

Carlos Cristiano de Jesus Alcântara

**ESTUDO DA ADSORÇÃO DE CAMADAS DE TIÓIS EM OURO  
POR RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. André Avelino Pasa.

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alcantara, Carlos Cristiano de Jesus  
Estudo da adsorção de camadas de tióis em ouro por  
ressonância de plasmons de superfície / Carlos  
Cristiano de Jesus Alcantara ; orientador, André  
Avelino Pasa, 2017.  
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais,  
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2.  
Ressonância de plasmons de superfície. 3. Filmes  
finos. 4. Biossensores. 5. Tióis. I. Pasa, André  
Avelino. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais. III. Título.

Carlos Cristiano de Jesus Alcântara

**ESTUDO DA ADSORÇÃO DE CAMADAS DE TIÓIS EM OURO  
POR RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

Florianópolis, 19 de Junho de 2017.

---

Prof. Guilherme Mariz de Oliveira Barra, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. André Avelino Pasa, Dr.  
Orientador

---

Prof. Márcio Antônio Fiori, Dr.  
Membro externo - Unochapecó

---

Eduardo Isoppo, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Iuri Stefani Brandt, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina



Este trabalho é dedicado à minha  
família.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. André Avelino Pasa, por ter permitido que eu participasse do seu grupo de pesquisa. Muito obrigado pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos membros da banca examinadora, pelo tempo dedicado a leitura e revisão do texto.

Ao Dr. Milton André Tumelero, pelas importantes discussões, ajuda e instrução com procedimentos experimentais.

Ao Dr. Jeison Antônio Fischer e ao Dr. Iuri Stefani Brandt, pela ajuda com medidas eletroquímicas.

Aos meus colegas de laboratório, Maurits Verkerke, Alexandro Amorim Linhares e Lindiomar Borges de Ávila Jr. pela ajuda com experimentos.

Aos demais membros do grupo de Laboratório de Filmes Finos e superfícies (LFFS), pela convivência.

Aos meus amigos de Florianópolis, pelo apoio desde a época da graduação.

Aos meus amigos, Claudio Emanuel Castro dos Anjos e Laís Costa Souza Oliveira, pelos bons momentos desde a infância.

Aos meus pais, José Carlos Feitoza Alcântara e Maria Auxiliadora de Jesus Alcântara, e irmão, Sávio de Jesus Alcântara, pelo apoio e amor incondicional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pelo auxílio administrativo.

A CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.





## RESUMO

Nesse trabalho, a técnica de ressonância de plasmons de superfícies (SPR) foi utilizada para estudar o processo de formação de monocamadas auto-organizadas (SAMs). Moléculas de ácido tioacético (TAA), ácido mercaptoacético (MAA), glutatona reduzida (GSH), hexanotiol (HT), sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e ditioneitol (DTT) foram utilizadas. O dispositivo comercial BI-2000 da empresa *Biosensing Instruments* foi utilizado para as medidas de SPR. Todas as medidas foram realizadas em chips microfluídicos, na ausência de luz e sob controle de fluxo. O protocolo utilizado para a preparação dos substratos, limpeza dos canais e imersão das moléculas foi rigorosamente estabelecido.

Esse estudo demonstrou que a técnica de SPR é apropriada para o monitoramento do processo de adsorção de SAMs. Baseado no protocolo de operação desenvolvido e nos resultados obtidos, sugestões foram descritas com relação ao aperfeiçoamento do instrumento de medida e ao potencial de utilização de SAMs e SPR para o projeto de biossensores.

**Palavras-chave:** Ressonância de plasmons de superfície. Tióis. Biossensores.



## ABSTRACT

In this work, Surface Plasmon Resonance (SPR) was used to study the mechanism of Self-Assembled Monolayer (SAM) formation. Thioacetic acid (TAA), mercaptoacetic acid (MAA), reduced L-glutathione (GSH), hexanethiol (HT), sodium sulfide ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) and dithiothreitol (DTT) were used. The measurements were carried out using a commercial SPR device (BI-2000, *Biosensing Instruments*). All measurements were conducted in microfluidic chips, in the dark and under flow control. The protocol used for preparing the substrates, cleaning the micro-channels and introducing the organic molecules was always the same.

This study proved that SPR is an appropriate technique for detecting the adsorption of SAMs. Based on the operation protocol that was established and on the obtained results, suggestions were given concerning the improvement of the commercial device and the employment of SAMs and SPR for the development of biosensors.

**Keywords:** Surface plasmon resonance. Thiols. Biosensors.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Estruturas química das moléculas de ácido tioacético (TAA), ácido mercaptoacético (MAA), glutationa reduzida (GSH), hexanotiol (HT), sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e ditiotreitól (DTT) utilizadas nesse estudo. ....  | 21 |
| Figura 2: Transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET). A porta metálica do FET é substituída por uma superfície bioquimicamente ativa. ....   | 31 |
| Figura 3: Comparação de diferentes métodos utilizados para a limpeza de substratos de Au baseado em resultados de XPS. ....   | 37 |
| Figura 4: Sistema de multicanais utilizado para analisar a interação entre diferentes moléculas. ....   | 39 |
| Figura 5: Instrumento de medidas de SPR da Biosensing Instruments (modelo BI-2000). Os principais elementos de interface com o usuário são esquematizados na figura: válvulas para controle de fluxo, visores para monitoramento do estado do sistema e porta amostras. ....  | 42 |
| Figura 6: Diferentes etapas observadas em um experimento de SPR. Seguindo da estabilização do sinal, as moléculas aderem ao substrato e se associam com os átomos do mesmo. Após um processo de saturação, as moléculas que não estão especificamente adsorvidas são dissociadas do sensor, até que o sistema atinge um estado de regime permanente. A variação de ângulo de ressonância e a resposta dinâmica permitem inferir parâmetros da interação entre os diferentes compostos envolvidos no experimento. .... | 45 |
| Figura 7: Imagens tipicamente obtidas através do visor da câmara CCD de um instrumento de SPR. Esse resultado pode indicar que a) o sensor está limpo e possui as espessuras adequadas de cada material, b) o sensor pode ser utilizado, mas a contribuição do ruído será maior do que no caso anterior, c) o sensor está contaminado e d) existem contaminações e/ou bolhas na superfície do substrato. ....   | 46 |
| Figura 8: Percentual da luz refletida ( $R_p$ ) em meio aquoso para substratos de vidro BK7 a) sem metal e b) revestidos com 2nm de titânio. ....   | 48 |
| Figura 9: Efeito do índice de refração do vidro utilizado como substrato. Valores inferiores a 1.4 não são capazes de permitir a excitação de plasmons de superfície. ....  | 49 |
| Figura 10: Efeito da espessura do filme fino de Au (ou Ag) utilizado como substrato. Valores situados ao redor de 47nm representam a espessura ótima para a utilização em SPR. ....   | 49 |
| Figura 11: Exemplo de um procedimento de calibração em uma medida de SPR utilizando $\text{H}_2\text{O}$ como solvente. ....  | 51 |
| Figura 12: Experimento completo incluindo etapas de calibração e estabilização do sinal. O sinal foi obtido utilizando modo single. No canal 2 apenas o solvente foi inserido durante todo o procedimento. O sinal obtido pode ser utilizado como referência para aumentar a qualidade da resposta do Canal 1. ....   | 51 |
| Figura 13: Ângulo de ressonância para Hexanotiol (HT) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ . ....  | 53 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 14: Ângulo de ressonância para Ácido mercaptoacético (MAA) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ .  | 55 |
| Figura 15: Ângulo de ressonância para Ácido mercaptoacético (MAA) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ .   | 56 |
| Figura 16: Ângulo de ressonância para Ácido tioacético (TAA) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ .  | 56 |
| Figura 17: Ângulo de ressonância para Sulfeto de sódio em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ .   | 57 |
| Figura 18: Ângulo de ressonância para Sulfeto de sódio em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ .  | 58 |
| Figura 19: Ângulo de ressonância para Ditiotreitól (DTT) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ .  | 59 |
| Figura 20: Ângulo de ressonância para Glutathiona reduzida (GSH) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ .  | 59 |
| Figura 21: Sinal de saturação do SPR ( $R_{\text{max}}$ ) em função das concentrações de $\text{Na}_2\text{S}$ , TAA, DTT, GSH e MAA utilizadas. O comportamento observado indica que o sinal máximo obtido não representa a formação de monocamadas, já que não existe uma saturação do sinal máximo.   | 60 |
| Figura 22: Tempo necessário para atingir 90% ( $t_{0,9}$ ) do sinal máximo ( $R_{\text{max}}$ ) em função das concentrações de $\text{Na}_2\text{S}$ , TAA, DTT, GSH e MAA utilizadas.   | 62 |
| Figura 23: Relação entre o tempo necessário para atingir 90% ( $t_{0,9}$ ) do sinal máximo ( $R_{\text{max}}$ ) em função das concentrações de $\text{Na}_2\text{S}$ , TAA, DTT, GSH e MAA utilizadas.   | 62 |
| Figura 24: Exemplo de eletrodessorção utilizando voltametria cíclica para avaliar monocamadas auto-organizadas de $\text{Na}_2\text{S}$ . A posição e o fator de qualidade do pico são indicativos da homogeneidade e estabilidade do filme fino. Os ciclos seguintes indicam que existem resquícios persistentes no eletrodo, resultados da re-adsorção espontânea e/ou reorganização durante a aplicação de potenciais mais positivos. | 64 |
| Figura 25: Relação entre a carga de eletrodessorção e as concentrações de $\text{Na}_2\text{S}$ , MAA, GSH, DTT e TAA.   | 66 |
| Figura 26: Relação entre a carga de eletrodessorção e o valor do sinal máximo de SPR ( $R_{\text{max}}$ ) para diferentes concentrações de $\text{Na}_2\text{S}$ , MAA, GSH, DTT e TAA.  | 67 |
| Figura 27: Relação entre a carga de eletrodessorção e o tempo necessário para atingir 90% do valor do sinal máximo de SPR ( $t_{0,9}$ ) para diferentes concentrações de $\text{Na}_2\text{S}$ , MAA, GSH, DTT e TAA.  | 68 |
| Figura 28: Relação entre as constantes de associação e dissociação utilizando o método descrito na referência [50] para identificar a existência de sítios heterogêneos para adsorção de moléculas na superfície.  | 69 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

SPR - Ressonância de Plasmons de Superfície

BI – Biosensing Instruments

SAMs – Monocamadas auto-organizadas

TAA - ácido tioacético

MAA - ácido mercaptoacético

GSH - Glutathiona Reduzida

HT - Hexanotiol

DTT - Ditionotritol

Na<sub>2</sub>S - Sulfeto de Sódio

FET - Transistor de Efeito de Campo

MOSFET – Transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor

ISFET – Transistor de Efeito de Campo Sensível a Íons

FPGA – Arranjo de Portas Programáveis em Campo

AFM – Microscopia de Força Atômica

XPS - Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios-X

MEMS - Sistemas Micro-eletromecânicos

MBE - Epitaxia por Feixe Molecular

CVD - Deposição Química em Fase Vapor

WHO - Organização Mundial da Saúde





## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>19</b> |
| 1.1 OBJETIVOS .....   | 20        |
| <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | <b>23</b> |
| 2.1 BIOSSENSORES .....  | 28        |
| 2.1.1 Sensores Resistivos.....  | 28        |
| 2.1.2 Sensores Eletroquímicos.....  | 29        |
| 2.1.2.1 <i>ISFETs</i> .....   | 29        |
| 2.1.3 Sensores Óticos.....  | 31        |
| 2.2 BIOSSENSORES UTILIZANDO RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE .....                           | 32        |
| <b>MÉTODOS EXPERIMENTAIS</b> .....  | <b>35</b> |
| 3.1 SUBSTRATO PARA MEDIDAS DE SPR .....   | 35        |
| 3.1.1 Limpeza .....   | 36        |
| 3.1.2 Deposição De Monocamadas Auto-Organizadas De Tióis.....                                     | 38        |
| 3.2 MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DE MOLÉCULAS .....  | 39        |
| 3.2.1 Descrição Do Sistema.....   | 39        |
| 3.2.2 Operação.....   | 40        |
| 3.2.3 Medidas.....  | 44        |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | <b>47</b> |
| 4.1 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE .....   | 47        |
| 4.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA.....  | 50        |
| 4.2 MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DE CAMADAS DE TIÓIS POR RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE ..... | 52        |
| 4.2 MEDIDAS DE ELETRODESSORÇÃO POR VOLTAMETRIA CÍCLICA .....                                      | 63        |
| <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>71</b> |
| 4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....  | 72        |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>APÊNDICE A – Medidas de eletrodessorção</b> .....  | <b>77</b> |



## INTRODUÇÃO

Glicose é a molécula mais importante para o metabolismo bioenergético. Por outro lado, diabetes mellitus é a disfunção endócrina mais comum do metabolismo desse carboidrato. Globalmente, diabetes é uma causa comum de morbidez e mortalidade e um dos maiores problemas de saúde nas sociedades. A prevalência de pré-diabetes ou diabetes apresenta uma tendência crescente. A Organização Mundial da Saúde (WHO) estima que 171 milhões de pessoas sejam afetadas por essa doença atualmente, com expectativas de 366 milhões em 2030 [12-14].

Em seres humanos, é recomendado manter níveis normais de glicose no sangue para evitar a progressão de doenças relacionadas a níveis altos ou baixos desse carboidrato. Essas recomendações são ainda mais críticas para diabéticos, pois são mais vulneráveis ao aparecimento de complicações crônicas decorrentes da falta de uma terapia apropriada, que pode resultar em morte. Devido a essas recomendações, diferentes dispositivos para o monitoramento de glicose têm sido desenvolvidos. Em consequência, a tecnologia de biossensores evoluiu rapidamente e possui um papel fundamental como ferramenta analítica para diversas aplicações, particularmente em medicina.

Um biossensor é um dispositivo que converte uma resposta biológica em um sinal quantificável e processável [9]. Esses dispositivos podem ser aplicados para analisar fluidos, alimentos, células, etc. Alguns componentes de biossensores incluem receptores biológicos (que se ligam preferencialmente ao material biológico analisado), transdutores (óticos, eletroquímicos, térmicos, etc.) e circuitos eletrônicos (utilizados para amplificar, processar e transmitir o sinal para o usuário). Os requisitos desejáveis em biossensores incluem confiabilidade, rapidez, precisão, praticidade e estabilidade (química, mecânica, etc.). Entretanto, ainda existem muitos desafios relacionados ao monitoramento contínuo dos níveis de glicose. Utilizando tecnologias avançadas, incluindo estratégias de imobilização e nanotecnologia, as pesquisas relacionadas a esse tema geram grande atividade na comunidade científica e tecnológica.

A Associação Americana de Diabetes (ADA) recomenda que o erro máximo em dispositivos portáteis seja de 5%. Por outro lado, muitos dispositivos não respeitam esse critério. A tecnologia de biossensores está longe de ser tão precisa quanto os métodos clínicos [15], justificando o desenvolvimento e pesquisa de novos sensores de glicose.

Abordagens *bottom-up* de fabricação oferecem possibilidades que podem preencher algumas das lacunas deixadas pela tecnologia *top-down* comumente empregada na indústria de semicondutores. Uma das opções

mais promissoras é a utilização de monocamadas auto-organizadas (*Self Assembled Monolayers – SAMs*). Essas estruturas supramoleculares ocorrem como resultado da adsorção de moléculas em uma superfície [4]. Esses sistemas começaram a ser pesquisados nos anos 40 devido ao uso de surfactantes utilizados para limpar superfícies metálicas. Foi observado que clorossilanos e alcanotiolatos poderiam ser usados para tornar a superfície de vidro e ouro hidrofóbicas. O método se tornou popular principalmente devido a sua simplicidade. Como resultado, cadeias complexas com grupos especificamente escolhidos para a cabeça e cauda da molécula puderam ser sintetizadas. Dessa forma, esses sistemas puderam ser empregados para o estudo fundamental de processos de auto-organização molecular, relações entre estrutura e propriedades, fenômenos de interface, etc. [4]. Por fim, parte da popularidade se deve também ao uso dessa interface para aplicações biomédicas [5].

O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos representa um exemplo prático e atual da utilidade de SAMs. Adicionalmente, sensores de glicose (por exemplo) baseados na ação de eletrodos funcionalizados com enzimas constituem um exemplo de eletrônica molecular [8]. Como será discutido no próximo capítulo, existe um interesse sólido na indústria e em laboratórios de pesquisa em solucionar os problemas existentes com o desempenho de sensores de glicose miniaturizados. Esse tipo de biossensor também pode ser visto como um modelo para a comparação entre diferentes topologias e/ou estratégias de funcionalização de superfície. Dessa forma, esse trabalho teve como uma das principais motivações a compreensão do processo de formação de SAMs com o objetivo de possibilitar a fabricação de dispositivos para a detecção de glicose.

## 1.1 OBJETIVOS

A ressonância de plasmons de superfície (SPR) é amplamente utilizada para a caracterização de processos bioquímicos, desenvolvimento de drogas e de protocolos para a funcionalização biológica de superfícies [41].

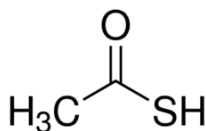
O propósito desse projeto foi avaliar a performance de sensores baseados em ressonância de plasmons de superfície para o monitoramento do processo de adsorção (em particular, fisissorção), de monocamadas auto-organizadas de tióis. Para tal, os objetivos específicos foram:

- Estudar o mecanismo de operação do sistema comercial BI-2000;

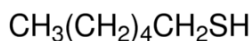
- Desenvolver um protocolo para a preparação dos substratos utilizando diferentes compostos: ácido tioacético (TAA), ácido mercaptoacético (MAA), glutationa reduzida (GSH), hexanotiol (HT), sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e ditiotreititol (DTT). As respectivas estruturas moleculares são mostradas na Figura 1.
- Avaliar as limitações da técnica e do sistema comercial para o monitoramento da adsorção de SAMs em meio aquoso;
- Relacionar as medidas de SPR com medidas eletroquímicas;
- Concluir sobre o benefício da utilização de SPR para o desenvolvimento de biossensores.

Figura 1: Estruturas química das moléculas de ácido tioacético (TAA), ácido mercaptoacético (MAA), glutationa reduzida (GSH), hexanotiol (HT), sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e ditiotreititol (DTT) utilizadas nesse estudo.

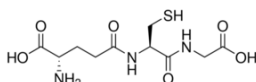
- **Ácido Tioacético (TAA)**



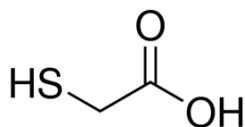
- **1-Hexanotiol (HT)**



- **Glutationa Reduzida (GSH)**



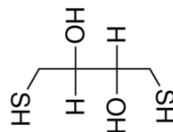
- **Ácido Mercaptoacético (MAA)**



- **Sulfeto de Sódio**



- **DL-Dithiothreititol (DTT)**





## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os progressos nas áreas de magnetismo e semicondutores observados nas últimas décadas possibilitaram uma revolução na forma como informações são processadas e transmitidas. Como descrito em [1], há cerca de 60 anos um ser humano possuía em média dois ou três ímãs. Hoje em dia, qualquer dispositivo eletrônico moderno possui bilhões de bits de armazenamento, cada um sendo um eletroímã. Essa rápida evolução se deve principalmente ao rápido desenvolvimento de processos de padronização de superfície (litografia) e deposição de filmes finos, utilizando abordagens *top-down* de fabricação.

Normalmente, uma etapa do processo de construção de *chips* envolve a evaporação de materiais (condutores, semicondutores ou isolantes) em um substrato utilizando evaporação (feixe de elétrons ou epitaxia por feixe molecular – *MBE*, por exemplo) ou reações químicas (por exemplo, deposição química em fase vapor – *CVD*), onde espécies ativas são usadas para catalisar a redução de elementos químicos em uma superfície sólida. Posteriormente, reações (físicas ou químicas) são empregadas para remover os resíduos de fotorresiste e demais contaminantes resultantes do processo de padronização do substrato. Essas etapas (incluindo outras que foram omitidas, como limpeza, ativação da superfície, etc.) são repetidas sucessivas vezes com o objetivo de se obter as diferentes multicamadas necessárias para o projeto de circuitos eletrônicos. Embora de fácil compreensão qualitativa, a tecnologia de fabricação de semicondutores requer equipamentos e ambientes com altos graus de precisão e limpeza, além de recursos humanos altamente especializados.

Os primeiros transistores fabricados no início do século 20 eram baseados em Germânio [2]. Logo foi concluído que a utilização de Silício era mais apropriada devido à facilidade de manipulação, estabilidade em altas temperaturas e fácil/alta disponibilidade de matéria prima.

Dispositivos baseados em Si possuem menos fuga de corrente e a capacidade de suportar maiores níveis de potência elétrica. Diodos de Ge, por outro lado, possuem menor queda de tensão. Dessa forma, eles podem ser uma melhor opção em certas aplicações que requerem detecção de sinais de baixa amplitude e retificação sem a necessidade de circuitos densos (circuitos de radiofrequência, por exemplo) [2]. Entretanto, essa situação representa apenas um nicho específico da indústria eletrônica.

De forma geral, o setor é altamente (quase que exclusivamente) dependente de silício. Isso significa que todo o processo é otimizado para processar esse material. Durante as últimas décadas, a tendência em

microeletrônica tem sido a redução das dimensões dos componentes, permitindo incrementar a densidade de energia e frequência de operação. Por um longo tempo, o maior problema foi a resolução e reprodutibilidade dos processos de litografia. Pesquisa e desenvolvimento nessa área evoluíram rapidamente, o que permitiu um progresso extremamente acelerado.

Por algumas décadas a densidade superficial de transistores em circuitos eletrônicos dobrou a cada ano, comportamento conhecido como lei de Moore. Hoje em dia, entretanto, o crescimento exponencial do número de transistores atingiu um platô. Processos sub-10nm já são utilizados comercialmente [3]. Nessa escala, dispositivos baseados em silício não possuem uma performance adequada, principalmente devido a perdas resultantes de efeitos quânticos. Dessa forma, no momento o maior obstáculo da indústria é encontrar alternativas para o Silício que possuam um desempenho adequado em escalas nanométricas.

Até então, as alternativas mais mencionadas na literatura utilizam semicondutores dos grupos III-V e II-VI (AsGa, InP, GaP, GaN, etc.). Essa estratégia é muito utilizada na fabricação de células solares e transistores para eletrônica de potência. Nesses dois casos essa pode ser uma alternativa economicamente viável porque a fabricação desses dois tipos de dispositivo não necessariamente depende da compatibilidade com o processamento de silício. Por outro lado, ambientalmente essa é uma solução insustentável.

Uma das possibilidades mais promissoras é a utilização de sistemas bidimensionais (monocamadas ou gases eletrônicos). Na última década foi provado que monocamadas de grafeno são estáveis em condições normais de temperatura e pressão. Desde então, utilizando as mesmas técnicas introduzidas por André Geim e Konstantin Novoselov (laureados com o prêmio Nobel de física em 2010), outros materiais apresentando monocamadas estáveis em condições ambientes foram descobertos. Os mais interessantes são os dicalcogenetos de metais de transição ( $\text{MoS}_2$ ,  $\text{WS}_2$ ,  $\text{WSe}_2$ , etc.) e nitreto de boro. Esses compostos são úteis por si só e/ou quando preparados na forma de heteroestruturas. Por exemplo, o desempenho de transistores de grafeno é consideravelmente superior quando nitreto de boro é utilizado como substrato e ou porta (*gate*) do dispositivo (permitindo, por exemplo, condução balística de elétrons e relação elevada entre os valores de corrente no estado ligado e estado desligado –  $I_{ON}/I_{OFF}$  ratio). Sistemas bidimensionais também são úteis para o estudo de fenômenos mesoscópicos associados com interações entre spins e/ou elétrons (transição metal-isolante, efeito hall quântico fracionário, polarização pelo efeito Zeeman, etc.).



Apesar de todas as possibilidades ainda existentes utilizando os processos de fabricação atuais, a produção em massa de monocamadas (grafeno, MoS<sub>2</sub>, WS<sub>2</sub>, etc.) ainda é inviável de um ponto de vista prático. Além disso, as excelentes propriedades de condução eletrônica são observadas apenas em condições de ultra vácuo e baixa temperatura. Dessa forma, a utilização em dispositivos comerciais ainda está condicionada a vários aspectos práticos, que não foram resolvidos. Adicionalmente, existe uma tendência no mercado em produzir dispositivos customizados para aplicações específicas. Nesse caso, as características desejadas não estão necessariamente associadas a circuitos de alta densidade, elevada frequência de operação e ultrabaixo consumo de energia. O requisito essencial pode ser flexibilidade mecânica ou custo de produção, por exemplo [6]. Nesse caso, existem alternativas mais atrativas do que aquelas baseadas em Silício, semicondutores do grupo III-V e/ou sistemas bidimensionais. Uma solução, por exemplo, é a utilização de materiais orgânicos.

Apesar das performances inferiores de dispositivos orgânicos, o desempenho obtido é suficiente para uma vasta gama de aplicações (biossensores descartáveis, eletrônica maleável para vestuários, sensores ambientais, etc.). Adicionalmente, existem vantagens ambientais sobre a utilização desses materiais, que são potencialmente não-citotóxicos (incluindo os dejetos resultantes da fabricação). Os mesmos argumentos são utilizados para sistemas micro eletromecânicos (*MEMS*) e demais micro/nano-atuadores, *lab on a chip*, etc. Finalmente, existe uma tentativa de associar circuitos eletrônicos com elementos biológicos para implementar sistemas bio-eletrônicos, estudar eletro-fisiologia, etc. [26]. Essa classe de materiais é mais apropriada do que as tradicionalmente usadas na indústria.

Dispositivos orgânicos baseados em monocamadas auto-organizadas (*Self-Assembled Monolayers* – *SAMs*) são particularmente apropriados para aplicações biomédicas. Monocamadas de ácidos graxos (por exemplo, ácidos alcanóicos de cadeia longa), derivados de organosilício (silanos com diferentes grupos, por exemplo) e organo-enxofre são os tipos de compostos mais estudados para a preparação de *SAMs* [6]. Eles podem ser preparados em uma variedade de substratos, incluindo dióxido de silício, alumina, quartzo, vidro, mica, seleneto de zinco, dióxido de germânio, silício, prata e ouro. Além disso, embora o empacotamento e ordenamento das monocamadas sejam altamente influenciadas por fatores associados com a morfologia do substrato, estruturas altamente organizadas podem se formar mesmo em substratos amorfos. Dessa forma, o método é extremamente versátil. Por exemplo,

um trabalho recente construiu sistemas mecânicos utilizando uma abordagem supramolecular [7]. Um rotor com eixo rígido foi montado em uma superfície de Au (111) e acoplado a um componente móvel perpendicular à sua superfície. Foi observado que a utilização de SAMs mistos permite o controle da distribuição de eixos acoplados a um rotor móvel. Em outras palavras, esse estudo demonstrou que métodos de padronização *bottom-up* são uma possibilidade real.

Outra área proeminente que pode ser beneficiada por progressos na área de monocamadas auto-organizadas é a eletrônica molecular. Nesse tipo de sistema, moléculas são utilizadas como os elementos principais de dispositivos eletrônicos. Elas servem para conduzir corrente elétrica e/ou modular as características de transporte de carga dos eletrodos. Com relação a estrutura, os arranjos eletrônicos podem ser junções moleculares de dois terminais (tipo de construção mais comum, utilizada para a fabricação de chaves), canais de dois terminais (empregados para alterar as características de transistores de efeito de campo, por exemplo), dispositivos eletroquímicos de três terminais ou dispositivos de efeito de campo de três terminais [6, 8]. Assim sendo, SAMs também podem ser utilizados para a fabricação de circuitos eletrônicos, já que substratos podem ser padronizados e funcionalizados utilizando uma abordagem *bottom-up* [8, 9]. Quando associados a estruturas mecânicas sintetizadas empregando a mesma técnica, sistemas completos (incluindo sensores e atuadores) poderiam ser construídos. A realização prática do que é até então apenas uma possibilidade poderia beneficiar áreas relacionadas a liberação controlada de drogas, micro-robótica, engenharia de tecidos e desenvolvimento de biossensores (por exemplo, para a detecção de glicose) [10, 11].

Os primeiros métodos analíticos utilizados para a medição do nível de açúcar no sangue de diabéticos foram introduzidos em 1870, baseados em polarimetria, fermentação de glicose e redução de Cu(II) em Cu(I). Entretanto, as pesquisas em biossensores se tornaram intensas apenas após o desenvolvimento do primeiro sensor empregando glicose oxidase (*GOx*) em 1962, por Clark e Lyons [16]. Esse dispositivo foi inicialmente comercializado em 1975. Em 1971 foi introduzido o primeiro dispositivo produzido em larga escala (*Ames Reflectance Meter*). Nesse aparelho, a glicemia era calculada a partir de alterações óticas de uma fita enzimática [12, 13]. Ao contrário dos dispositivos até então fabricados, este não necessitava de grandes quantidades de sangue e era mais preciso. A primeira solução para o uso doméstico foi comercializada em 1987, com princípio de funcionamento similar ao dispositivo de Clark e Lyons [17].

Nos dias atuais, o método mais comum para o monitoramento de glicose é a análise de sangue obtido através da perfuração da pele. Apesar da sua aplicação amplamente difundida, esse sistema não é suficientemente preciso, é desconfortável e possui um custo relativamente elevado [18]. Alternativamente, empregando o mesmo princípio, existem métodos menos invasivos. A diferença consiste nas dimensões do dispositivo. Esse tipo de sistema utiliza agulhas com dimensões comparadas ao diâmetro de um fio de cabelo humano. Por essa razão, o processo de extração é menos doloroso, embora ainda existam riscos de infecção e irritação [19, 20].

Sensores não-invasivos de glicose monitoram os níveis desse carboidrato indiretamente, através de sensoriamento externo, sem perfurar a pele. Em geral, esses dispositivos são baseados em métodos óticos ou transdermais. Métodos óticos incluem Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) ou Médio (MIR) (a luz é transmitida através da pele e o padrão de absorção é analisado para calcular a glicemia), Espectroscopia Raman (variações de frequência de luz devido a espalhamento inelástico são correlacionadas com a concentração das moléculas analisadas), Espectroscopia Fotoacústica (monitoramento baseado nas ondas de ultrassom geradas devido à absorção de luz infravermelha), Polarimetria (detecta glicose no humor aquoso através do grau de rotação do vetor de polarização da luz), Espectroscopia Térmica (análise baseada em variações de temperatura e sinal infravermelho) e Fluorescência (a intensidade da luz fluorescente emitida é modulada em função da concentração de glicose). Um método transdérmico bem estabelecido é a Espectroscopia por Bioimpedância, onde a concentração de glicose é calculada através de variações de impedância da pele. As desvantagens desses métodos estão associadas à penetração limitada da luz, perturbação da medida introduzida pela presença de outras espécies biológicas (MIR/NIR, Espectroscopia Fotoacústica), perigos relacionados com a exposição à radiação (Espectroscopia Raman), sensibilidade devido a variações de pH, temperatura, movimento (Polarimetria) e custos elevados [12, 13, 19, 21-25].

Sistemas invasivos utilizados para o monitoramento contínuo de glicose são majoritariamente baseados em transdutores eletroquímicos [9, 24]. Um sistema completo possui um biossensor (geralmente contendo uma camada enzimática), um dispositivo de inserção e um receptor localizado externamente à pele. Suas principais desvantagens estão associadas à limitação de oxigênio in vivo, necessário para a oxidação da glicose, estabilidade enzimática e corrosão dos eletrodos [26, 27].

Recentemente, sensores osmóticos também têm recebido atenção na literatura [12, 13]. Esses dispositivos utilizam a pressão hidrostática gerada devido ao transporte de solvente através de uma membrana semipermeável (resultante da competição entre concanavalina A e dextran por glicose, por exemplo). Algumas vantagens desse método são estabilidade (não há consumo de reagentes), não-liberação de produtos nocivos, baixo custo e baixo consumo energético.

## 2.1 BIOSSENSORES

### 2.1.1 Sensores Resistivos

Sensores baseados na variação da resistência elétrica entre dois terminais como resultado de um estímulo externo (variação de temperatura, humidade, pressão, etc.) provavelmente representam a classe de sensores mais simples. Esse fenômeno está associado com a mudança das características de transferência de carga quando moléculas são adsorvidas na superfície e/ou quando ocorrem modificações estruturais resultante de um gradiente térmico, por exemplo.

Apesar da simplicidade, a miniaturização dessa tecnologia requer o desenvolvimento de circuitos eletrônicos relativamente complexos arquitetados com o objetivo de minimizar o consumo de energia e reduzir a contribuição de ruídos [26]. Dessa forma, a solução final (em termos de projeto) não possui a mesma facilidade de construção. Ainda assim, a síntese de controladores (por exemplo) utilizados para alterar as respostas dinâmicas do dispositivo possuem um efeito limitado, já que existem graus de liberdade suficientes (em comparação ao mecanismo de funcionamento de transistores, por exemplo), para que diversos critérios de desempenho sejam atingidos.

Apesar disso, esse tipo de configuração é útil para propósitos de pesquisa. Os dois eletrodos podem ser conectados a soluções comerciais (potenciostato, por exemplo) para avaliar o desempenho da camada sensitiva que será utilizada como interface para monitorar as espécies biológicas (no caso de um biossensor) [9]. Em outras palavras, sensores resistivos podem tornar mais simples a análise de medidas objetivando a avaliação da seletividade e sensibilidade de filmes finos com relação a analitos específicos, excluindo variáveis associadas com circuitos eletrônicos adicionais.

Por outro lado, sensores eletroquímicos e/ou óticos são as alternativas mais apropriadas para o desenvolvimento de sensores miniaturizados com altos graus de precisão, baixos níveis de ruído e consumo energético [12,13].

### 2.1.2 Sensores Eletroquímicos

Sensores eletroquímicos podem ser facilmente associados com circuitos eletrônicos, permitindo o desenvolvimento de dispositivos integrados com baixo custo de produção e pouca complexidade operacional. Esse tipo de sistema é estável, facilmente miniaturizado e apresenta limites de detecção amplos [28, 29]. Para evitar que biossensores baseados nessa tecnologia possuam pouca sensibilidade e seletividade, pode ser vantajoso utilizar componentes nano-estruturados, provavelmente devido às dimensões semelhantes entre os componentes sensíveis e as moléculas analisadas [9].

As reações eletroquímicas podem ser quantificadas através de corrente elétrica (amperometria), potencial elétrico ou acúmulo de carga (potenciometria) e alterações das propriedades de condução (condutometria). Como variações desses modos, pode-se considerar variações de impedância e o efeito de campo em transistores utilizados para medir a corrente [9, 30-32].

Dentre os tipos de sensores eletroquímicos mencionados, dispositivos baseados em transistores de efeito de campo (*Field Effect Transistor - FET*) são os mais apropriados para aplicações atuais. Isso se deve à fácil conectividade com elementos micro/nano-eletrônicos, métodos de fabricação em larga escala, miniaturização e operação em baixa potência [33]. Dentre as inúmeras possibilidades estruturais existentes para a fabricação de FETs, a tendência atual em pesquisa e desenvolvimento de biossensores utilizando essa tecnologia é o emprego de transistores de efeito de campo sensíveis a íons (*Ion Sensitive Field Effect Transistor - ISFET*). Esses dispositivos possuem um mecanismo de operação semelhante ao de FETs convencionais. A diferença é a substituição da porta metálica por materiais eletroativos (maiores detalhes serão descritos adiante). Apesar de suas inúmeras vantagens, ISFETs foram comercializados apenas como sensores de pH. Alguns dos obstáculos incluem dificuldade de padronização do processo de imobilização da enzima e métodos de deposição compatíveis com processos utilizados na indústria de semicondutores [9, 33-35].

#### 2.1.2.1 ISFETs

O transistor de efeito de campo utiliza o campo elétrico para modular a condutividade do canal semicondutor. Uma das formas de operação é através da variação do potencial elétrico, em relação à fonte e ao dreno ( $V_{DS}$ ), na porta do transistor ( $V_G$ ). A existência de um determinado potencial, negativo ou positivo, nesse eletrodo pode atrair ou repelir

portadores de carga no canal. Os valores específicos de tensão estão associados à configuração e dopagem do semiconductor. Em função dessa dinâmica (variação da densidade de portadores na região de depleção) as dimensões elétricas efetivas do canal são variadas, resultando em alterações de condutância entre a fonte e o dreno. O FET pode operar em regime linear ou de saturação. No primeiro, o dispositivo atua como um potenciômetro; no segundo modo, o transistor opera como uma fonte de corrente constante.

Como discutido anteriormente, um FET pode ser modificado através da substituição da porta metálica por uma superfície bioquimicamente ativa (um dos métodos mais populares é a imobilização de enzimas) que estará em contato com o analito (molécula sob análise). Para completar o circuito elétrico, um eletrodo de referência, também em contato com a solução, é utilizado [9, 12].

Dessa forma, o ISFET (Figura 2) é um MOSFET, onde a conexão da porta é separada do transistor na forma de um eletrodo de referência inserido em um líquido, que está em contato com o óxido da porta ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  são comumente empregados) [9, 12, 36].

A teoria dos ISFETs é detalhadamente descrita em [37, 38]. A explicação resumida a seguir se baseia nesses dois trabalhos. A expressão da corrente de dreno no modo linear é:

$$I_d = C_{OX}\mu \frac{W}{L} \left[ (V_{gs} - V_t)V_{ds} - \frac{1}{2}V_{ds}^2 \right] \quad (1)$$

Na equação acima,  $C_{OX}$  é a capacitância do óxido por unidade de área,  $W$  e  $L$  são a largura e comprimento do canal, respectivamente,  $\beta = C_{OX}\mu \frac{W}{L}$  é o parâmetro de sensibilidade geométrica (constante),  $V_t$  é a tensão limiar do dispositivo (pode ser considerado constante devido aos métodos altamente controlados de fabricação) e  $\mu$  representa a mobilidade eletrônica do canal. Dessa forma, a corrente de dreno  $I_d$  é função somente da tensão de entrada  $V_{gs}$ .

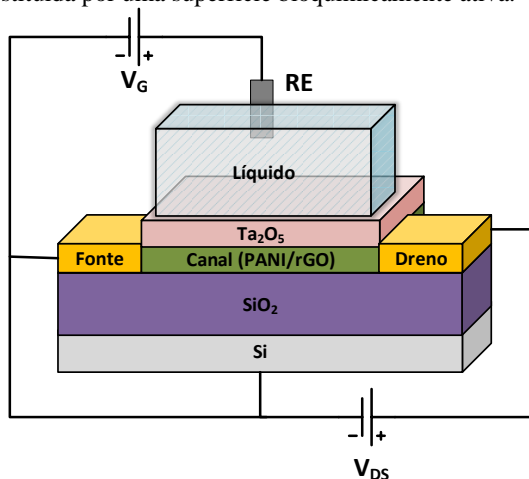
Nos ISFETs os potenciais de interface devem ser considerados no cálculo da tensão limiar devido à introdução do eletrodo de referência. Em MOSFETs, a equação da tensão limiar é função da diferença das funções trabalho do *gate* metálico ( $\Phi_M$ ) e do silício ( $\Phi_{Si}$ ), da carga de depleção no silício ( $Q_B$ ), da carga acumulada no óxido ( $Q_{OX}$ ) e na interface óxido/silício ( $Q_{SS}$ ) e a um termo relacionado ao nível de Fermi ( $\Phi_f$ ). No caso de ISFETs, o potencial constante do eletrodo de referência ( $E_{ref}$ ) e o potencial de interface  $\Psi + \chi^{sol}$  devem ser considerados ( $\Psi$  é

função do pH e  $\chi^{sol}$  é o potencial de dipolo da superfície do solvente). A equação da tensão limiar é representada pela Equação 2:

$$V_t = E_{ref} - \Psi + \chi^{sol} - \frac{\Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{OX} + Q_{SS} + Q_B}{C_{OX}} + 2\Phi_f \quad (2)$$

A partir dos mecanismos físicos e equações previamente apresentados, pode-se concluir que o ISFET é eletronicamente idêntico a um MOSFET, com a possibilidade adicional de modular quimicamente a tensão limiar.

Figura 2: Transistor de efeito de campo sensível a íons (ISFET). A porta metálica do FET é substituída por uma superfície bioquimicamente ativa.



Dessa forma, a introdução de SAMs arquitetados e funcionalizados com o propósito específica de otimizar a modulação química na superfície de ISFETs poderia auxiliar a solucionar alguns dos maiores problemas associados a esse tipo de sensor: *drift*, especificidade e estabilidade, particularmente ao lidar com enzimas ou compostos instáveis que catalisam a quebra de moléculas e transferência de carga (i.e. azul da Prússia).

### 2.1.3 Sensores Óticos

Como mencionado acima, sensores eletroquímicos possivelmente apresentam o melhor compromisso entre precisão e praticidade em aplicações onde uma interface eletrônica é desejável. Recentemente,

pesquisadores demonstraram um circuito capaz de replicar o sinal emitido pelo pâncreas para estimular a produção de insulina [39]. Um dos maiores obstáculos, entretanto, é o sensor de glicose necessário para completar a malha de controle. Nesse caso, a utilização de ISFETs é provavelmente a escolha mais apropriada.

Apesar disso, o tipo de sensor (ou biossensor) que oferece os melhores limites de detecção e tempo de resposta são aqueles baseados em mecanismos óticos. Nesse caso, a natureza não invasiva desse método é uma vantagem adicional. Em certas circunstâncias, por outro lado, a dissipação do sinal decorrente de barreiras óticas/mecânicas podem ser uma desvantagem. Essa é uma situação comum quando eventos biológicos dentro do corpo devem ser detectados utilizando um detector extra-dérmico. Nesse tipo de situação, existe a possibilidade de integrar o mecanismo de monitoramento em células micro-fluídicas. Essa capacidade de miniaturização é possível principalmente devido a progressos recentes na área de fotônica e plasmônica. Em particular, sensores baseados na ressonância de plasmons de superfície (SPR), e suas diferentes variantes, são uma das opções mais promissoras.

Um exemplo de biossensor miniaturizado e inserido em canais micrométricos, uma espécie de *lab on a chip*, foi demonstrado recentemente para a detecção de concentrações sub-femtomolares de uRNA [40]. Existem diversas modificações estruturais que podem ser introduzidas em microestruturas para estimular a presença de plasmons, uma das quais utiliza micro cavidades em fibras óticas para canalizar a fonte luminosa e satisfazer as condições associados aos vetores de onda. Esse tipo de tecnologia não está associado apenas a possibilidades de miniaturização, mas também com a detecção individual de moléculas. Em todo caso, as vantagens e desvantagens de sensores óticos e eletroquímicos podem ser balanceadas entre si. Em outras palavras, mecanismo de detecção associando essas duas tecnologias podem trazer vantagens, tais como maior facilidade de integração com plataformas eletrônicas, maiores limites de detecção e menos sensibilidade paramétrica com relação a variações externas (e indesejadas) de temperatura, pressão, fluxo, etc.

## 2.2 BIOSSENSORES UTILIZANDO RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE

A ressonância de plasmons de superfície (*Surface Plasmon Resonance* – SPR) se baseia na oscilação da densidade de carga que pode existir na interface entre dois meios com diferentes características dielétricas (por exemplo, entre um metal e um dielétrico). Esse gradiente



está associado com uma onda eletromagnética, cujos vetores de campo possuem amplitude máxima na interface e decaem de forma evanescente (essa onda evanescente é um dos principais elementos utilizados para modelar o fenômeno) nos dois meios [42]. A onda evanescente pode interagir com o plasma gerado na superfície se o metal (tipicamente Ag ou Au) possuir valores apropriados de espessura (algumas dezenas de nanômetros) [43] e possibilitar a introdução de perdas energéticas. A ressonância ocorre quando essa energia é inteiramente utilizada para a excitação de plasmons. Para que isso ocorra, a constante de propagação da onda evanescente deve ser igualada à constante dos plasmons de superfície. Essa condição pode ser atingida através da variação do ângulo incidente [42, 43].

A difração anômala causada pela excitação de ondas de plasma de superfície em grades de difração foi inicialmente descrita no início do século 20 [11]. Anos depois, durante os anos 60, a excitação ótica de plasmons de superfície foi finalmente demonstrada utilizando um método baseado na reflexão total da luz incidente por Otto e Kretschmann [42]. As topologias de SPR mais comumente utilizadas comercialmente ainda são baseadas nesses experimentos [43]. Essas configurações utilizam grades ou prismas para canalizar a luz que incide no metal. Caso contrário, a onda incidente não teria momento suficiente para excitar a formação de plasmons de superfície [41].

Muitas das aplicações relacionadas a SPR estão associadas a estudos bioquímicos. Assim sendo, os sistemas comerciais são otimizados para esse tipo de utilização. Por exemplo, as variações de ângulo permitidas pelo sistema, o tipo de material utilizado para condução de fluidos, etc., são projetadas tendo em visto o emprego de soluções aquosas e/ou com baixo conteúdo de solutos/solventes orgânicos que causariam uma variação do índice de refração do meio maior do que inicialmente previsto. Um exemplo comum em projetos envolvendo SPR é o estudo de transições estruturais de proteínas. A compreensão da relação entre função e estrutura nesse tipo de macromolécula é fundamental para a compreensão de mecanismos celulares e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de drogas [44]. Adicionalmente, as mesmas técnicas podem ser utilizadas para o estudo de sistemas mais complexos, como o monitoramento de processos intracelulares [45]. Nesse trabalho, foi demonstrado que essa tecnologia pode ser incorporada em meios de cultura celular na forma de uma estrutura compacta, não-invasiva e sem interferir com os mecanismos de desenvolvimento celular. Nesse caso, uma solução baseada em fibras óticas (como descrito anteriormente) foi empregada.

Os primeiros instrumentos comerciais baseados em SPR foram introduzidos pela empresa Biacore na Suécia, em 1990. Durante os anos que seguiram, a tecnologia evoluiu de forma consistente até cerca de 2008, quando as melhorias em termos de performance se tornaram pequenas entre diferentes iterações de dispositivos. A tendência atual nas empresas mais bem estabelecidas é o acoplamento de SPR com outras técnicas de medidas *in situ*, como eletroquímica, microscopia eletrônica, etc. [43]. Em laboratórios de pesquisa, por outro lado, um dos principais focos é a funcionalização da superfície de Au (ou Ag) com compostos que possam melhorar consideravelmente a estabilidade, tempo de resposta e limites de detecção dos instrumentos. Exemplos de materiais empregados são grafeno e pontos quânticos. Modificações estruturais também têm sido muito investigadas, como é o caso da ressonância de plasmons de superfície localizados, que podem apresentar performances consideravelmente superiores [6, 8, 46, 47].

O estudo de monocamadas auto-organizadas (*Self Assembled Monolayers* - SAMs) utilizando SPR pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de fisissorção e quimissorção. Além disso, SAMs também podem ser úteis para a funcionalização da superfície do sensor, por apresentar uma superfície mais adequada para a detecção seletiva de eventos biológicos. Diferentes tipos de SAMs podem ser escolhidos para diferentes propósitos. Com o objetivo de calibrar o sistema e identificar erros associados ao instrumento, alcanotóis foram utilizados nesse trabalho. O estudo de moléculas pequenas, como ácido tioacético (TAA) e ácido mercaptoacético (MAA) podem ser úteis para avaliar a performance do dispositivo comercial. Uma outra vantagem é o emprego dos sinais obtidos como referência quando moléculas mais longas e complexas são estudadas.

O Laboratório de Filmes Finos e Superfícies (LFFS) possui experiência no estudo desses compostos. Em um trabalho recente do grupo, foram propostos mecanismos envolvendo a formação de SAMs de TAA e MAA em Au(111). Tendo em vista a precisão das técnicas baseadas em ressonância de plasmons, uma das motivações do presente estudo foi a avaliação da utilização de SPR para a observação *in situ* dos resultados reportados em [48]. Com o mesmo objetivo, moléculas de sulfeto de sódio (utilizadas para a formação de monocamadas de enxofre) e estruturas mais complexas (glutaciona reduzida - GSH, hexanotiol - HT e ditiotreitól - DTT), potencialmente aplicáveis em biossensores e eletrônica molecular, foram investigadas.

## MÉTODOS EXPERIMENTAIS

### 3.1 SUBSTRATO PARA MEDIDAS DE SPR

Para a fabricação e/ou utilização de chips no instrumento comercial, a limpeza do substrato é um dos aspectos mais críticos. Uma superfície contaminada com substâncias orgânicas ou inorgânicas resultaria em problemas de reprodutibilidade. Impurezas também podem induzir a formação de bolhas e demais artefatos de medida que podem ser facilmente evitados utilizando protocolos de limpeza e ativação do substrato. Nesse trabalho, substratos previamente funcionalizados com SAMs também foram utilizados para otimizar o processo de medição e/ou identificar erros de operação. Nesse caso, a limpeza das vidrarias utilizadas para preparação das soluções e imersão do substrato também deve ser considerada. Contaminantes não eliminados resultariam na formação de SAMs mistos e dificultariam a análise dos resultados obtidos.

Um segundo aspecto é o custo proibitivo (em certos mercados) dos sensores vendidos pelos fabricantes dos dispositivos. Dessa forma, em laboratórios de pesquisa nacionais, a fabricação *in house* de sensores e/ou reutilização dos mesmos são boas opções do ponto de vista financeiro.

A fabricação das estruturas pode ser facilmente conduzida em laboratórios equipados com instrumentos necessários para a síntese de filmes finos utilizando métodos físicos. O revestimento de substratos transparentes com Ti ou Cr (utilizados como *buffers* para melhorar a aderência entre Ag ou Au e dióxido de silício) e Au (prata também é comumente utilizado) com evaporação por feixe de elétrons é recomendada devido ao alto grau de texturização dos filmes finos obtidos. Alternativamente, outros métodos (como *sputtering* ou deposição química) podem ser utilizados mediante um pós-tratamento térmico.

Tendo em visto os resultados e orientações supramencionadas, os chips foram fabricados utilizando evaporação por feixe de elétrons. Imediatamente antes da evaporação, os vidros utilizados para a deposição dos filmes finos foram imersos sequencialmente em banhos ultrassônicos contendo acetona e isopropanol. Posteriormente, o excesso de solvente foi removido com Nitrogênio e os substratos foram imediatamente expostos a uma temperatura de 150°C por cerca de 10 minutos para desidratar o substrato. Essa etapa minimiza resíduos do solvente na superfície e diminuem a umidade na superfície do vidro, melhorando a aderência dos filmes a serem depositados.

A técnica de deposição de filmes finos utilizada se baseia na excitação de materiais utilizando elétrons altamente enérgicos (gerados por fontes termiônicas), que incidem na superfície do material desejado com uma certa frequência e amplitude de oscilação (reguladas por eletroímãs). O ambiente de ultra alto vácuo possibilita o desprendimento de átomos do alvo, que ‘evaporam’ na câmara. Para uma deposição mais pura e conformal, é importante utilizar materiais de alta pureza (tipicamente superiores a 99.9%) e girar o porta-amostras para evitar uma distribuição não-uniforme da espessura. Nesse trabalho, 2 nm de Ti foram depositados para aumentar a aderência entre o substrato (vidro) e a camada de Au (47 nm).

### 3.1.1 Limpeza

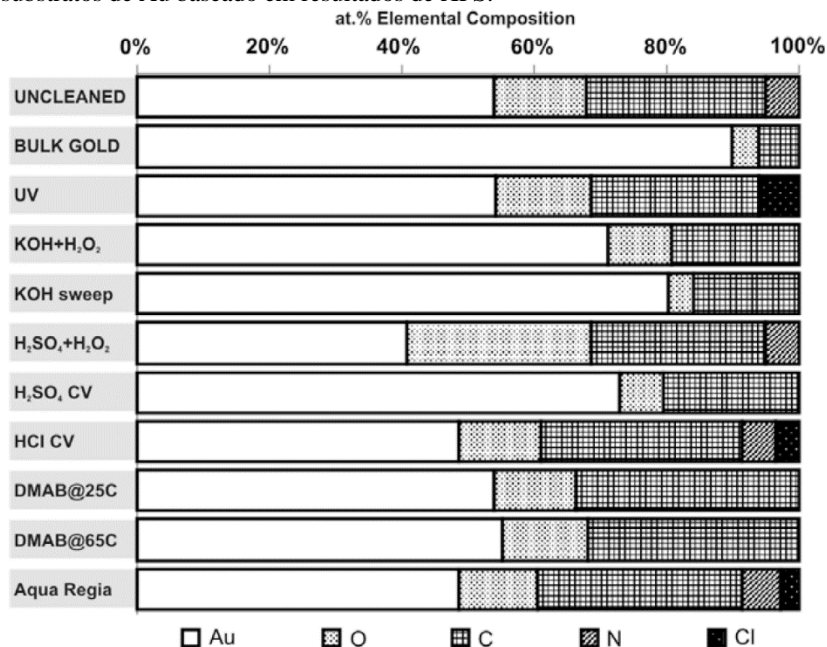
Os métodos mais bem estabelecidos para a limpeza de substratos de ouro utilizam luz ultravioleta, misturas de hidróxido de potássio e peróxido de hidrogênio, ozônio, água régia, piranha, agentes redutores (como borano dimetilamina) e/ou voltametria cíclica em ácido sulfúrico ou ácido clorídrico [49]. Utilizando medidas de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (*X-ray Photoelectron Spectroscopy – XPS*) para avaliar a rugosidade do filme fino após cada tratamento de limpeza e detectar a presença de impurezas, a eficácia de cada uma das soluções mencionadas foi avaliada, como esquematizado na

Figura 3 [49]. Nesse gráfico o percentual atômico de Au, O, C, N e Cl são mostrados para filmes finos (primeira linha) e volumosos (segunda linha) de Au, ambos em um estado ‘limpo’. Os métodos que permitem incrementos do conteúdo relativo de Au sem introduzir novos contaminantes são KOH + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ciclagem em KOH e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Essa análise, entretanto, deve servir apenas como um indicativo para o desenvolvimento de um protocolo de limpeza. No caso específico do presente estudo, os métodos envolvendo limpeza eletroquímica não são os mais apropriados pois conteúdos de Au também são consumidos de forma relativamente rápida, prejudicando a utilização em SPR. Por outro lado, também foi observado que a superfície do chip usado (altamente afetada por tióis) não pode ser completamente limpa com KOH+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou piranha, por exemplo. Para remover os resíduos orgânicos, uma rápida imersão em Clorofórmio foi empregada. A partir desse ponto, o processo continua utilizando soluções recentemente preparadas de 50 mM KOH em peróxido de hidrogênio e água destilada, na proporção volumétrica de 1:3, respectivamente.

Os substratos reutilizados utilizando o protocolo de limpeza previamente descrito apresentaram performance semelhante ao de chips

comerciais novos e/ou recentemente fabricados. Por outro lado, após algum tempo a relação sinal/ruído é fortemente prejudicada, já que parte da camada de Au é corroída a cada limpeza. Finalmente, os chips devem ser descartados já que a espessura se torna inferior ao mínimo necessário para excitar plasmons na superfície do metal.

Figura 3: Comparação de diferentes métodos utilizados para a limpeza de substratos de Au baseado em resultados de XPS.



Fonte: Referência [49].

As vidrarias utilizadas durante os experimentos (por exemplo, para preparar as soluções de tióis), devem ser cuidadosamente tratadas para evitar a contaminação com outras substâncias orgânicas, resultando na formação de SAMs mistas ou até mesmo impedindo um processo de fisissorção estável, como mencionado anteriormente. Para esse propósito, os recipientes foram imersos em uma solução concentrada de  $\text{KMnO}_4$  por um período superior a 12h. O excesso de permanganato de potássio foi removido com peróxido de hidrogênio, seguidos de limpeza utilizando água destilada. Quando disponível, tratamento com plasma também poderia ser utilizado.

### 3.1.2 Deposição De Monocamadas Auto-Organizadas De Tióis

De forma simplificada, o processo de formação de monocamadas auto-organizadas ocorre em duas etapas: fisissorção (etapa rápida, tipicamente na escala de segundos ou minutos) seguida de quimissorção (etapa lenta, podendo durar algumas horas ou dias). A primeira ocorre devido a atração entre as moléculas e a superfície do substrato. A segunda etapa ocorre com o desprendimento do átomo de hidrogênio da molécula e posterior reorganização estrutural para atingir uma configuração mais estável, com menor energia livre. Em superfícies planas, alcanotióis se distribuem de forma regular com um ângulo de aproximadamente 30°. Essas considerações, além de outras envolvendo os sítios preferenciais para a adsorção de SAMs em Au, representam aspectos exaustivamente estudados e bem estabelecidos na literatura [48]. Por outro lado, estudos relacionados ao monitoramento *in-situ* do fenômeno de fisissorção, incluindo a influência de diferentes fatores (por exemplo, potencial químico e/ou elétrico) que podem afetar características estruturais de forma estática ou dinâmica ainda requerem atenção.

O objetivo inicial desse estudo previa a utilização de diferentes solventes para contribuir com o entendimento da influência de certos aspectos químicos sobre a cinética de adsorção. Entretanto, como já mencionado, os sistemas comerciais existentes são otimizados para estudos bioquímicos. Assim sendo, ao incluir solventes orgânicos, as variações do índice de refração resultam em variações do ângulo de ressonância que não podem ser detectados pelo *hardware* empregado no instrumento (explicações mais detalhadas são fornecidas adiante).

Além da limpeza dos recipientes utilizados para preparação das soluções, a influência da luz também deve ser considerada, já que reações podem ser induzidas ou aceleradas como resultado da irradiação luminosa. Outros fatores como umidade, temperatura e pressão também devem ser cuidadosamente controlados. Para minimizar efeitos adversos, apenas soluções recentemente preparadas foram usadas para os experimentos, sempre na ausência de luz.

Durante os primeiros testes com o instrumento utilizado, foi observado que respostas correspondendo a concentrações inferiores a 1  $\mu\text{M}$  não podiam ser facilmente distinguidas do ruído. Por outro lado, molaridades entre 1  $\text{mM}$  e 10  $\text{mM}$  são elevadas o suficiente para a formação de multicamadas. Dessa forma, diferentes valores entre 1  $\mu\text{M}$  e 10  $\text{mM}$  foram consideradas. Frascos volumétricos de 25 ml foram usados. Inicialmente, as soluções mais concentradas foram formadas a partir do respectivo tiol. Através de diluições sucessivas, as demais alíquotas foram

obtidas utilizando água destilada como solvente e etanol como soluto adicional (1% a 20% em volume).

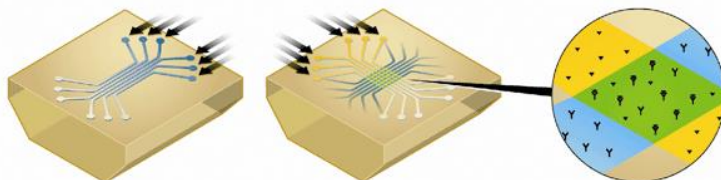
### 3.2 MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DE MOLÉCULAS

#### 3.2.1 Descrição Do Sistema

Alguns dos fabricantes mais conhecidos de instrumentos para medidas de SPR são *Biacore*, *Plexera*, *BiOptix*, *SensiQ*, *BioNavis*, *Horiba*, *Reichert*, *Bio-Rad* e *Biosensing Instruments*. Em termos de performance (teoricamente) possíveis, as empresas citadas apresentam valores (nominais) semelhantes, já que todos utilizam estruturas similares (baseadas em pequenas variações das configurações de Otto ou Kretschmann, já discutidas). As maiores diferenças entre as diferentes opções existentes estão relacionadas com a aplicação desejada e o grau de automação necessário e/ou desejável. Por exemplo, alguns dos dispositivos possibilitam a introdução de diferentes substratos e soluções dentro sistema. Desse ponto em diante, a ordem, duração e fluxo da inserção dos diferentes líquidos pode ser controlada por *Software*, incluindo etapas de limpeza e condicionamento dos canais. Esse é o caso de alguns dos produtos comercializados pela *Biacore*, *Bio-Rad* e *Plexera*, por exemplo, que possuem um maior apelo industrial, tornando possível a análise da interação entre diferentes moléculas (como exemplificado na

Figura 4) de forma robusta e reprodutível. Outras características desses instrumentos são controle de temperatura (desejável em experimentos envolvendo DNA), sistemas que possibilitem a utilização de quantidade mínimas de material, fluxo bidirecional, *softwares* para análise, etc. Devido a confiabilidade (resultado da automação dos mecanismos de manuseamento dos substratos e controle de fluxo) essa técnica tem sido vastamente utilizada para o desenvolvimento de drogas e pesquisa biológica, por exemplo.

Figura 4: Sistema de multicanais utilizado para analisar a interação entre diferentes moléculas.



Fonte: Material publicitário da empresa *Bio-Rad*.

Empresas menores, novas e/ou menos estabelecidas no mercado tentam explorar outras opções, como modularidade e diferentes aplicações. Por exemplo, a empresa *BioNavis* tentou inovar utilizando diferentes construções, como por exemplo um sistema rotatório no prisma que permite a detecção de ângulos de ressonância entre 40° e 78° (talvez sendo o único produto que possibilitaria o uso de solventes orgânicos), diferentes substratos (Ag, Al, Cu, Pt, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub>), além de permitir a análise multi-paramétrica (por exemplo, utilizando gás ao invés de líquido, ou incorporando células eletroquímicas). Outros aspectos operacionais incluem o pré-revestimento do prisma com elastômeros utilizados para acoplar o índice de refração do vidro e a possibilidade de seleção de um método de análise rápida ou lenta, que possibilitaria a obtenção do comportamento da intensidade do sinal em função do ângulo de refração. Esse tipo de flexibilidade possibilitaria o uso desse instrumento para pesquisas que necessitam implementar modificações de *hardware* em função de necessidades específicas, que podem variar no decorrer da pesquisa.

A empresa *Biosensing Instruments* utilizou um conceito similar ao da *BioNavis* no sentido de oferecer uma solução para laboratórios de pesquisa. O dispositivo utilizado nesse trabalho, BI-2000, possui tempos de resposta reduzidos quando comparado com outros instrumentos. A razão para essa vantagem está associada a execução de cálculos diretamente através de *hardware* dedicado (FPGAs são utilizados para o processamento do sinal). Devido a um compromisso entre tempo de resposta e custo, por outro lado, o único modo de monitoramento disponível nesse instrumento (segundo o fabricante) é a variação do ângulo de ressonância em função do tempo, uma desvantagem para pesquisas fundamentais. Com relação aos instrumentos com alto grau de automatização e/ou os instrumentos (relativamente) modulares da *BioNavis*, a vantagem do BI-2000 é a sua capacidade de lidar com sistemas que possuem um tempo de resposta rápido, característico de processos bioquímicos extremamente sensíveis e de difícil monitoramento.

### 3.2.2 Operação

As medidas executadas no presente trabalho foram feitas com o instrumento BI-2000 da *Biosensing Instruments*. Esse dispositivo, mostrado na Figura 5, possui uma interface de manuseio relativamente simples. O sistema possui dois canais de fluxo, posicionados de forma paralela e sem sobreposição. O sensor é posicionado diretamente sobre o prisma (localizado abaixo do porta-amostras, que pode ser visualizado na



mesma figura mencionada acima) e fixado através de pressão mecânica através de um sistema de molas acoplado ao módulo utilizado. Os canais são padronizados em um material polimérico e bio-compatível. A pressão sobre o sensor garante que o fluido irá passar apenas por essas duas passagens.

Dois modos de fluxo são possíveis, utilizando até duas soluções distintas na mesma medida. No modo *serial* os dois canais serão expostos. A vantagem é a possibilidade de duplicar a medida, dando indicações sobre a reprodutibilidade da mesma. O segundo modo, *single*, permite a passagem de dois líquidos distintos, resultando na obtenção de um sinal de referência (por exemplo). Para medidas mais precisas, esse modo deve ser escolhido preferencialmente. O fluxo deve ser elevado o suficiente para prevenir a mistura das duas soluções. O modo de operação e ordem de fluxo do líquido podem ser selecionados através das respectivas válvulas esquematizadas na Figura 5.

A solução contendo as moléculas cujas interações com o substrato serão analisadas podem ser inseridas em um *buffer*, que contém um sistema para eliminação de gás. Entretanto, foi observado que a performance do mesmo não é ideal. Para contornar o problema, a seringa utilizada para inserção do fluido deve ser preenchida com um volume ligeiramente superior ao que será utilizado para a medida. Após dispensar a solução na câmara, a seringa não deve ser removida. O excesso de líquido ainda presente na mesma irá reduzir a possibilidade da introdução de gás no sistema.

No BI-2000, a bi-direcionalidade do fluxo não é possível, e dois módulos são disponíveis: célula de fluxo (padrão) ou célula eletroquímica. Dessa forma, é possível aplicar potenciais elétricos e monitorar a resposta de SPR simultaneamente. Entretanto, a utilização de fluxo não é possível nesse caso. Modelos mais avançados da *Biosensing Instruments* contornam esse problema e também introduzem a possibilidade de módulos para o monitoramento de processos envolvendo gás.

Antes da inserção da solução contendo as moléculas a serem analisadas, o sistema deve ser calibrado (para cada medida) com relação ao ganho e *baseline*. O primeiro pode ser conduzido através da introdução de 1% Etanol em H<sub>2</sub>O, quando água destilada é utilizada como solvente. O valor da variação do ângulo de ressonância para a respectiva mudança do índice de refração do meio é de 60 mili-graus. Dessa forma, o ganho pode ser ajustado. Outras estratégias também poderiam ser consideradas. Após cada experimento, água destilada deve ser circulada por todos os

canais, incluindo o *buffer*, para eliminar resíduos que podem ter permanecido nos tubos.

O protocolo padrão de utilização obedece a seguinte ordem (para a célula de fluxo):

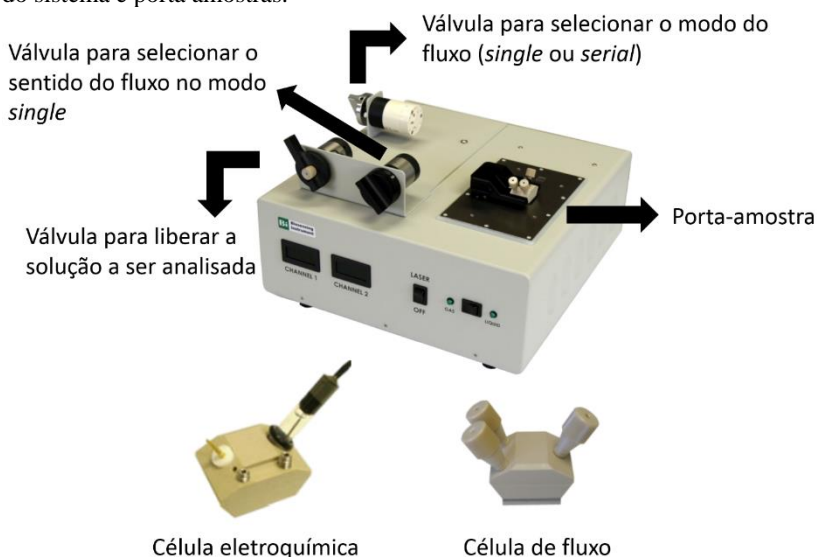
1. Limpeza do prisma utilizando isopropanol;
2. Deposição de óleo especialmente sintetizado para acoplar os índices de refração do prisma e do vidro do sensor;
3. Posicionamento do sensor;
4. Seleção da válvula para escolher o modo e/ou direção do fluxo;
5. Posicionamento, na bomba peristáltica, das seringas contendo as soluções que irão fluir em cada canal;
6. Escolha do fluxo (tipicamente 50 ul/min ou 100 ul/min), que não deve exceder 150 ul/min. Valores mais elevados resultam em vazamento do fluido;
7. Esperar alguns minutos para que a solução possa circular pelos canais e sensor;
8. Calibrar o ganho e *baseline*;
9. Inserir a solução a ser analisada no *buffer* (máximo de 250ul e obedecendo as instruções supramencionados para evitar a introdução de bolhas);
10. Abrir a válvula do *buffer* para permitir que a solução chegue até o sensor;
11. Fechar a válvula do *buffer* após o tempo necessário para que o volume escolhido seja evacuado da câmara para o canal principal;
12. Esperar até que a medida seja concluída e o sinal estabilizado;
13. Limpeza dos canais utilizando água destilada por pelo menos 5 minutos.

Com relação ao procedimento mencionado, alguns problemas comuns com o BI-2000 são:

- Vazamento de fluido mesmo utilizando fluxos baixos (por exemplo, 50 ul/min). Como resultado, em algumas situações é difícil estabilizar o sinal antes e/ou depois do experimento. Em outras situações, não é possível corrigir o sinal com relação a *baseline* porque o *drift* se torna não-linear. Parte do problema está provavelmente associado ao mecanismo de fixação do substrato (baseado em molas);
- O processo de inserção do líquido no *buffer* frequentemente resulta na formação de bolhas que forçam a repetição do experimento. Além disso, existem indicações de que o material utilizado nos tubos de condução de fluido não é apropriado para a utilização de

- experimentos com tióis, já que a descontaminação durante as etapas de limpeza se mostrou problemática em certos casos;
- Em sensores fabricados *in house* foi observado fortes discrepâncias (em poucos casos) entre os dois canais, quando experimentos em modo *serial* foram realizados para avaliar a reprodutibilidade da medida e/ou do processo de fabricação. Acredita-se que esse comportamento ocorra devido à falta de homogeneidade da espessura da camada de Au, já que o porta amostras não foi girado durante a evaporação de metal for feixe de elétrons (o sistema utilizado não possuía essa funcionalidade).

Figura 5: Instrumento de medidas de SPR da *Biosensing Instruments* (modelo BI-2000). Os principais elementos de interface com o usuário são esquematizados na figura: válvulas para controle de fluxo, visores para monitoramento do estado do sistema e porta amostras.



Fonte: *Biosensing Instruments*.

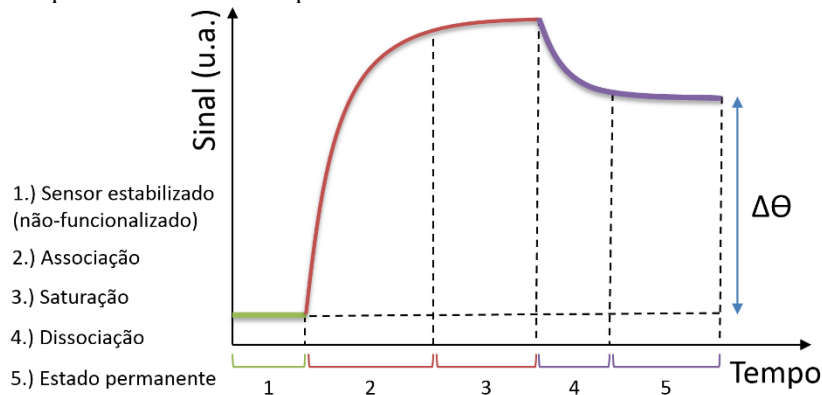
Em versões futuras do sistema BI-2000, um maior grau de automatização deveria ser implementado, principalmente devido ao gerenciamento do fluxo e manuseio do sensor dentro do sistema. Por exemplo, a investigação paramétrica do mecanismo de adsorção (em função da concentração, como será mostrado adiante) pode ser feita de forma automatizada utilizando um único *chip* ou de forma manual

(resultando em medidas menos precisas e consideravelmente mais demoradas), necessitando de um novo sensor para cada parâmetro testado.

### 3.2.3 Medidas

O sinal obtido através de um típico experimento de SPR é mostrado na Figura 6. O sistema, inicialmente condicionado em um estado de regime permanente, é submetido a uma variação de ambiente através da introdução de solutos no meio. Uma mudança do índice de refração é observada devido a variação da distribuição de carga na superfície do sensor (resultado da adsorção de moléculas) e por causa da variação do índice de refração do líquido sobre o substrato. A quantidade de solução com os analitos a serem analisados circulam no sistema por um tempo limitado. Após a interrupção do mesmo e reintrodução do solvente puro, as moléculas que estavam conectadas entre si por ligações químicas fracas e/ou devido a simples barreiras mecânicas (moléculas não especificamente adsorvidas na superfície do substrato) são arrastadas em um processo de dissociação. A mecânica de adsorção é concluída com a estabilização do sinal, que atinge um novo estado de regime permanente. De forma estática, o processo é caracterizado por uma variação  $\Delta\Theta$  do ângulo de ressonância. Em termos dinâmicos, existem inúmeros modelos para caracterizar os processos de associação e dissociação. Um dos modelos mais simples, e suficientes na maioria dos casos, é o modelo de Langmuir.

Figura 6: Diferentes etapas observadas em um experimento de SPR. Seguido da estabilização do sinal, as moléculas aderem ao substrato e se associam com os átomos do mesmo. Após um processo de saturação, as moléculas que não estão especificamente adsorvidas são dissociadas do sensor, até que o sistema atinge um estado de regime permanente. A variação de ângulo de ressonância e a resposta dinâmica permitem inferir parâmetros da interação entre os diferentes compostos envolvidos no experimento.



$$R_a = \frac{R_{max}[A]}{K_d + [A]} \left( 1 - \frac{1}{e^{(K_a[A] + K_d)t}} \right) \quad (3)$$

$$R_s = \frac{R_{max}[A]}{K_d + [A]} \quad (4)$$

$$R_d = R_0 e^{-K_d t} \quad (5)$$

Nas equações acima,  $R_{max}$  corresponde ao valor máximo do sinal (unidades arbitrárias),  $[A]$  é a concentração do analito,  $k_a$  é a constante de associação (reação direta),  $k_d$  é a constante de dissociação (reação inversa),  $t$  representa o tempo (em s) e  $R_0$  é o ganho da resposta exponencial (uma constante).

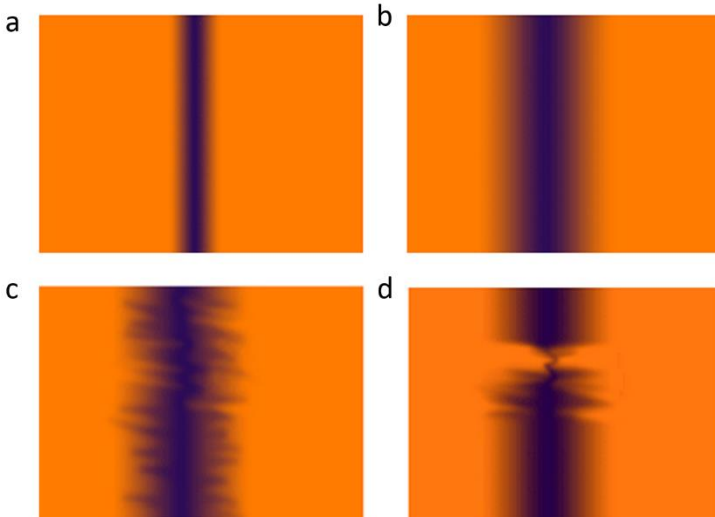
As principais simplificações do modelo são as suposições de que a reação não é limitada por transporte de massa (embora existam variações que consideram esse fator) e de que a concentração do analito permanece constante durante a fase de associação e se torna nula durante a fase de dissociação. O modelo é matematicamente descrito (baseado no manual dos instrumentos da empresa *Bio-Rad*) pelas Equações 3, 4 e 5, que

representam as etapas de associação, saturação e dissociação, respectivamente.

O BI-2000 também possui um visor do tipo CCD (*Charge-Coupled Device* - CCD) para captura de imagens. A câmera está focada nos dois canais e a forma do sinal obtido pode ser utilizada para inferir características sobre processos moleculares, mas através de técnicas de processamento de imagem. No caso do instrumento da *Biosensing Instruments*, o visor da câmera CCD pode ser utilizado para checar se o sensor está contaminado e/ou não possui características adequadas para a medida.

Na Figura 7 são mostrados os tipos de comportamento normalmente observados após a inserção do sensor e introdução do solvente. Um *chip* adequado para medidas resulta em uma imagem com uma banda bem delineada e reta (Figura 7.a). A perda de definição nas bordas indica que o nível de ruído será maior (Figura 7.b). A forma irregular indica que o sensor está contaminado e/ou existem bolhas (Figura 7.c e Figura 7.d).

Figura 7: Imagens tipicamente obtidas através do visor da câmera CCD de um instrumento de SPR. Esse resultado pode indicar que a) o sensor está limpo e possui as espessuras adequadas de cada material, b) o sensor pode ser utilizado, mas a contribuição do ruído será maior do que no caso anterior, c) o sensor está contaminado e d) existem contaminações e/ou bolhas na superfície do substrato.



Fonte: *Biosensing Instruments*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE

Certas condições óticas devem ser respeitadas para que plasmons sejam excitados na superfície de um metal. Adicionalmente, os materiais utilizados no sistema comercial devem ser considerados. Por exemplo, no presente trabalho um dispositivo da empresa *Biosensing Instruments* (mais detalhes serão discutidos adiante) é utilizado. Nesse caso, o vidro (ou outro substrato transparente para comprimentos de onda de 690 nm) deve possuir índice de refração semelhante ao prisma utilizado (no caso da configuração de Kretschmann). Para tal, *slides* de microscopia da *Fischer Scientific* com cerca de 0.2mm de espessura e índice de refração variando entre 1.51 e 1.54 foram utilizados (semelhantes a vidros BK7 da *Schott*). O efeito da introdução de um metal é demonstrado na Figura 8.

As simulações foram realizadas no software *WinSpall*, desenvolvido pelo *Max Planck Institute for Polymer Research*. O cálculo é baseado na resolução das equações de Fresnel em sistemas de multicamadas bidimensionais. Apesar da desconsideração de efeitos tridimensionais, os comportamentos obtidos são úteis para os primeiros estágios do desenvolvimento de chips e sensores baseados em SPR. Como visto na Figura 8, não é possível induzir plasmons de superfície em substratos BK7. Da mesma forma, a introdução de uma camada fina de Titânio também não é suficiente.

O efeito do índice de refração do vidro utilizado pode ser melhor visualizado na Figura 9. Utilizando espessuras apropriadas das camadas de Ti/Au (em torno de 2 nm/47 nm), uma variação paramétrica é introduzida. Como pode ser observado, valores do índice de refração inferiores a cerca de 1.4 não são capazes de permitir a excitação de plasmons de superfície. Valores mais elevados (tipicamente superiores a 1.5) são escolhidos dependendo da aplicação-alvo do instrumento. Processos bioquímicos, por exemplo, geralmente são estudados em meio aquoso. Dessa forma, uma variação de cerca de 7-8°, resultante da variação do índice de refração do meio é aceitável. A situação seria diferente caso solventes orgânicos fossem utilizados. As variações de ângulo e os valores nos quais a ressonância ocorre seriam diferentes. O limite angular de detecção deveria ser consideravelmente superior, resultando em uma construção mais complicada e preços mais elevados.

Por fim, o efeito da espessura da camada do metal onde os plasmons serão excitados é representado na Figura 9. Valores situados ao redor de 50 nm representam a condição ideal para obter uma amplitude máxima do sinal. Pode-se observar na Figura 10 que variações de cerca de 10%

em torno desse valor são aceitáveis. De fato, experimentos utilizando o instrumento BI-2000 da *Biosensing Instruments* revelaram que a espessura não é um parâmetro extremamente crítico, desde que a variação do índice de refração do meio seja grande o suficiente. A razão é que a relação sinal/ruído diminui com variações ao redor do valor ideal de espessura. No caso de medidas que requerem maior precisão, próxima ao limite de detecção do instrumento, o monitoramento da espessura deve ser considerado com mais rigor.

Figura 8: Percentual da luz refletida ( $R_p$ ) em meio aquoso para substratos de vidro BK7 a) sem metal e b) revestidos com 2nm de titânio.

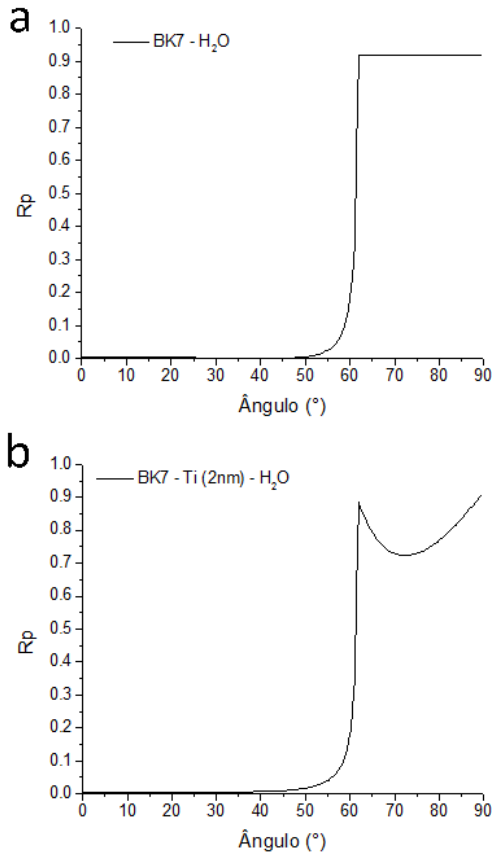




Figura 9: Efeito do índice de refração do vidro utilizado como substrato. Valores inferiores a 1.4 não são capazes de permitir a excitação de plasmons de superfície.

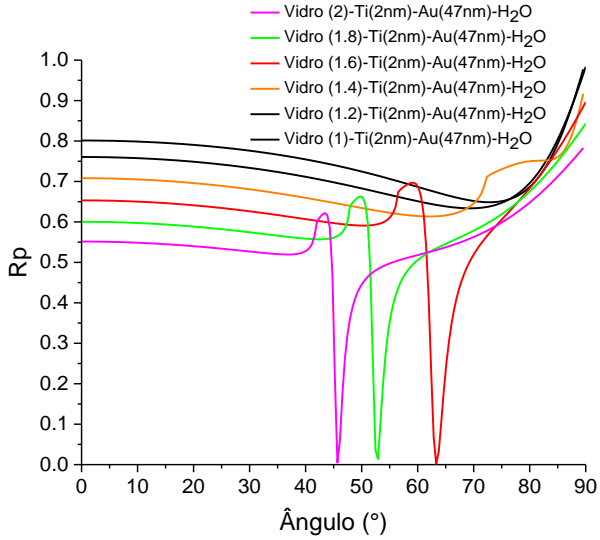
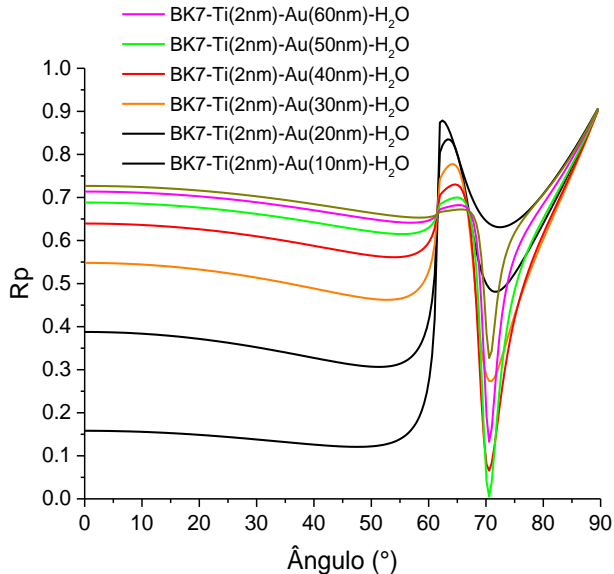


Figura 10: Efeito da espessura do filme fino de Au (ou Ag) utilizado como substrato. Valores situados ao redor de 47nm representam a espessura ótima para a utilização em SPR.



## 4.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA

Um exemplo de medida de calibração é mostrado na Figura 11. O meio, inicialmente preenchido apenas com água destilada, é alterado a partir da introdução de 1% Etanol. A variação do ângulo de ressonância para a respectiva mudança do índice de refração é de 60 mili-graus. Como pode ser observado, o sistema foi devidamente calibrado com relação ao ganho. O nível de ruído observado, relativamente elevado, é resultado do processo de fabricação do *chip*. A qualidade do sinal pode ser melhorada através de um melhor controle da espessura. Para diminuir erros associados a correção da *baseline*, ao menos duas inserções sucessivas de álcool são feitas. Embora ainda exista um certo *offset*, o resultado obtido é satisfatório. A partir desse ponto, o sistema está devidamente condicionado para a realização das medidas desejadas. Por outro lado, é recomendável esperar um tempo adicional para revalidar a estabilidade do sinal. Também é interessante evitar a realização de experimentos longos, pois o sistema está altamente sujeito a *drift* resultante de mudanças de temperatura, vazamento de fluido, pressão, ruído mecânico, etc. Na mesma figura, também pode ser percebido que a variação permanente (estática) do ângulo de ressonância é nulo. Isso indica que a resposta obtida é resultado apenas de alterações do índice de refração. Moléculas de etanol não foram permanente adsorvidas na superfície de Au.

Nesse trabalho, água destilada com a adição de 1% (em volume) de etanol foi utilizado como solvente. Dessa forma, a calibração foi efetuada utilizando H<sub>2</sub>O sem a presença do álcool. A diferença do ângulo de ressonância nesse caso deve ser de -60 mili-graus e, portanto, o comportamento obtido deve ser o inverso ao da Figura 11. Na Figura 12, um experimento completo é apresentado.

Figura 11: Exemplo de um procedimento de calibração em uma medida de SPR utilizando  $H_2O$  como solvente.

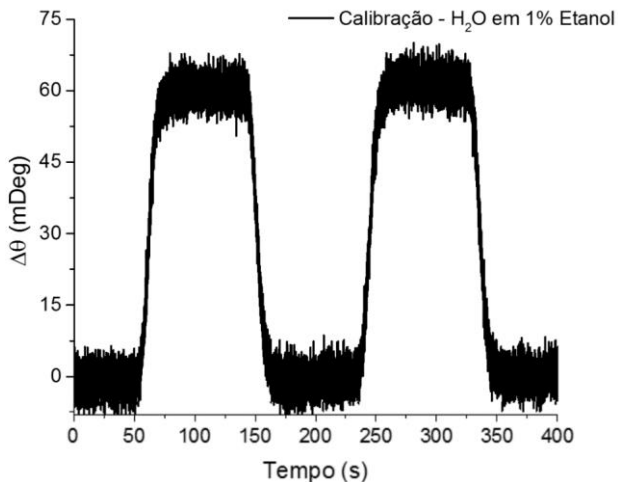
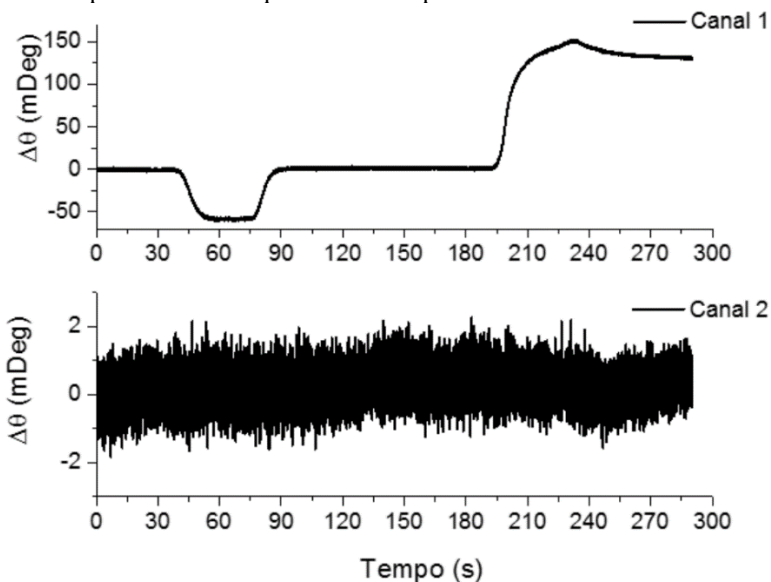


Figura 12: Experimento completo incluindo etapas de calibração e estabilização do sinal. O sinal foi obtido utilizando modo *single*. No canal 2 apenas o solvente foi inserido durante todo o procedimento. O sinal obtido pode ser utilizado como referência para aumentar a qualidade da resposta do Canal 1.



## 4.2 MONITORAMENTO DA ADSORÇÃO DE CAMADAS DE TIÓIS POR RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE

Os resultados que serão apresentados a seguir foram obtidos utilizando um fluxo de 50 ul/min (inserção da solução entre 0s e 40s) ou 100 ul/min (inserção da solução entre 0s e 100s) obedecendo o protocolo delineado na seção anterior. Moléculas de ácido tioacético (TAA), ácido mercaptoacético (MAA), glutatona reduzida (GSH), hexanotiol (HT), sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e ditioneitol (DTT) foram analisadas. Os experimentos foram executados ao longo de meses, durante os quais variações consideráveis de umidade e temperatura foram presenciadas. Esses fatores afetam a preparação das soluções e as medidas. Os resultados aqui exibidos não representam todo o espectro de comportamentos observados. Nas tentativas iniciais, formas de onda aceitáveis (ou esperadas) não foram obtidas. Os protocolos de operação, procedimentos de fabricação e limpeza dos *chips* foram melhorados ao longo do tempo para aumentar a reprodutibilidade e confiabilidade das medidas. Apesar disso, a repetição das medidas a seguir por diferentes usuários deve ser considerada cuidadosamente, tendo em visto os aspectos manuais do equipamento utilizado.

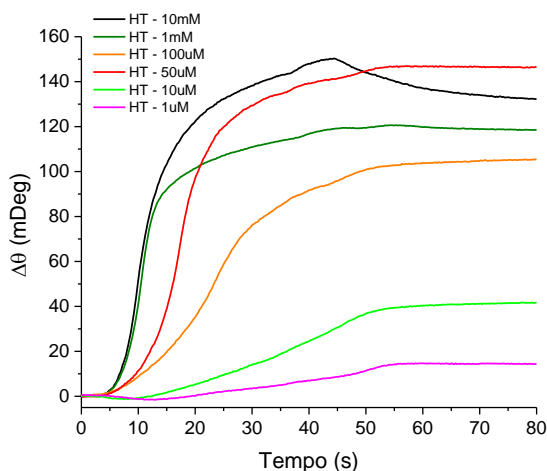
Os experimentos realizados indicam que um procedimento adequado para a operação do BI-2000 foi desenvolvido. Entretanto, melhorias ainda devem ser consideradas para aumentar a relevância estatística das medidas. Não existe uma quantidade de trabalhos suficientes na literatura utilizando moléculas similares as utilizadas aqui com resultados semelhantes entre si. Assim sendo, as condições experimentais devem ser otimizadas a um ponto onde não restem dúvidas com relação ao desempenho do dispositivo. Uma continuação desse trabalho deve focar em solucionar os problemas de operação existentes na BI-2000 (discutidos anteriormente).

Devido a construção do sistema, solventes orgânicos não puderam ser utilizados nesse trabalho, impossibilitando a comparação com estudos bem estabelecidos na área. Não é claro se as moléculas formam camadas auto-organizadas e/ou se as mesmas são estáveis quando adsorvidas na superfície de Au na presença de água. Dessa forma, é desejável a utilização de um sistema que possibilite o monitoramento de solventes orgânicos.

Tendo em vista as considerações acima, os resultados obtidos nesse trabalho são importantes de um ponto de vista qualitativo, permitindo a avaliação da utilização de ressonância de plasmons de superfície para a utilização em estudos fundamentais e/ou aplicações relacionados com o desenvolvimento de biossensores, eletrônica molecular, etc.

A Figura 13 apresenta o resultado obtido para concentrações de Hexanotiol, uma molécula relativamente longa, para concentrações de  $1\ \mu\text{M}$ ,  $10\ \mu\text{M}$ ,  $50\ \mu\text{M}$ ,  $100\ \mu\text{M}$ ,  $1\ \text{mM}$  e  $10\ \text{mM}$ . Com exceção da concentração de  $50\ \mu\text{M}$ , os demais sinais possuem respostas dinâmicas que evoluem de forma progressiva. É possível notar também que a fase de dissociação não existe até a utilização da concentração mais elevada. Isso pode indicar que concentrações ligeiramente inferiores a  $10\ \text{mM}$  são necessárias para a formação de monocamadas ou que a existência de multicamadas representa uma situação estável no caso dessas moléculas. O comportamento não esperado da concentração de  $50\ \mu\text{M}$ , que se repetiu ao longo de diferentes tentativas (indicando que não é devido a contaminações remanescentes nos canais), pode estar relacionado a solubilidade limitada de HT em água. Devido a existência de moléculas de álcool, que podem agir como carregadores das moléculas, essa concentração pode representar uma situação em que a ação da adsorção das moléculas na superfície é maximizada, justificando uma resposta mais rápida e uma variação de ângulo de ressonância mais acentuada. Por essa razão, o uso de HT foi descontinuado nas etapas seguintes desse estudo e moléculas que possuem alta solubilidade em ambiente aquoso foram escolhidas.

Figura 13: Ângulo de ressonância para Hexanotiol (HT) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de  $50\ \mu\text{L}/\text{min}$ .

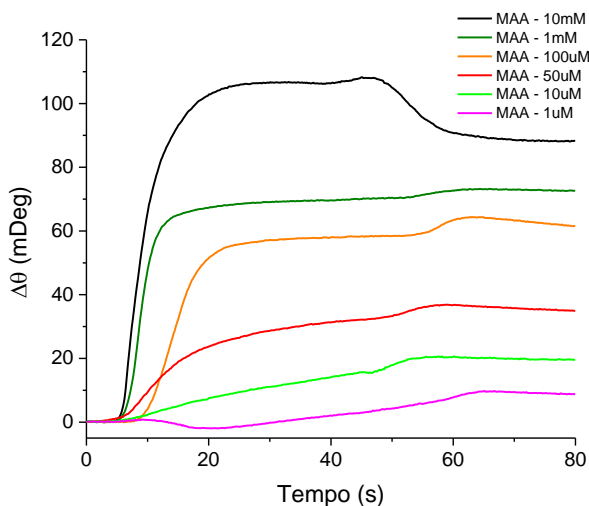


Os experimentos realizados com moléculas de ácido mercaptoacético (MAA) utilizando fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  (Figura 14) revelam dois efeitos inicialmente não esperados. O primeiro está relacionado a variação negativa do ângulo de ressonância para a concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Esse tipo de comportamento foi observado apenas para concentrações reduzidas (mesmo utilizando outras moléculas). Nos casos em que  $\Theta$  foge da janela de detecção do BI-2000 (cerca de  $70^\circ$  a  $76^\circ$ ) esse tipo de inflexão negativa acontece comumente, mas tipicamente de forma abrupta. Adicionalmente, o índice de refração do meio se torna invariavelmente superior após a inserção do tiol, fornecendo indicações de que o fato observado não é resultado de um erro de detecção. A hipótese de que o tiol pode estar corroendo a camada de Au também não parece razoável, já que isso também resultaria em formas de onda menos suaves, devido a formação de bolhas (por exemplo) durante o processo químico de corrosão.

O segundo efeito inesperado está associado a variação positiva de  $\Theta$  entre as fases de saturação e dissociação. Esse fato, entretanto, pode estar associado a variação de concentração do analito (não respeitando a simplificação no modelo de Langmuir) e/ou devido a atrasos associados ao transporte de massa. Uma última possibilidade, menos provável, está relacionada ao aprisionamento momentâneo das moléculas nas paredes dos canais, que atingem o substrato com um atraso temporal. A utilização de fluxo mais elevado, mostrado na Figura 15, garante que as hipóteses das equações 3 e 5 são respeitadas e, dessa forma, as diferentes etapas do processo ocorrem da forma esperada.

O estudo da adsorção das moléculas de ácido tioacético (TAA) e mercaptoacético (MAA) foi um dos focos de um estudo recente do Laboratório de Filmes Finos e Superfícies (LFFS) [48]. Os compostos possuem formulas químicas semelhantes:  $\text{C}_2\text{H}_4\text{OS}$  e  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$ , respectivamente. Entretanto, as cargas obtidas, calculadas a partir de medidas de eletrodessorção, indicam que no caso do ácido tioacético ocorre uma quebra da cadeia carbônica e, conseqüentemente, formação de uma monocamada de enxofre.

Figura 14: Ângulo de ressonância para Ácido mercaptoacético (MAA) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



A Figura 16 revela o comportamento obtido para diferentes concentrações de ácido tioacético utilizando fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  para concentrações variando de 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\text{mM}$ .

A confirmação, utilizando SPR, dos resultados discutidos na referência [48] não são possíveis a partir do comportamento dinâmico das moléculas sem o emprego de um sinal de referência. Para tal, foi utilizado  $\text{Na}_2\text{S}$ . Esse composto forma camadas organizadas de enxofre em ouro, isto é, na superfície do sensor.

A Figura 17 mostra a evolução da adsorção de enxofre molecular na superfície do *chip*. Ao utilizar fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , os mesmos efeitos associados aos sinais da Figura 16 são observados (para valores intermediários de concentração). Como esperado, o aumento do fluxo estabiliza o comportamento físico. Em ambos os casos, entretanto, o resultado é qualitativamente semelhante ao obtido na Figura 16, para moléculas de TAA. A diferença nos valores de  $\Delta\theta$  podem estar associadas a valores distintos do fator de empacotamento das camadas de enxofre formadas a partir de ácido tioacético e sulfeto de sódio. Assim sendo, é possível afirmar que a técnica de SPR é útil para a avaliação qualitativa de fenômenos de adsorção física, desde que acoplada com sinais de referência e/ou técnicas complementares.

Figura 15: Ângulo de ressonância para Ácido mercaptoacético (MAA) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

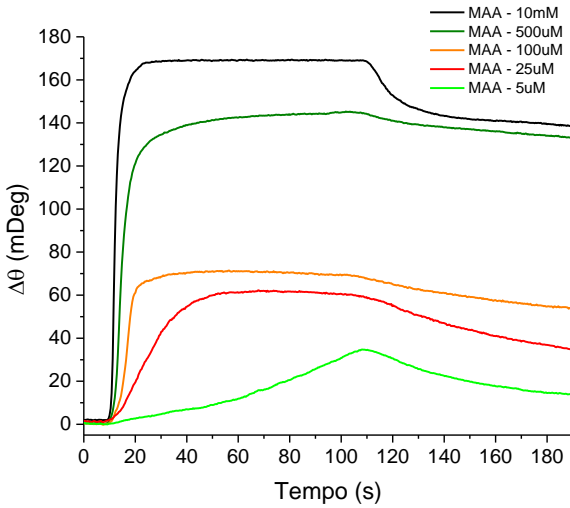
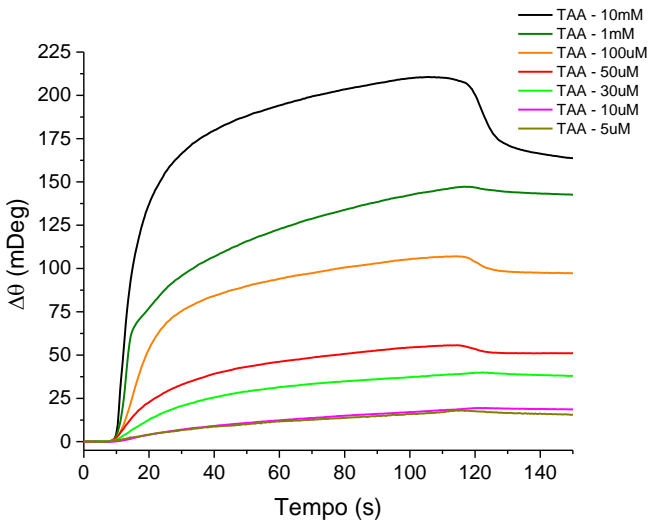


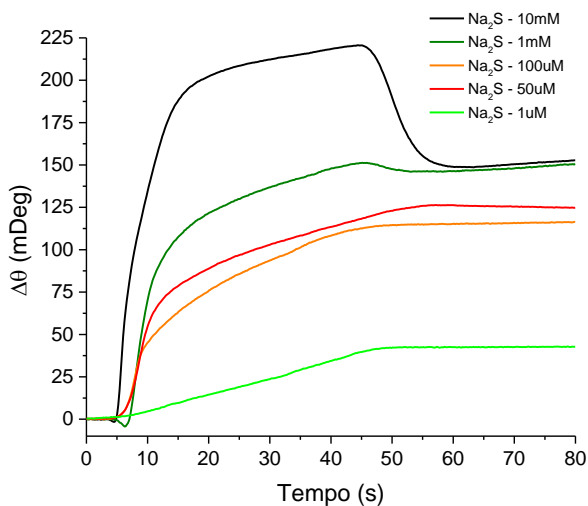
Figura 16: Ângulo de ressonância para Ácido tioacético (TAA) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .





Camadas de ditioneitol (DTT) são úteis em biologia molecular, pois esses compostos podem ser usados para a quebra da ligação entre proteínas, atuando no processo de desnaturação das mesmas. Essa molécula também pode ser utilizada para evitar a oxidação de tióis em solução, agindo como uma camada protetora em sistemas supramoleculares. A Figura 19 indica que o processo de formação de SAMs de DTT acontece sem efeitos indesejados, ao passo em que experimentos revelaram uma fácil obtenção dos resultados, quando comparado com as outras moléculas utilizadas nesse estudo.

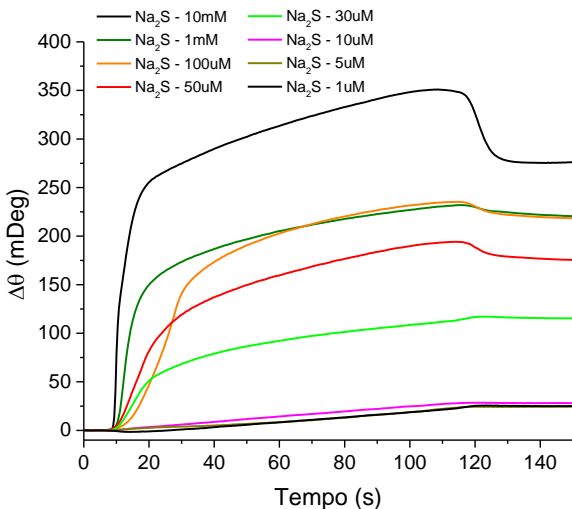
Figura 17: Ângulo de ressonância para Sulfeto de sódio em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



A Figura 20 mostra o comportamento da formação de camadas automontadas (SAMs) de glutatona reduzida (GSH). Essas moléculas estão associadas a diversos mecanismos biológicos, como gerenciamento energético intracelular, ciclos de produção de compostos biológicos em plantas, tratamento de câncer, etc. A motivação para a tentativa de detecção de GSH foram a dificuldade dos processos analíticos atuais para diagnosticar a presença e a possível aplicação em dispositivos de eletrônica molecular baseado em dois terminais, já que a glutatona possui duas terminações com enxofre. Como pode ser visto na mesma figura, o composto pode ser facilmente detectado. Entretanto, a quantificação da concentração se torna mais complicada, já que a variação estática de  $\Delta\theta$

é semelhante para diferentes concentrações (a razão será discutida adiante). As constantes da resposta dinâmica, por outro lado, podem ser utilizadas para esse efeito. Assim sendo, SPR é uma alternativa para as técnicas de identificação de GSH tradicionalmente utilizadas.

Figura 18: Ângulo de ressonância para Sulfeto de sódio em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



Foi observado que em alguns casos (em particular para baixas concentrações) não ocorre saturação, ao mesmo tempo em que o aumento do fluxo resulta em curvas mais planas na saturação. Adicionalmente, curvas com baixas concentrações também saturam (em diferentes patamares). Devido a essas observações, será mostrado adiante que existem dois mecanismos distintos contribuindo para o sinal de SPR e que o patamar de saturação não está associado diretamente a formação de monocamada, mas principalmente a concentração do meio aquoso.

As curvas obtidas através das medidas de SPR apresentam um regime de saturação caracterizado pelo equilíbrio entre os processos de adsorção e dessorção das moléculas. Dessa forma, o sinal obtido possui uma contribuição do processo de fisissorção, mas também uma contribuição de moléculas que não estão adsorvidas na superfície, mas que ainda assim afetam a distribuição de carga elétrica na superfície do sensor.

Figura 19: Ângulo de ressonância para Ditioneitol (DTT) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

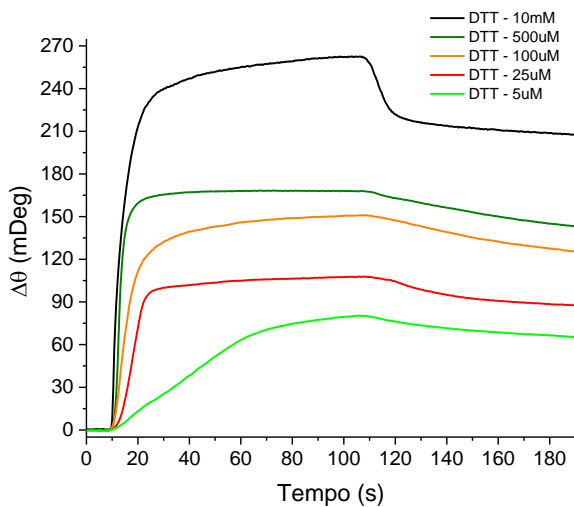
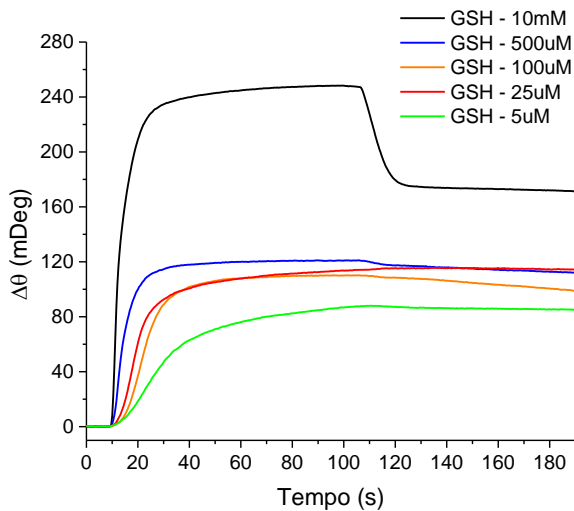


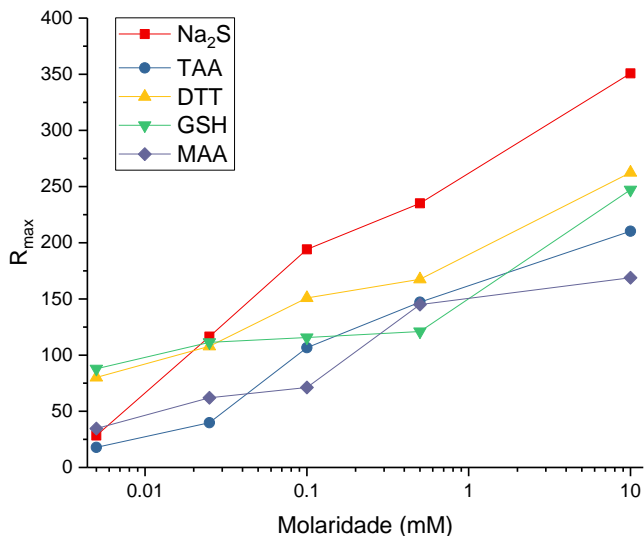
Figura 20: Ângulo de ressonância para Glutathiona reduzida (GSH) em função do tempo para diferentes concentrações, inserido com fluxo de 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



Na Figura 21, a relação entre o sinal máximo ( $R_{\max}$ ) e a concentração das moléculas é apresentada. Como esperado, existe uma relação crescente entre  $R_{\max}$  e a molaridade da solução utilizada. Sabe-se que a formação de monocamadas com elevada cobertura de superfície ocorre para concentrações inferiores a 0.1mM. Dessa forma, a ausência de um patamar de saturação indica que  $R_{\max}$  não representa a formação de monocamadas.

Para os sistemas estudados, a fisissorção de moléculas na superfície ocorre na escala de segundos. Dessa forma, o tempo necessário para atingir 90% da resposta máxima ( $t_{0.9}$ ) foi estudado, também em função da molaridade das soluções. Nesse caso, a resposta é diferente para as diferentes substâncias, como pode ser visto na Figura 22.

Figura 21: Sinal de saturação do SPR ( $R_{\max}$ ) em função das concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}$ , TAA, DTT, GSH e MAA utilizadas. O comportamento observado indica que o sinal máximo obtido não representa a formação de monocamadas, já que não existe uma saturação do sinal máximo.



O resultado obtido para SAMs de dissulfeto de sódio indica que o processo de fisissorção ocorre mais rapidamente para concentrações mais elevadas. Esse comportamento é esperado, já que a camada possui apenas um átomo de enxofre. As demais substâncias, com cadeias de carbono simples ou ramificadas, possuem um comportamento mais complexo.

Como estudado em [48], as moléculas de MAA e TAA possuem estrutura semelhante, a diferença sendo a existência de uma ligação dupla em uma delas. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que SAMs de TAA possuem distribuição semelhante a monocamadas de enxofre, já que a cadeia carbônica pode ser rompida, dependendo das condições do meio. Como pode ser observado, o comportamento obtido para  $\text{Na}_2\text{S}$  e TAA é semelhante, com a exceção de uma inversão para concentrações em torno de 0.1 mM, que podem representar um estado onde a quebra da cadeia carbônica é favorecida. Devido a sua maior estabilidade, o tempo de resposta obtido para SAMs formadas por moléculas de MAA decresce rapidamente e permanece estável, indicando que não houve modificação estrutural. As moléculas de DTT e GSH possuem um terceiro tipo de comportamento, que pode estar relacionado a formação de multicamadas, razão pela qual existe uma elevação do tempo de resposta para concentrações em torno de 0.1 mM. A partir desse valor, a formação de multicamadas acontece mais rapidamente para concentrações mais elevadas, como esperado.

Através da avaliação das curvas apresentadas, as características do meio aquoso e da superfície podem ser avaliadas concomitantemente. A técnica se mostrou precisa o suficiente para permitir o fácil discernimento entre os dois casos que contribuem para o sinal obtido. Essa observação é importante para o desenvolvimento de biossensores baseados em SPR porque as concentrações do meio podem ser monitoradas através do monitoramento de  $R_{\text{max}}$  ao passo em que o processo de otimização da interface do sensor pode ser feito com base nos resultados obtidos baseados em  $t_{0.9}$ .

A Figura 23 relaciona as características do meio aquoso e da interface. Nessa figura, a variação abrupta visualizada para as moléculas de DTT e GSH indica que, embora o sinal seja mais intenso, o tempo para que o processo seja concluído aumentou, caracterizando um processo de formação de multicamadas. De forma mais suave, o mesmo comportamento é observado para moléculas de TAA. A fim de validar que a quebra da cadeia de carbono é o mecanismo presente em SAMs de ácido tioacético, a técnica de eletrodessorção será utilizada.

Figura 22: Tempo necessário para atingir 90% ( $t_{0,9}$ ) do sinal máximo ( $R_{max}$ ) em função das concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}$ , TAA, DTT, GSH e MAA utilizadas.

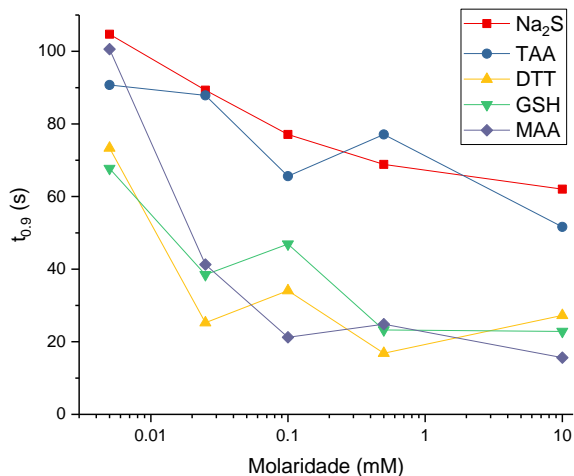
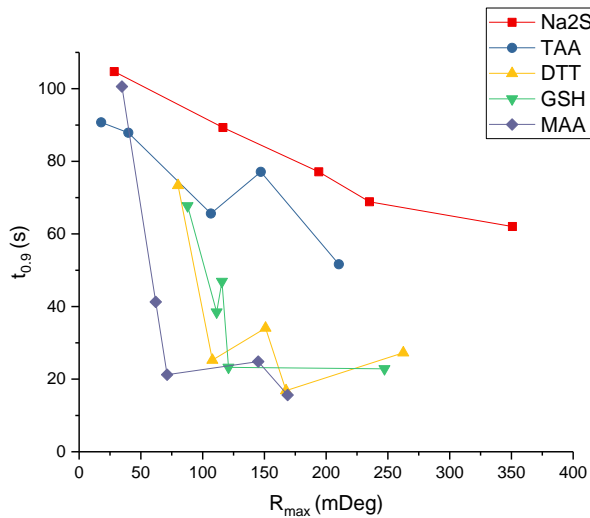


Figura 23: Relação entre o tempo necessário para atingir 90% ( $t_{0,9}$ ) do sinal máximo ( $R_{max}$ ) em função das concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}$ , TAA, DTT, GSH e MAA utilizadas.



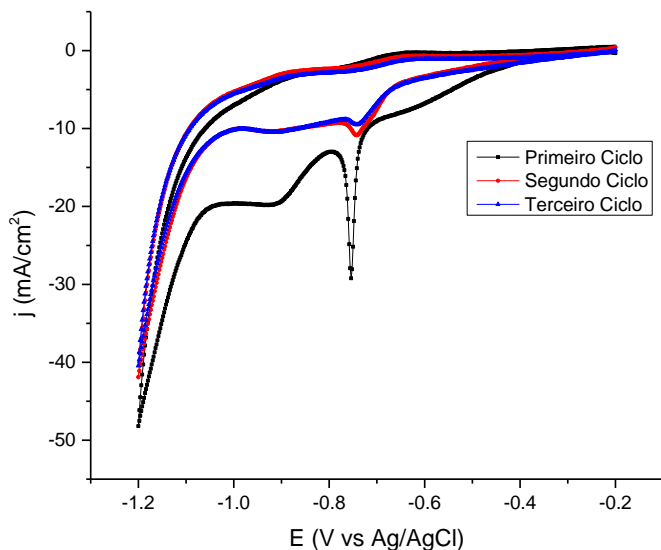
## 4.2 MEDIDAS DE ELETRODESSORÇÃO POR VOLTAMETRIA CÍCLICA

A configuração mais simples de uma célula eletroquímica é aquela onde dois eletrodos são separados por um meio líquido (eletrólito). Os eletrodos são denominados eletrodo de trabalho (onde ocorrem as reações de interesse) e contra-eletrodo (eletrodo que fecha o circuito elétrico para a passagem da corrente elétrica na célula eletroquímica). A corrente elétrica medida é devido as reações de oxirredução que ocorrem nos eletrodos como resultado da presença de íons no eletrólito (corrente faradaica) e a processos de carga e descarga dos eletrodos (correntes não faradaicas, ou capacitivas).

Para medir a queda de potencial no eletrodo de trabalho, um eletrodo adicional é introduzido na célula eletroquímica, eletrodo denominado de referência. A técnica de voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas que podem ser utilizadas para a caracterização de superfícies com moléculas adsorvidas. A Figura 24 representa o comportamento observado ao variar o potencial ciclicamente entre -0.2 V e -1.2 V utilizando um catodo de Au recoberto com uma monocamada de enxofre, através da imersão do substrato em uma solução aquosa de Na<sub>2</sub>S (10 mM) por 5 minutos. No primeiro ciclo, pode-se observar uma região onde nenhuma reação ocorre seguido de um pico de corrente, proporcional à carga necessária para remover a SAM. O potencial em que essa reação ocorre está associado com a estabilidade do filme fino. Potenciais mais negativos indicam sistemas mais estáveis. No caso de alcanotióis, o comportamento geral é o aumento da estabilidade à medida que a cadeia carbônica se torna mais longa. As condições utilizadas para a preparação da monocamada irão influenciar a qualidade da mesma. Alguns fatores incluem o tipo de solvente, concentração da substância ativa, tempo de reação, material e morfologia do substrato.

A resposta associada a camadas uniformemente orientadas e distribuídas possuem pouca dispersão. No caso de funcionalização em regiões mais rugosas, o sistema pode exigir mais energia para que a desorção das camadas ocorra, resultando em um pico mais suavemente distribuído. Como pode ser observado na mesma figura, a eletrodessorção de toda a camada não ocorre no primeiro ciclo. Picos de desorção podem ser observados nos ciclos posteriores. Isso pode ocorrer devido a uma ciclagem rápida e/ou re-adsorção das camadas.

Figura 24: Exemplo de eletrodessorção utilizando voltametria cíclica para avaliar monocamadas auto-organizadas de  $\text{Na}_2\text{S}$ . A posição e o fator de qualidade do pico são indicativos da homogeneidade e estabilidade do filme fino. Os ciclos seguintes indicam que existem resquícios persistentes no eletrodo, resultados da re-adsorção espontânea e/ou reorganização durante a aplicação de potenciais mais positivos.



Nesse trabalho, o monitoramento da corrente durante o processo de eletrodessorção foi utilizado para confirmar os dados obtidos nas medidas de SPR. Normalmente, a preparação de SAMs de alcanotióis são feitas na completa ausência de umidade e por um período prolongado de tempo. Esses fatores, assim como a exposição luminosa, podem degradar o tiol, ao passo em que uma imersão no solvente mais prolongada favorece a formação de camadas mais organizadas. Ao contrário do processo de fisissorção, que ocorre em uma escala de segundos, o processo de quimissorção (reorganização e minimização da energia livre) pode levar horas ou dias. Devido às limitações do instrumento de medida utilizado nesse trabalho, essas duas condições não puderam ser implementadas. Assim sendo, a utilização da eletrodessorção não foi utilizada nesse trabalho para fins quantitativos, mas como uma forma de confirmar as hipóteses formuladas através das medidas de SPR.



Todas as medidas foram realizadas no mesmo recipiente utilizado para as medidas de SPR. Imediatamente após a conclusão das mesmas, o excesso de etanol foi removido da câmara e substituído por uma solução de 1 M NaOH. Nitrogênio de alta pureza (5N) foi inserido no sistema por 5 minutos e mantido durante a voltametria cíclica. Como pode ser observado no apêndice, algumas das voltametrias não possuem um pico bem definido. Outras possuem mais de um pico. O terceiro exemplo não esperado são aqueles com SAMs de MAA, onde o pico de eletrodessorção ocorreu ao redor de  $-0.4$  V, ao passo em que um potencial muito mais negativo era esperado.

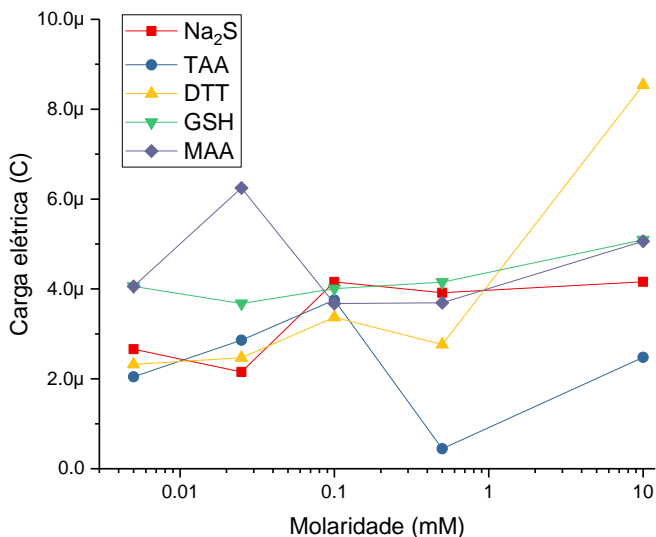
As medidas associadas as monocamadas de TAA, DTT e  $\text{Na}_2\text{S}$  apresentam uma resposta bem-comportada ao mecanismo de adsorção até uma determinada concentração máxima de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  (ver anexo). Esse comportamento é visível para três ciclos sucessivos de voltametria cíclica, onde os processos de eletrodessorção e re-adsorção estão presentes. O comportamento observado com as moléculas de MAA são menos lineares. Adicionalmente, uma inversão de sinal da área medida indica degradação do substrato de Au. Essa é a primeira evidência de que as moléculas estão sendo modificadas devido a interação com irradiação luminosa e/ou moléculas de água. As moléculas de glutatona reduzida, por outro lado, parecem mostrar um mecanismo de adsorção independente de concentração, para a janela escolhida.

Através da relação entre a carga de eletrodessorção (calculada utilizando a taxa de varredura de 100 mV/s e normalizada através da subtração entre o primeiro e terceiro ciclo), a resposta máxima das medidas de SPR ( $R_{\text{max}}$ ) e o tempo necessário para atingir 90% de  $R_{\text{max}}$ , as hipóteses da seção anterior podem ser confirmadas. Ao mesmo tempo, as medidas de SPR são para justificar a relação entre a carga de eletrodessorção e a molaridades das soluções utilizadas.

A análise da relação entre a carga necessária para remover as moléculas adsorvidas na superfície e a concentração das soluções (Figura 25) confirma que, para as condições experimentais utilizadas nesse estudo, o recobrimento máximo da superfície ocorre para concentrações em torno de 0.1 mM. A partir desse valor, a carga de eletrodessorção permanece aproximadamente constante. Entretanto, os experimentos com moléculas de DTT e TAA revelam variações abruptas para concentrações mais elevadas. A redução da carga observada para TAA indica que o recobrimento é menos estável (como estudado na referência [48]), indicando que concentrações mais elevadas de TAA podem inibir a quebra da cadeia carbônica. Para cadeias com mais de três átomos de carbono, o comportamento é invertido: moléculas mais longas são mais

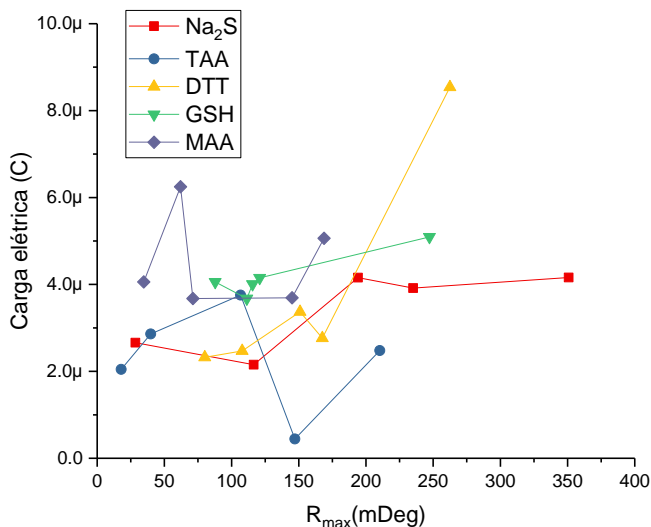
estáveis. Dessa forma, a relação obtida nesse estudo está de acordo com a literatura. Ambos os compostos (TAA e DTT) possuem moléculas mais longas para concentrações superiores a 0.1 mM, mas a carga de eletrodessorção varia em direções opostas porque a molécula de TAA possui menos do que 3 carbonos em sua estrutura.

Figura 25: Relação entre a carga de eletrodessorção e as concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}$ , MAA, GSH, DTT e TAA.



A relação entre a carga elétrica,  $R_{\text{max}}$  (Figura 26) e  $t_{0.9}$  (Figura 27) é confirma as conclusões anteriores. Entretanto, a existência de uma histerese nas curvas pode sugerir a existência de sítios distintos para a adsorção de moléculas na superfície. O método descrito na referência [50] foi utilizado para avaliar esse fenômeno.

Figura 26: Relação entre a carga de eletrodessorção e o valor do sinal máximo de SPR ( $R_{\max}$ ) para diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}$ , MAA, GSH, DTT e TAA.



Utilizando o método mencionado anteriormente e as equações 3 e 5, as análises que podem ser visualizadas na Figura 28 foram obtidas. O software *Evilfit*, desenvolvido por Peter Schuck, foi utilizado. O comportamento mostra que, embora exista uma possível limitação relacionada ao transporte de massa, possivelmente devido ao meio aquoso utilizado, o regime de adsorção ocorre preferencialmente no mesmo tipo de sítio, caracterizado pelo máximo local observado na Figura 28.

A partir da análise estática e dinâmica da resposta obtida por SPR, características relacionadas a superfície e ao meio aquoso onde o sensor está imerso podem ser identificadas. A correlação desses dados com medidas eletroquímicas forneceu informações adicionais com relação a aspectos estruturais e químicos das moléculas utilizadas. Como aplicação, o método foi utilizado para avaliar as observações relatadas anteriormente na referência [48].

Figura 27: Relação entre a carga de eletrodessorção e o tempo necessário para atingir 90% do valor do sinal máximo de SPR ( $t_{0,9}$ ) para diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{S}$ , MAA, GSH, DTT e TAA.

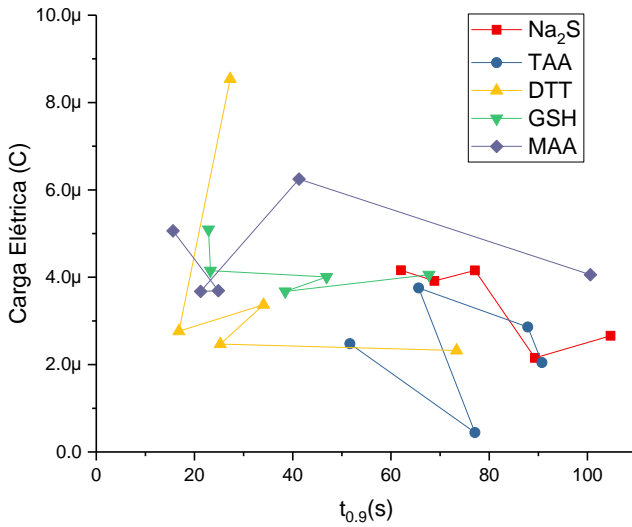
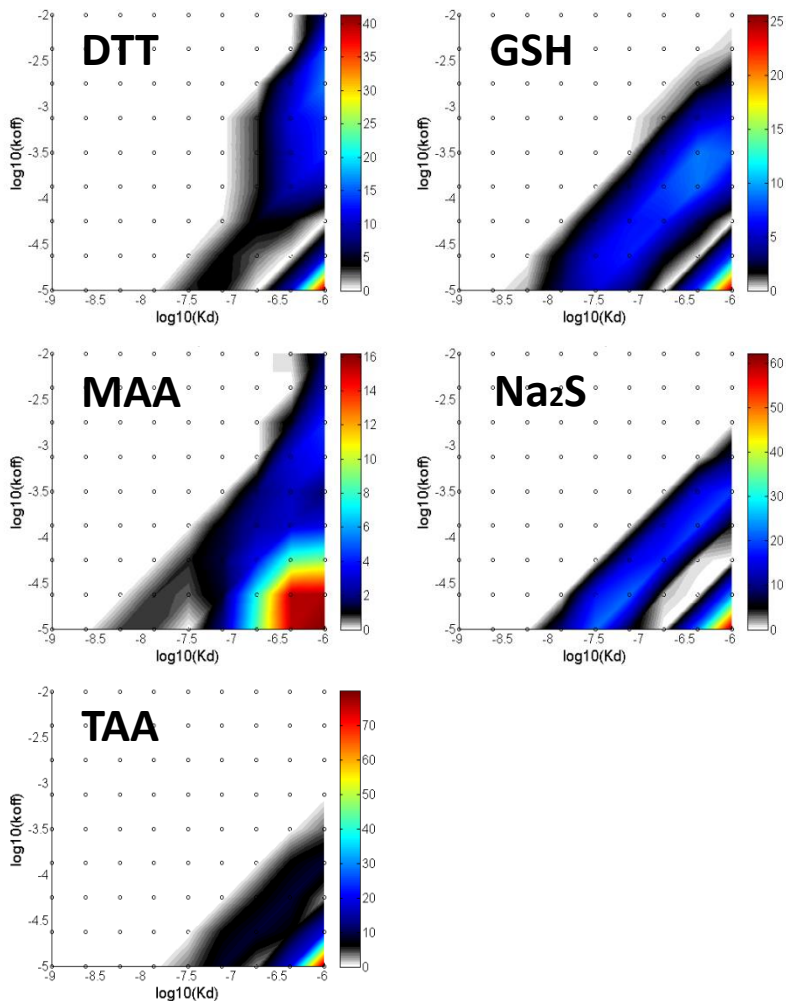


Figura 28: Relação entre as constantes de associação e dissociação utilizando o método descrito na referência [50] para identificar a existência de sítios heterogêneos para adsorção de moléculas na superfície.





## CONCLUSÕES

A técnica de ressonância de plasmons de superfícies, tradicionalmente usadas para pesquisas bioquímicas, é hoje uma das tecnologias mais precisas e adequadas para a incorporação em biossensores miniaturizados e/ou investigação de mecanismos físicos, como a identificação dos parâmetros associados ao mecanismo de adsorção de moléculas em superfície. Um desses processos, a formação de monocamadas auto-organizadas (SAMs), foi empregado como sistema a ser estudado para avaliar a utilidade de SPR e viabilidade do uso desse fenômeno para os propósitos acima descritos. Ao mesmo tempo, o estudo de SAMs é útil por si só, mas também para o desenvolvimento de sensores biológicos e/ou dispositivos de eletrônica molecular (incluindo transistores de efeito de campo sensíveis a íons, por exemplo). Em particular, uma das principais motivações desse trabalho foi estudar métodos alternativos de deposição de filmes finos (como SAMs) que possibilitem a elaboração de superfícies para a detecção seletiva e robusta de glicose. Para tal, foi necessário identificar parâmetros da resposta dinâmica do processo da formação de monocamadas auto-organizadas. Dessa forma, a utilização de SPR para o monitoramento *in-situ* de moléculas foi novamente justificada.

Após a elaboração de um protocolo de operação adequado, obtido experimentalmente através de sucessivas iterações de tentativa e erro, foi demonstrado que monocamadas de enxofre atômico ou SAMs de compostos muito maiores (como glutatona reduzida) podem ser igualmente identificados, com diferenças claras entre concentrações distintas. Adicionalmente, foi possível validar (ao menos de forma qualitativa) a ocorrência do processo de sulfidização de moléculas de ácido tioacético, comprovando através de medidas *in-situ* as hipóteses reportadas em [48].

Uma contribuição adicional desse trabalho foi a participação na instalação do dispositivo BI-2000 (fabricado pela *Biosensing Instruments*), que foi utilizado para a obtenção das medidas discutidas nas seções anteriores. Instrumentos mais automatizados e modulares podem ser úteis para a realização de medidas mais confiáveis e reprodutíveis. As deficiências existentes na plataforma utilizada, entretanto, puderam ser contornadas através de um bom protocolo de operação. Esse estudo, tendo sido a primeira experiência do LFFS com ressonância de plasmons de superfície, pôde contribuir com a identificação de aspectos físicos e novas ideias que devem ser consideradas em projetos futuros empregando SPR.

Ao longo da descrição do presente estudo, diversas sugestões foram mencionadas. Algumas delas são resumidas a seguir.

#### **4.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

De um ponto de vista operacional, parte da dificuldade de explorar resultados quantitativos utilizando o BI-2000 está relacionada a impossibilidade (segundo o fabricante) de obter respostas estáticas do sistema (sinal em função do ângulo de ressonância), como aqueles presentes na Figura 9. Outros fatores estão relacionados a inflexibilidade do sistema (impossibilidade de alterar as características do prisma, por exemplo) e gerenciamento de fluxo. Utilizando a construção desse instrumento como base, um projeto de longo termo poderia visar a fabricação de um sistema incorporando mudanças que evitem as dificuldades operacionais observadas no instrumento comercial utilizado.

Em termos de aplicações, a motivação principal desse trabalho foi o desenvolvimento de camadas para o monitoramento de glicose e/ou desenvolvimento de ISFETs. Dessa forma, agora que o protocolo para a utilização do instrumento instalado está bem estabelecido, algumas sugestões são:

- Estudo da estabilidade de glicose oxidase (enzima) em função do tempo;
- Introdução de moléculas para estabilizar a atividade da enzima;
- Estudo de SAMs funcionalizados com DNA para a detecção não-enzimática de glicose;
- Revestimento do sensor com camadas que possibilitem maximizar a mediação de carga na superfície e, conseqüentemente, aumentar a amplitude da ressonância. O mesmo filme fino poderia ser utilizado em ISFETs.

Com relação a fabricação de sensores e dispositivos do tipo *lab on a chip*, a tecnologia de SPR pode ser modificada (como discutido anteriormente) para permitir a miniaturização e até mesmo aumento da precisão da técnica, como é o caso da ressonância de plasmons de superfície localizada (LSPR), que poderia ser construído para a incorporação em sistemas microfluídicos.



## REFERÊNCIAS

1. Coey, J.M.D., Magnetic materials. *Journal of Alloys and Compounds*, 2001. 326(1-2): p. 2-6.
2. Riordan, M., The lost history of the transistor. *Ieee Spectrum*, 2004. 41(5): p. 44-+.
3. Wang, X.R., et al., Room-temperature all-semiconducting sub-10-nm graphene nanoribbon field-effect transistors. *Physical Review Letters*, 2008. 100(20).
4. Ulman, A., Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chemical Reviews*, 1996. 96(4): p. 1533-1554.
5. Wink, T., et al., Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst*, 1997. 122(4): p. R43-R50.
6. Newton, L., et al., Self assembled monolayers (SAMs) on metallic surfaces (gold and graphene) for electronic applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 2013. 1(3): p. 376-393.
7. Puigmarti-Luis, J., et al., Bottom-up assembly of a surface-anchored supramolecular rotor enabled using a mixed self-assembled monolayer and pre-complexed components. *Chemical Communications*, 2014. 50(1): p. 82-84.
8. Heath, J.R., Molecular Electronics. *Annual Review of Materials Research*, 2009. 39: p. 1-23.
9. Grieshaber, D., et al., Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors*, 2008. 8(3): p. 1400-1458.
10. Benner, S., What is life? Investigating the nature of life in the age of synthetic biology. *Nature*, 2008. 452(7188): p. 692-694.
11. Qiu, F.M., et al., Artificial bacterial flagella functionalized with temperature-sensitive liposomes for controlled release. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014. 196: p. 676-681.
12. Krushinitskaya, O., et al., The assessment of potentially interfering metabolites and dietary components in blood using an osmotic glucose sensor based on the concanavalin A-dextran affinity assay. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011. 28(1): p. 195-203.
13. Krushinitskaya, O., et al., Characterization of nanoporous membranes for implementation in an osmotic glucose sensor based on the concanavalin A-dextran affinity assay. *Journal of Membrane Science*, 2011. 376(1-2): p. 153-161.
14. Wild, S., et al., Global prevalence of diabetes - Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 2004. 27(5): p. 1047-1053.

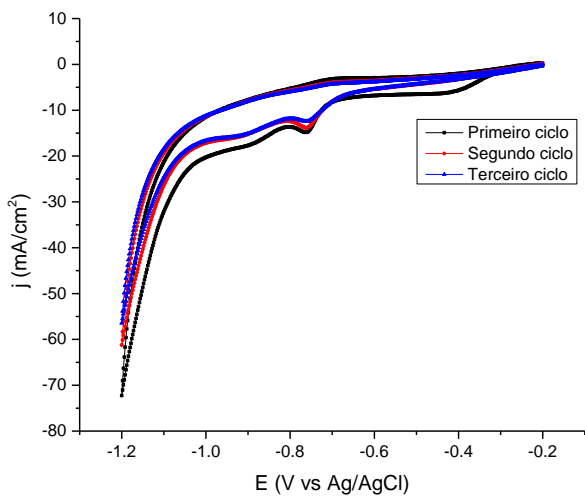
15. Solnica, B., J.W. Naskalski, and J. Sieradzki, Analytical performance of glucometers used for routine glucose self-monitoring of diabetic patients. *Clinica Chimica Acta*, 2003. 331(1-2): p. 29-35.
16. Newman, J.D. and A.P.F. Turner, Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005. 20(12): p. 2435-2453.
17. Wang, J., Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis*, 2001. 13(12): p. 983-988.
18. Lehmann, R., et al., Clinical and technical evaluation of a new self-monitoring blood glucose meter: assessment of analytical and user error. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2001. 53(2): p. 121-128.
19. do Amaral, C.E.F. and B. Wolf, Current development in non-invasive glucose monitoring. *Medical Engineering & Physics*, 2008. 30(5): p. 541-549.
20. Pickup, J.C., et al., Fluorescence-based glucose sensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005. 20(12): p. 2555-2565.
21. Malchoff, C.D., et al., A novel noninvasive blood glucose monitor. *Diabetes Care*, 2002. 25(12): p. 2268-2275.
22. Malik, B.H. and G.L. Cote, Characterizing dual wavelength polarimetry through the eye for monitoring glucose. *Biomedical Optics Express*, 2010. 1(5): p. 1247-1258.
23. Marvin, J.S. and H.W. Hellinga, Engineering biosensors by introducing fluorescent allosteric signal transducers: Construction of a novel glucose sensor. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. 120(1): p. 7-11.
24. Oliver, N.S., et al., Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabetic Medicine*, 2009. 26(3): p. 197-210.
25. von Lilienfeld-Toal, H., et al., A novel approach to non-invasive glucose measurement by mid-infrared spectroscopy: The combination of quantum cascade lasers (QCL) and photoacoustic detection. *Vibrational Spectroscopy*, 2005. 38(1-2): p. 209-215.
26. Hierlemann, A., Integrated chemical microsensor systems in CMOS-technology. *Transducers '05, Digest of Technical Papers, Vols 1 and 2*, 2005: p. 1134-1137.
27. Wilkins, E. and P. Atanasov, Glucose monitoring: State of the art and future possibilities. *Medical Engineering & Physics*, 1996. 18(4): p. 273-288.

28. D'Orazio, P., Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 2003. 334(1-2): p. 41-69.
29. Wilson, M.S., Electrochemical immunosensors for the simultaneous detection of two tumor markers. *Analytical Chemistry*, 2005. 77(5): p. 1496-1502.
30. Chaubey, A. and B.D. Malhotra, Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 2002. 17(6-7): p. 441-456.
31. Mirsky, V.M., M. Riepl, and O.S. Wolfbeis, Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen-antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes. *Biosensors & Bioelectronics*, 1997. 12(9-10): p. 977-989.
32. Thevenot, D.R., et al., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 2001. 34(5): p. 635-659.
33. Poghossian, A., et al., Penicillin detection by means of field-effect based sensors: EnFET, capacitive EIS sensor or LAPS? *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2001. 78(1-3): p. 237-242.
34. Patolsky, F., G.F. Zheng, and C.M. Lieber, Nanowire-based biosensors. *Analytical Chemistry*, 2006. 78(13): p. 4260-4269.
35. Schoning, M.J. and A. Poghossian, Bio FEDs (Field-Effect devices): State-of-the-art and new directions. *Electroanalysis*, 2006. 18(19-20): p. 1893-1900.
36. Bergveld, P., Thirty years of ISFETOLOGY - What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2003. 88(1): p. 1-20.
37. Bergveld, P., The Significance of Feedback-Control for Chemical Sensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1992. 8(1): p. 47-52.
38. Bergveld, P., The future of biosensors. *Sensors and Actuators a-Physical*, 1996. 56(1-2): p. 65-73.
39. Georgiou, P. and C. Toumazou, A Silicon Pancreatic Beta Cell for Diabetes. *Ieee Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 2007. 1(1): p. 39-49.
40. Sipova, H., et al., Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Label-Free Detection of Microribonucleic Acid at Subfemtomole Level. *Analytical Chemistry*, 2010. 82(24): p. 10110-10115.
41. Alleyne, C.J., et al., Enhanced SPR sensitivity using periodic metallic structures. *Optics Express*, 2007. 15(13): p. 8163-8169.

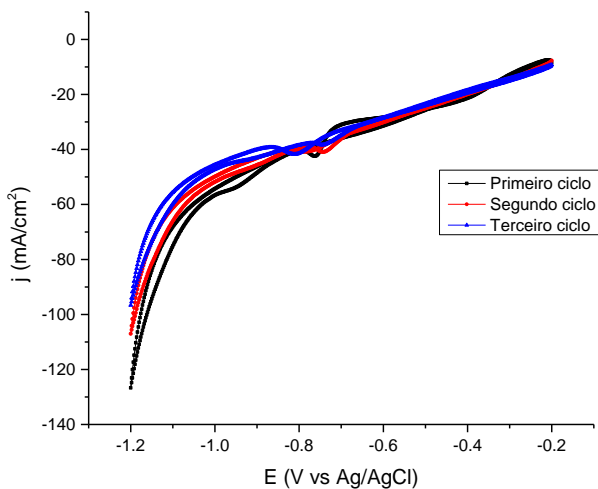
42. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1999. 54(1-2): p. 3-15.
43. Wang, X.P., et al., Review: Advances and Applications of Surface Plasmon Resonance Biosensing Instrumentation. *Instrumentation Science & Technology*, 2013. 41(6): p. 574-607.
44. Goda, T. and Y. Miyahara, Interpretation of Protein Adsorption through Its Intrinsic Electric Charges: A Comparative Study Using a Field-Effect Transistor, Surface Plasmon Resonance, and Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir*, 2012. 28(41): p. 14730-14738.
45. Shevchenko, Y., et al., Surface plasmon resonance fiber sensor for real-time and label-free monitoring of cellular behavior. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014. 56: p. 359-367.
46. Singh, M., et al., Noncovalently Functionalized Monolayer Graphene for Sensitivity Enhancement of Surface Plasmon Resonance Immunosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 2015. 137(8): p. 2800-2803.
47. Foudeh, A.M., et al., Sub-femtomole detection of 16s rRNA from *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance imaging. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014. 52: p. 129-135.
48. Fischer, J.A., et al., Sulfidization of Au(111) from Thioacetic Acid: An Experimental and Theoretical Study. *Langmuir*, 2012. 28(43): p. 15278-15285.
49. Fischer, L.M., et al., Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. *Microelectronic Engineering*, 2009. 86(4-6): p. 1282-1285.
50. Inna I. Gorshkova, Juraj Svitel, Faezeh Razjouyan, and Peter Schuck, Bayesian Analysis of Heterogeneity in the Distribution of Binding Properties of Immobilized Surface Sites, *Langmuir* 2008, 24, 11577-11586.

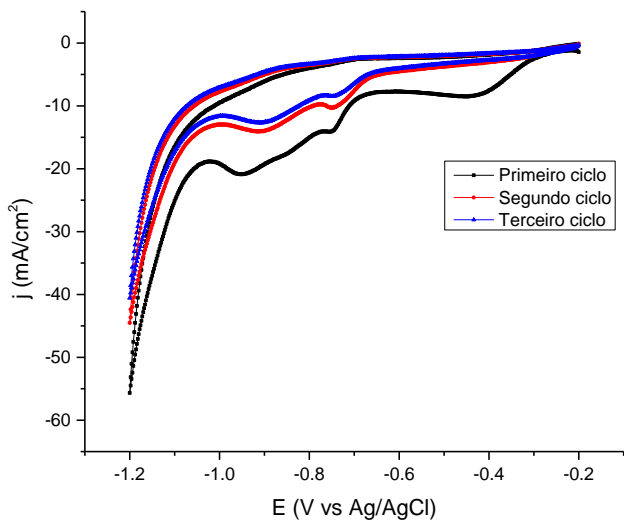
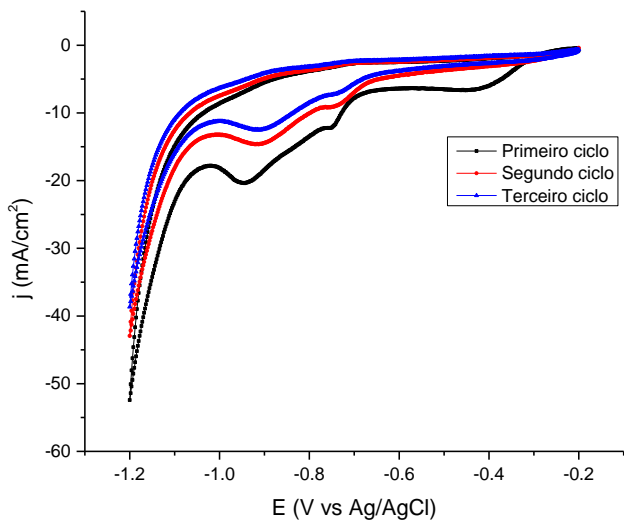
## APÊNDICE A – Medidas de eletrodeposição

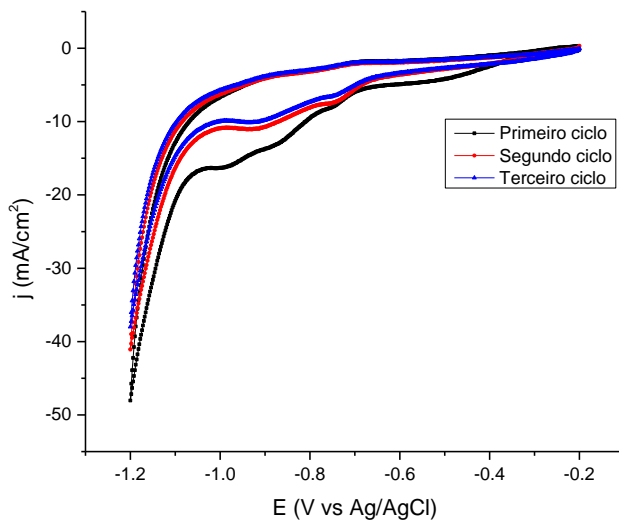
TAA – 10 mM



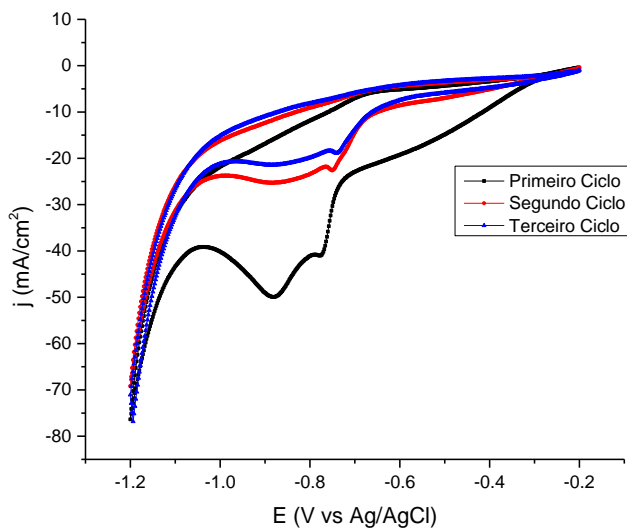
TAA – 500  $\mu$ M



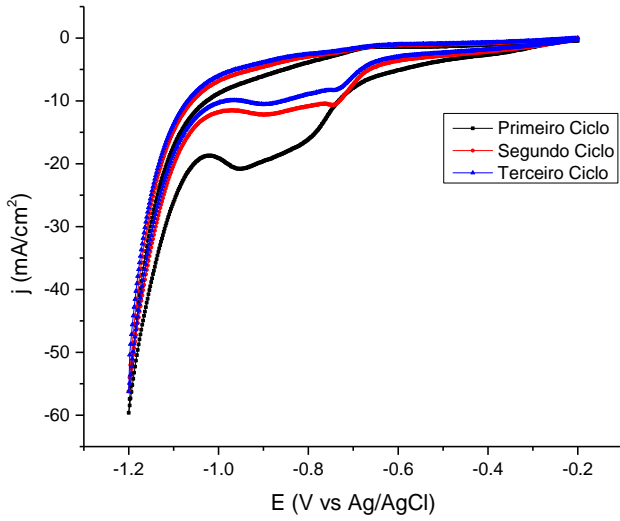
TAA – 100  $\mu\text{M}$ TAA – 25  $\mu\text{M}$ 

TAA – 5  $\mu$ M

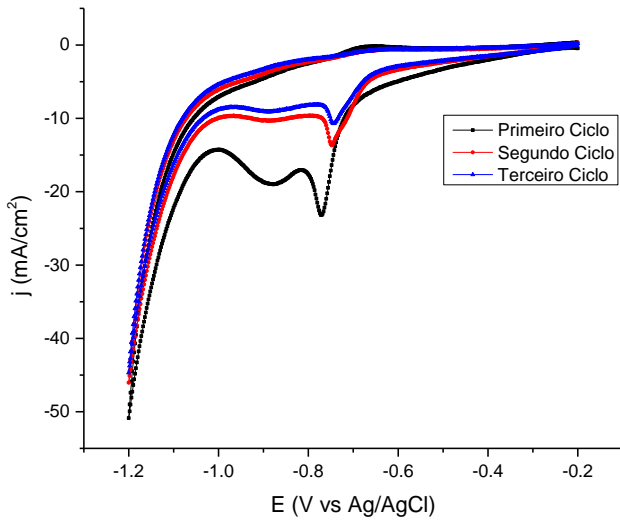
DTT – 10 mM



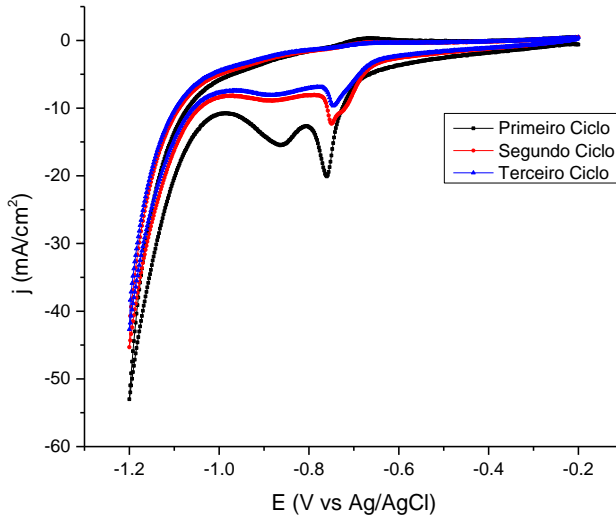
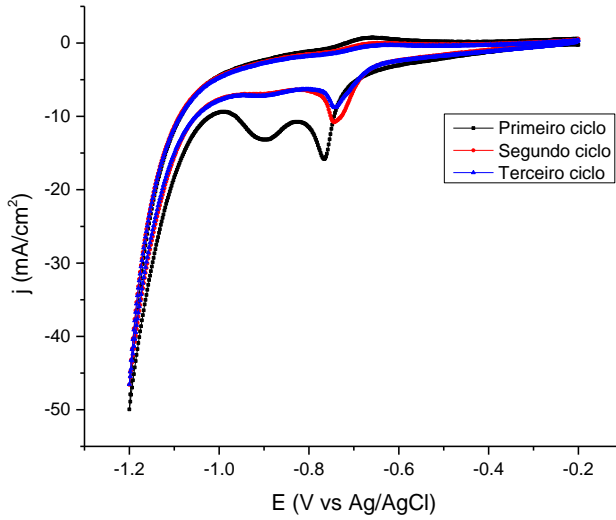
DTT – 500 uM



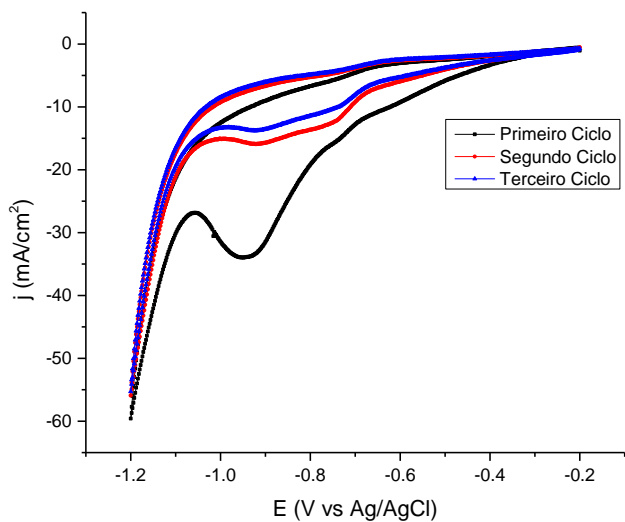
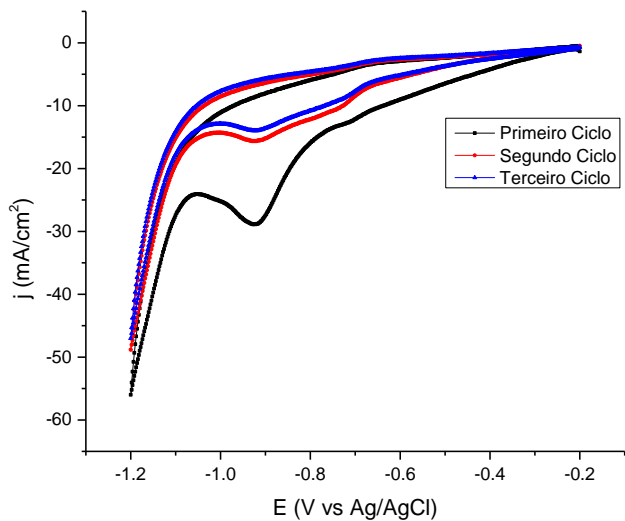
DTT – 100 uM

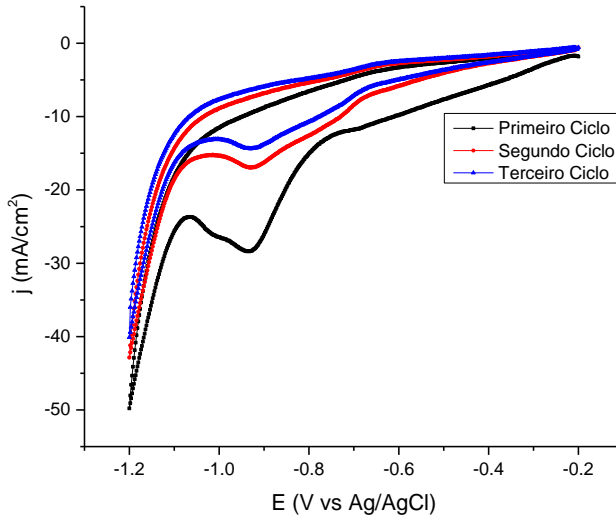
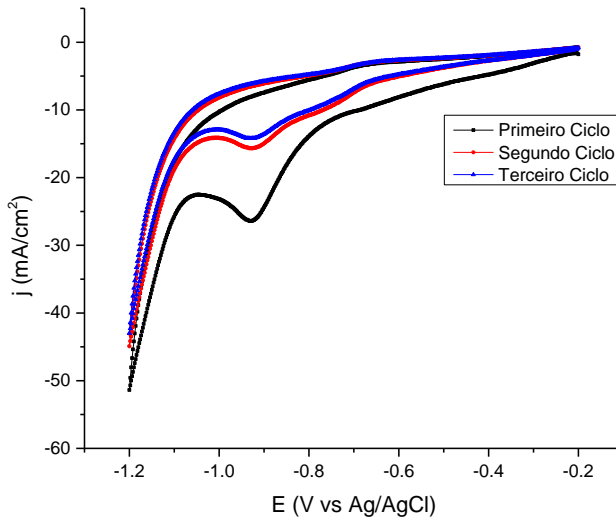


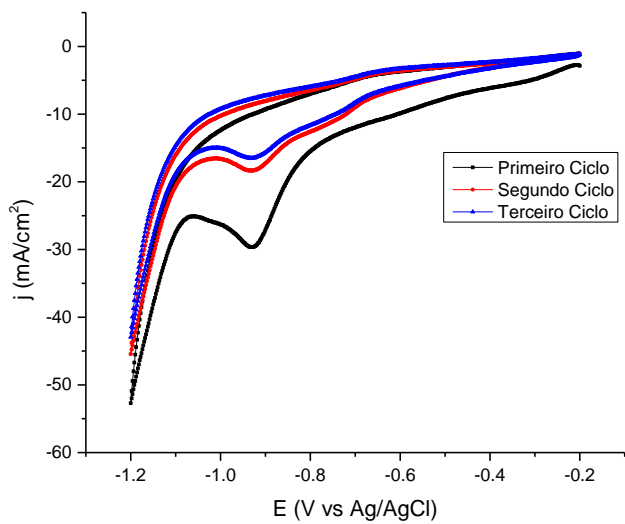


DTT – 25  $\mu\text{M}$ DTT – 5  $\mu\text{M}$ 

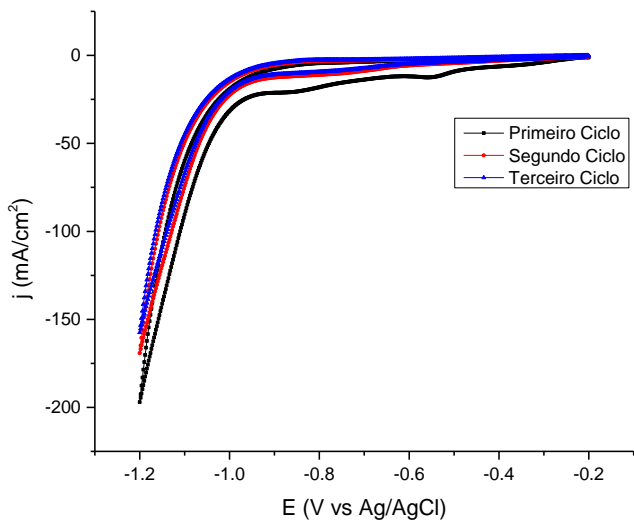
## GSH - 10 mM

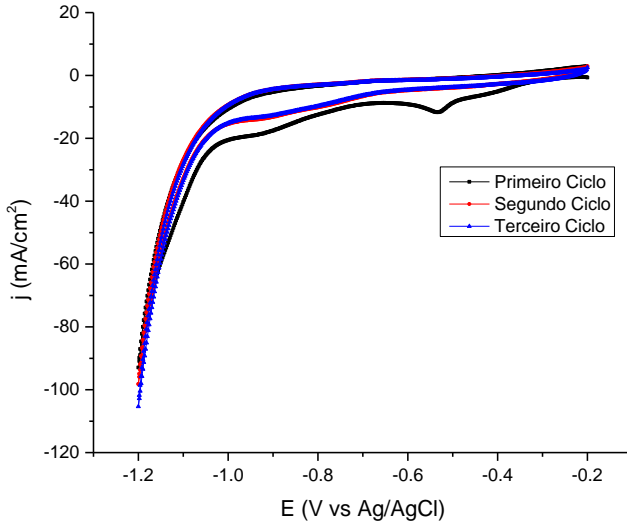
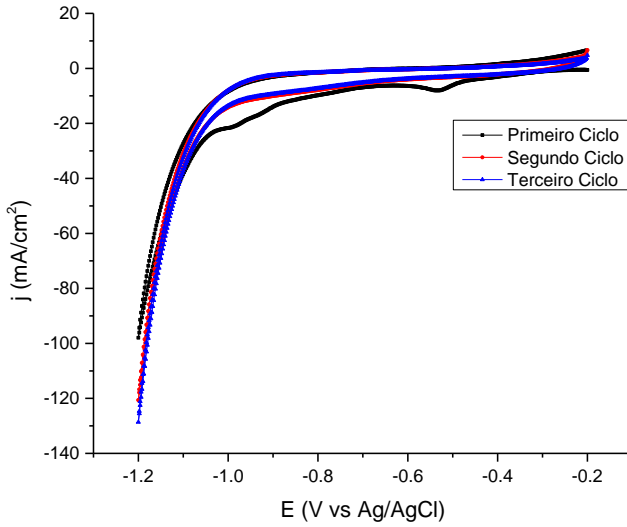
GSH - 500  $\mu$ M

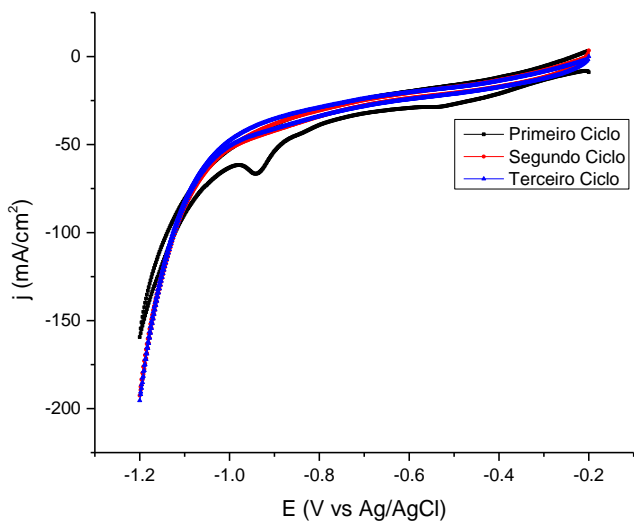
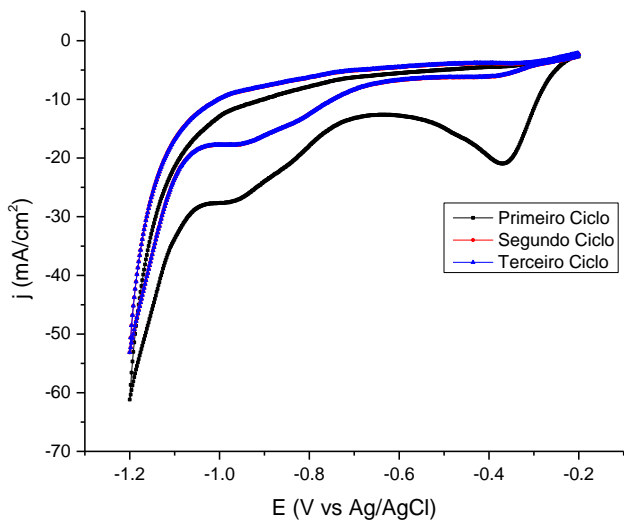
GSH – 100  $\mu\text{M}$ GSH – 25  $\mu\text{M}$ 

GSH – 5  $\mu$ M

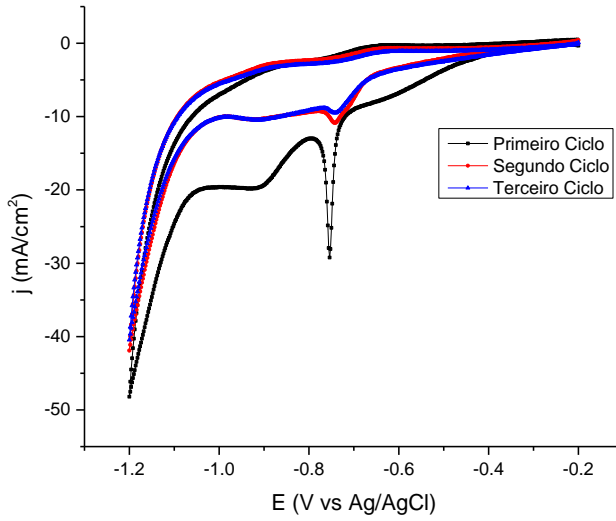
MAA – 10 mM



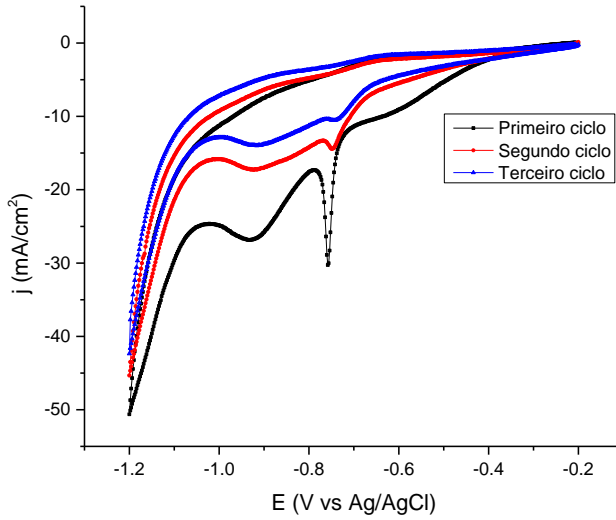
MAA – 500  $\mu\text{M}$ MAA – 100  $\mu\text{M}$ 

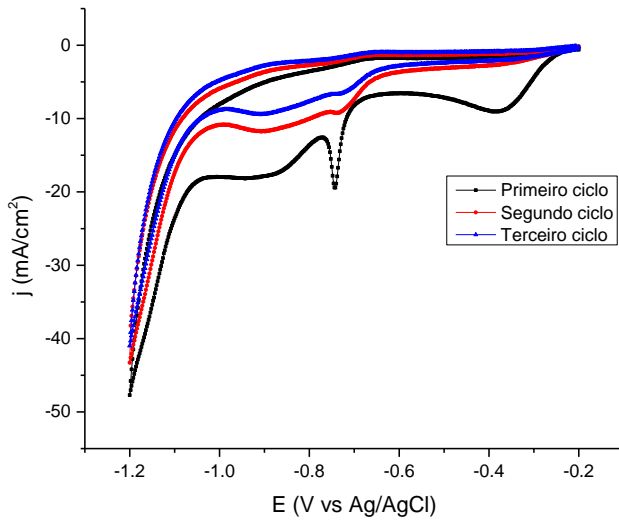
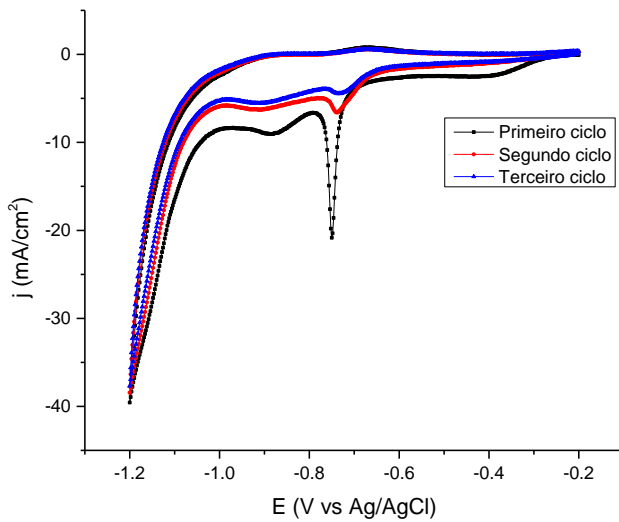
MAA – 25  $\mu\text{M}$ MAA – 5  $\mu\text{M}$ 

$\text{Na}_2\text{S}$  – 10 mM



$\text{Na}_2\text{S}$  – 500  $\mu\text{M}$



$\text{Na}_2\text{S}$  – 100  $\mu\text{M}$  $\text{Na}_2\text{S}$  – 25  $\mu\text{M}$ 



$\text{Na}_2\text{S}$  – 5  $\mu\text{M}$

