


Figura A.1 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 8 mM.

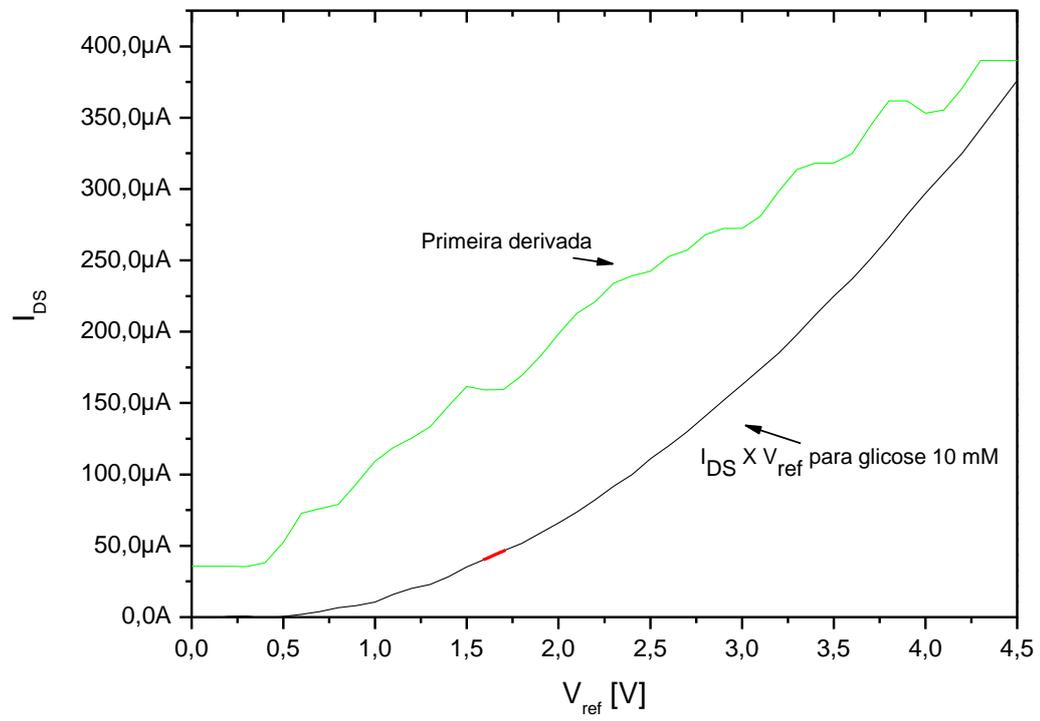


Figura A.2 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 10 mM.

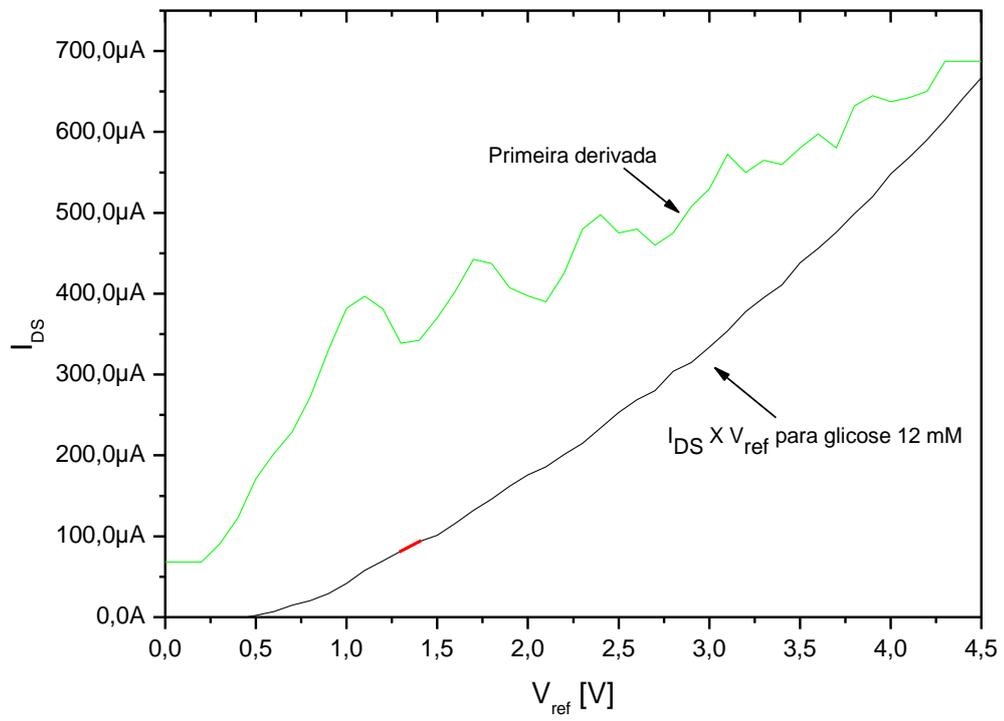


Figura A.3 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referênciA Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 12 mM.

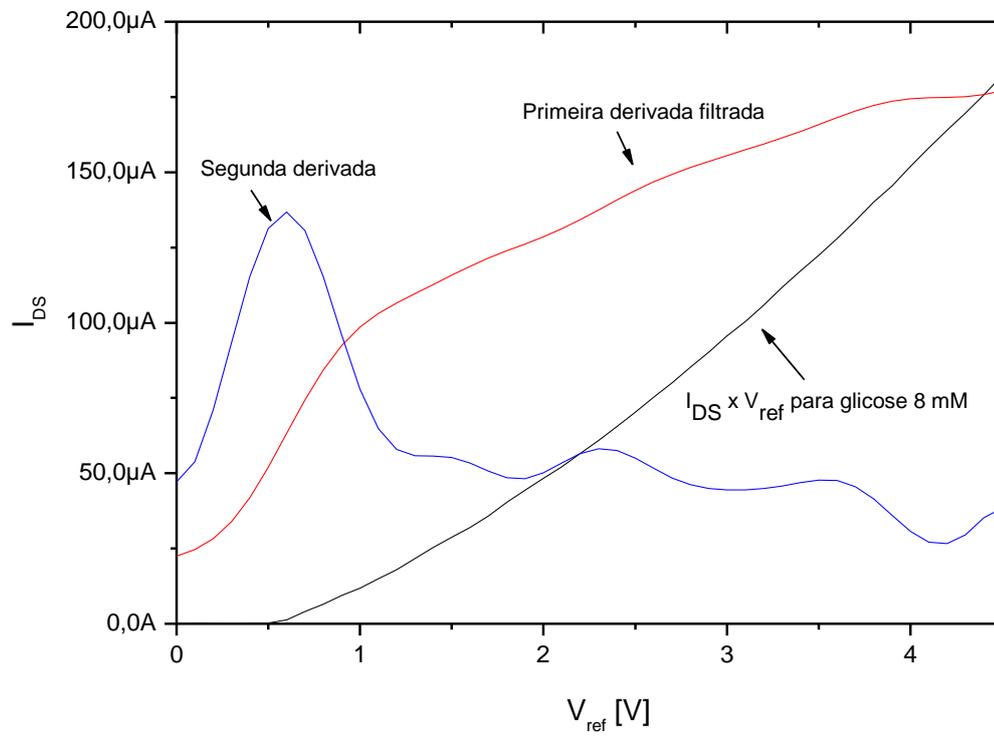


Figura A.4 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 8 mM.

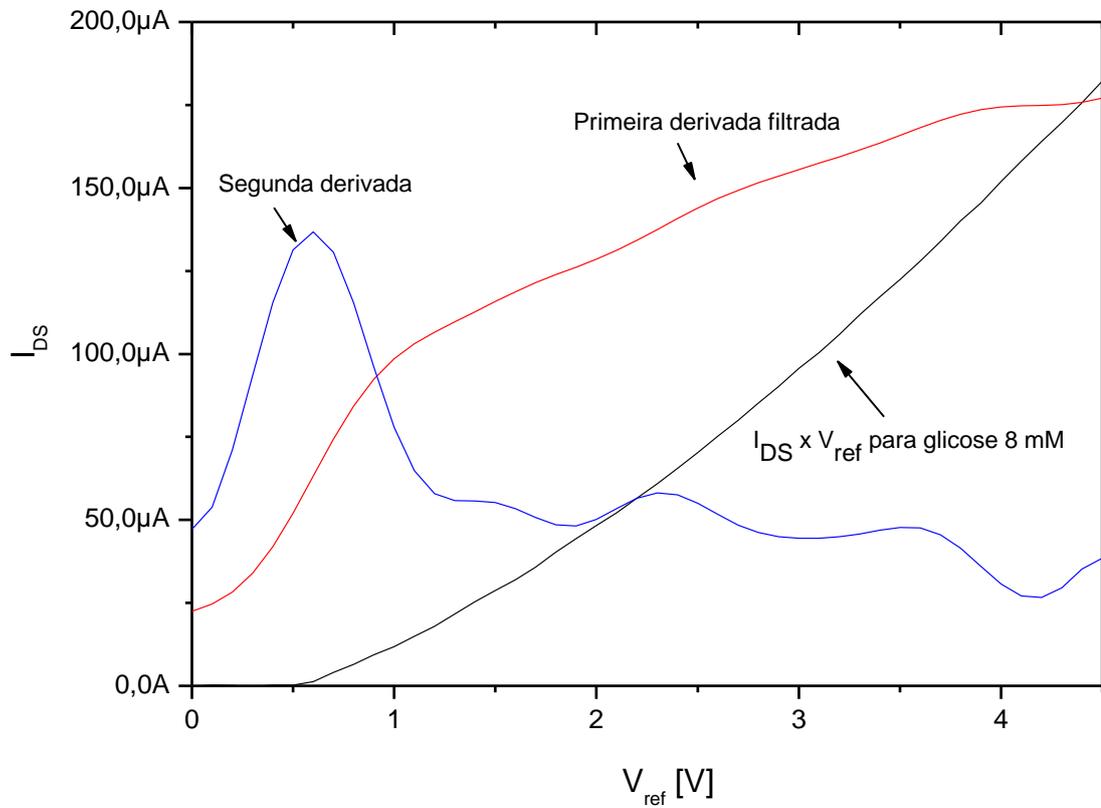


Figura A.5 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referência Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 10 mM.

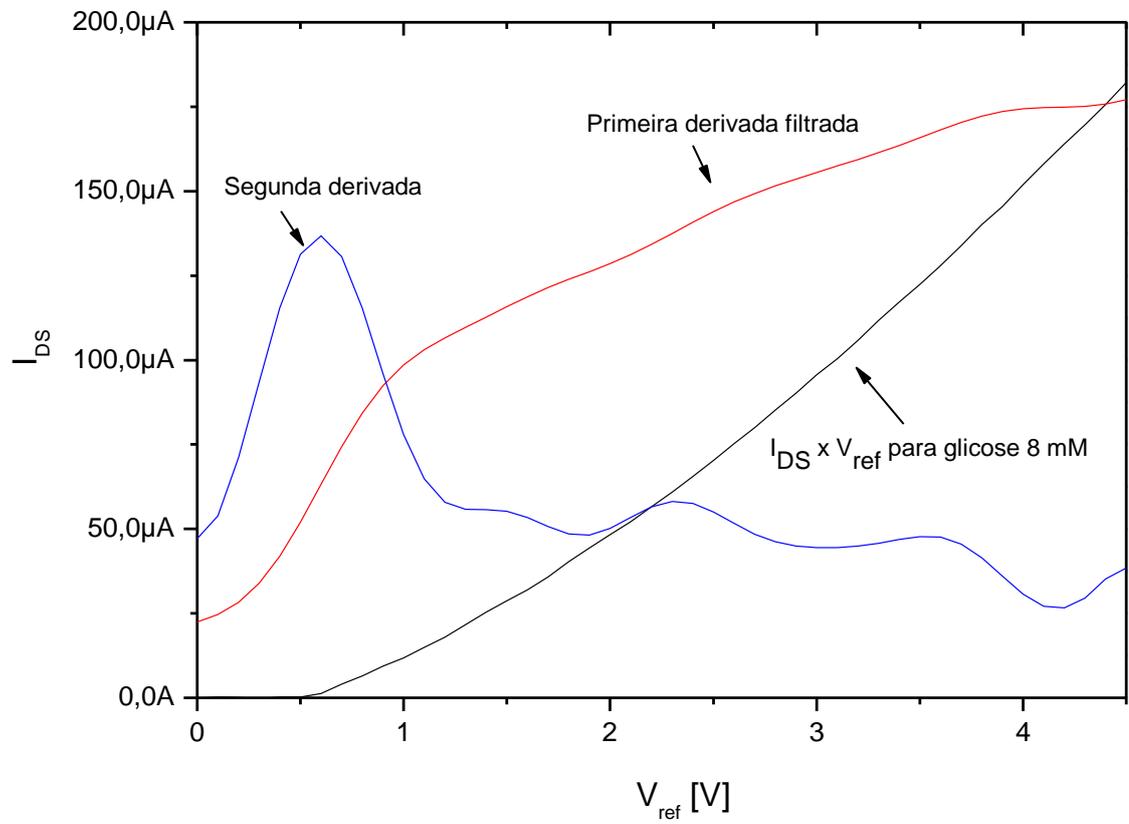


Figura A.6 Curva $I_{DS} \times V_{ref}$ com $V_{DS} = 50$ [mV] e eletrodo de referênciA Ag/AgCl utilizando o eletrólito de 12 mM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGVELD, P. ISFET, theory and practice. Toronto, Canada: IEEE Sensor Conference Toronto, 2003.

BERGVELD, P. IEEE Trans. Bio-Med. Eng., 70 p., 1970.

BERGVELD, P. The impact of MOSFET-based sensors. *Sensors and Actuators*, p. 109-127, 1985.

BERGVELD, P. Sensors for biomedical applications. *Sensors and Actuators*, p. 165-179, 1986.

BERGVELD, P. Thirty years of isfetology: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators*, p. 1-20, 2003.

BRADFORD, M.M.A. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, n.1-2, p. 248-254, 1976.

BRATOV, A.; ABRAMOVA, N.; DOMÍNGUEZ, C. Investigation of chloride sensitive ISFETs with different membrane compositions suitable for medical applications. *Analytica Chimica Acta*, p. 99-106, 2004.

BOSMAN, A.W.; JANSSEN, H.M.; MEIJER, E.W. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. *Chemical Reviews*. n. 99 (7), p. 1665-1688, 1999.

CABREIRA, Vinicius. **ANÁLISE INSTRUMENTAL APLICADA À POLÍMEROS.** Disponível em: < http://chasqueweb.ufrgs.br/~ruth.santana/analise_instrumental/index.html>. Acesso em: 07 maio 2013.

CARAS, S.D., JANATA, J., 1980. Field effect transistor sensitive to penicillin. *Anal. Chem.* 52, 1935–1937.

CHOU, J.; WENG, C.; TSAI, H. Study on the temperature effects of Al₂O₃ gate pH-ISFET. *Sensors and Actuators*, p. 152-157, 2002.

CHUNG, W.; YANG, C.; WANG, Y.; CHAN, Y.; TORBICZ, W.; PIJANOWSKA, D. G.; A signal processing ASIC for ISFET-based chemical sensors. *Microelectronics Journal*, p. 667-675, 2004.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.

CONDE, A. O.; SÁNCHEZ, F. J. G.; LIU, J. J.; CERDEIRA, A.; ESTRADA, M.; YUE, Y. A review of recent MOSFET threshold voltage extraction methods. *Microelectronics Reliability*, p. 583-596, 2002

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharides. *Anal. Biochem.*, v. 22, p. 99-107, 1968.

DE QUEIROZ, A.A.A.; BARACHO, N.C.V.; VARGAS, E.A.T.; BRITO, J. Hyperbranched polyglycerol electrospun nanofibers for wound dressing applications. *Acta Biomaterialia*, v. 1, p. 1-18, 2009.

FERNANDES, E. G. R. Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia), Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2005.

FERNANDES, E. G. R. Imobilização de enzimas em plataformas (sub)microestruturadas para aplicação em biossensores. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2012.

GIAROLA, Vanessa. M. Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2007.

HAGENMULLER, P. Proc. Int. Meeting on Chemical Sensors. Bordeaux, France: Universite Bordeaux, 1986.

HAWKER, C. J.; FRECHET, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 21, p. 7638-7647, 1990.

JAGDALE, S. C.;GAWALI, V. U.;CHEDE, S. M.;KUCHEKAR, B. S.;CHABUKSWAR, A. R.;LOKHANDE, P. D. Dendrimers. *Journal of Natura Conscientia*, v. 1, n. 2, p. 193-201, 2010.

LAGOEIRO,Leonardo. **Facilidades Laboriais.** Disponível em: <<http://www.degeo.ufop.br/laboratorios/microlab/facilidades.htm>>. Acesso em: 07 maio 2013.

LAPEN. **SOBRE O SIMPÓSIO DE DENDRÍMEROS - Importância no contexto da nanotecnologia.** Disponível em: < http://www.fcf.usp.br/lapen/simp_inicio.html/>. Acesso em: 12 abr. 2013.

LEE, T. Over-the-counter Biosensors: past, present, and future. *Sensors*, v. 8, n. 9, p. 5535-5559, 2008.

MACDOWALL, Jennifer. **Glucose Oxidase and Biosensors.** Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_5/Page1.htm>. Acesso em: 12 abr. 2013.

MARQUES, P. R. B. D. O.;YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MARTINO, J. A.; PHAVANELLO, M. A.; VERDONCK, P. B. Caracterização Elétrica de Tecnologia de Dispositivos MOS. Ed. Thomson, 2003.

MONTANARI, M. L.C.; MONTANARI,C. A.;PILÓ-VELOSO,D. Sistemas transportadores de drogas. *Química Nova*, vol. 21, n. 4, 1998.

MORAIS, Marcela Cristina de. Desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida de alta eficiência multidimensional para validação do uso do biorreator gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* para triagem de inibidores. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós-Graduação em Química da UFSC. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2008.

MOURA, R. M., Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrímero de poliglicerol salicilado em diferentes linhagens celulares. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia), Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia.Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2011.

NEWMAN, J. D.;SETFORD, S. J. Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnolog*, v. 32, n., p. 249-268, 2006.

OLIVEIRA, Katharina C. Santos. Desenvolvimento de um biossensor potenciométrico, à base de soja, para determinação de uréia. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química da UFRN. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2008.

SANTOS, Alessandra Nogueira. Aspectos Bioeletroquímicos de Dendrímeros como Nanoplatasformas para Aplicações Clínicas. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia), Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2008.

SANTOS, Jaciara C. de Carvalho. Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da USP. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2012.

SCAFF, Robson. Caracterização elétrica de dispositivos tipo ISFET com estrutura Si/SiO₂/Si₃N₄ para medição de pH utilizando pseudoelétrodos de Pt, Ag e Au. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica (Microeletrônica) da USP. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2008.

SEIYAMA, T.; FUCHI K.; SHIOKAWA, J.; SUSUKI, S. Proc. Int. Meeting on Chemical Sensors. Fukuoka, Japan: Kodansha Ltd.; Amsterdam: Tokyo and Elsevier, 1983.

SEUNG-RO, L.; KAZUAKI, S.; HIDEKUNI, T.; MAKOTO, I. An enhanced glucose biosensor using charge transfer techniques. *Biosensors and Bioelectronics*. p.650-656, 2008.

TERAO, A.; FLANDRE, D.; TAMAYO, E. L.; WIELE, F. V. Measurement of threshold voltages of Thin-Film Accumulation-Mode SOI MOSFETs. New York, NY: *IEEE Electron Device Letters*, 682 p, 1991.

TOMALIA, D. A.; BAKER, H.; DEWALD, J., et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules*, v. 19, n. 9, p. 2466-2468, 1986.

TOMALIA, D. A.; NAYLOR, A. M.; GODDARD III, W. A. Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie*, v. 29, n., p. 138-175, 1990.

UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The enzyme electrode. v. 214, n. 5092, p. 986-988, 1967.

WILSON, R. T., A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

WORTHINGTON, Biochemical Corporation. **Glucose Oxidase**. Disponível em: <<http://www.worthington-biochem.com/GOP/>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

YIN, L.; CHOU, J.; CHUNG, W.; SUN, T.; HSIUNG, S. Separate structure extended gate H⁺ ion sensitive field effect transistor on a glass substrate. *Sensors and Actuators*, p. 106-111, 2000.

YIN, Li-Te; CHOU, Jung-Chuan; CHUNG, Wen-Yaw; SUN, Tai-Ping; HSIUNG, Shen-Kan. Study of indium tin oxide thin film for separative extended gate ISFET. *Materials Chemistry and Physics*, maio 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254058400003734>>. Acesso em: 04 jul. 12.

