

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

ALEXANDRE KISNER

PREPARAÇÃO DE TRANSISTORES DE EFEITO DE CAMPO NANOESTRUTURADOS NA ANÁLISE DE PROCESSOS NEUROQUÍMICOS

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.

ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO TATSUO KUBOTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR ALEXANDRE KISNER, E ORIENTADA PELO PROF. DR. LAURO TATSUO KUBOTA.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Kisner, Alexandre (1982-). Preparação de transistores de efeito de campo nanoestruturados na análise de processos neuroquímicos / Alexandre Kisner. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.
Orientador: Lauro Tatsuo Kubota. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
1. Transistores. 2. Nanopartículas. 3. PC12.
4. Exocitose. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Preparation of nanostructured field effect transistors in the analysis of neurochemical processes

Palavras-chave em inglês:

Transistors Nanoparticles PC12 Exocytose

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Lauro Tatsuo Kubota [Orientador] Rose Mary Zumstein Georgetto Naal Sergio Antonio Spinola Machado Ana Flávia Nogueira Celso Aparecido Bertran

Data de defesa: 12/03/2012

Programa de pós-graduação: Química

"To be without some of the things you want is an indispensable part of happiness."

B. Russel

Dedico esta tese a todos aqueles que acreditam que nossa maior virtude como seres humanos é fazer com que este mundo se torne um lugar melhor do que aquele que encontramos quando chegamos nele, ensinando assim uns aos outros a exercerem o mesmo, pois onde há vontade e objetivos, há uma transformação.

Agradecimentos

Por mais individual que um projeto de doutorado seja construído, ele só é capaz de ser realizado com contribuições diretas e indiretas de diversos membros ligados em paralelo a ele. Muitas pessoas contribuiram para a realização desta tese e muitos fatores tiveram uma forte influência no encorajamento para a continuidade dela. Embora meras palavras sejam inadequadas para expressar toda a minha gratidão, elas ao menos oferecem esta pequena oportunidade para agradecer a todos que contribuiram para realização desta idéia e tese de doutorado.

Assim, gostaria de começar agradecendo ao meu orientador, Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela coragem, motivação e direito de liberdade de me permitir buscar aperfeiçoamento tão longe e por tanto tempo. Por tudo, obrigado pela confiança !

Agradeço a FAPESP (Processo 2007/03604-03) pelos auxílios e recursos financeiros concedidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria também de expressar toda minha gratidão aos membros do grupo LEEDS pela amizade e conversas que transformam os dias de chuva em tardes de sol durante a primavera e os dias de calor intenso em manhãs de domingo durante o inverno. Agradeço em especial ao Murilo, que eu o concebi aqui como meu pombo correio por toda ajuda com a CPG durante o período que estive fora. Meus agradecimentos especiais também a Jailson e Arnaldo Pereira, os quais eu também os concebi aqui como meus contadores pela ajuda com os gastos de reserva técnica e apresentação de relatórios a FAPESP.

Além destes, tenho um agradecimento ainda mais especial a outro membro do LEEDS, CecSilva (Cecília), não só por ter lido esta tese, não só por ter ajudado com as burocracias acadêmicas enquanto estive na Alemanha e não só por me recepcionar durante o exame geral, mas pelo apoio, encorajamento, convívio e amor diário que nos impulsiona juntos a olhar para o mundo como verdadeiros seres humanos que se preocupam com as demais pessoas como cidadãos. Por tudo isso, muito obrigado !

Agradeço também a Marina Aguiar por toda ajuda com tudo, tudo mesmo, moradia, alimentação, companherismo e preocupação. Meus mais sinceros agradecimentos a esta pessoa que não só vive mas também transmite o sentido da palavra amizade !

Eu devo também uma enorme gratidão a todos do instituto IBN-2 da Alemanha, por onde passei grande parte do doutorado. Em especial a minha líder de grupo, Dra. Yu Mourzina por também ter me dado liberdade de traçar cada parte desta tese de uma maneira ampla e multidisciplinar, *spassibo* Yu. Gostaria de agradecer também a todos os outros que participaram da execução e construção deste projeto, Regina, Marco, Boris, Rita, Jan, Alexey, Stefan, Niklas, Sandra, Vanessa, Michael, Ugur, Simone, Dirk, Bernhard, Janis, Martin, Mr. Pabst, Prompers, Thang, Sven, a todos meu *Troppo Danke* !

Fora do Instituto, muitos outros serviram de inspiração para o desenvolvimento deste projeto, de maneira que as noites nos pubs não foram somente uma sequência de conversas jogadas fora, mas renderam a formação de um grupo internacional que abraçou a todos os recémchegados e não lhes deixou congelar diante da frieza da cultura alemã. A todas estas pessoas que sempre estarão no meu coração, em especial Peppe Mercurio, Rosanna, Greta, Sandipan, Samir, Yan, Shirin, Enrique, Tânia, Dieter, Ana, Nicola, Diego e David lo Parcero meu *thank you very much for all ! To be continued...*

Finalmente, meus agradecimentos aos meus pais por me deixarem traçar o meu caminho da minha maneira, caindo e subindo, chorando e sorrindo, correndo e andando, sofrendo e aprendendo com o diabetes. Eu acredito que somos uma combinação genética dos cromossomos dos nossos pais e de suas emoções e lutas vividas ao longo do tempo, por isso agradeço a minha mãe por todas as suas lágrimas de dor e positivismo para não desistir nunca, assim como agradeço ao meu pai por todo seu suor de esforço e dedicação para oferecer ao seu único filho a oportunidade de estudar e transformar esse mundo num lugar mais justo e humanitário. Aos dois, muito obrigado por sempre acreditar !

Campinas, Abril de 2012

ALEXANDRE KISNER

B.Sc. in Chemistry, M.Sc. in Chemistry

kisner.alexandre169@gmail.com

Date of Birth: Place of Birth: Nationality: Marital Status:	6th January, 1982 Blumenau, SC, Brazil Brazilian Single
Education	
2007 - Present	PhD (candidate), Universidade Estadual de Campinas. Project: Preparation of nanostructurated field effect transistors to analyze neurochemical processes
2005 - 2007	MSc, Institute of Chemistry, Campinas State University (UNICAMP), Brazil. Master thesis: Developmentof a New ISFET Configuration for Highly Sensitive Detection of Chemical and Biological Species.
2000 - 2005	B.A. in Chemistry, Universidade Regional de Blumenau, SC, Brazil

Professional Experience

2002	Universidad Politécnica de Cartagena (Cartagena - Spain) 3 months Project: Synthesis of Ni and Pd organometallic compounds
2003	Synchrotron Light Laboratory – LNLS – Brazil.
	Summer School - 2 months
	Project: Electrochemical cell to in situ XAS measurements
2003-2004	Universidade Regional de Blumenau
	Partial time research student
	Project: Enzymatic modification of synthetic fibers
2003-2004	Universidade Regional de Blumenau
	Final project year
	Project: Electrochemical synthesis of Cu and Co nanostructures

Full Publications

- Arnaldo C. Pereira, Marina R. Aguiar, Alexandre Kisner, Denise V. Macedo, Lauro T. Kubota, Amperometric Biosensor for Lactate Dehydrogenase and Meldola Meldola Blue Coimmobilized on Multiwall Carbon Nanotube, *Sensors and Actuators B* 124, 269 276 (2007).
- 2. Andreas Feuerhack, Mandy Alisch-Mark, Alexandre Kisner, Sérgio Henrique Pezzin, Wolfgang Zimmermann, Jürgen Andreaus, Biocatalytic surface modification of knitted fabrics made of poly (ethylene terephthalate) with hydrolytic enzymes from *Thermobifida fusca* KW3b, *Biocatalysis and Biotransformation*, **2008**, *26*, 357-364.
- A. KISNER, M. R. AGUIAR, A. F. VAZ, A. ROJAS, F. A. CAVARSAN, J. A. DINIZ, L. T. KUBOTA, Submicrometer-MOS Capacitor with Ultra High Capacitance biased by Au Nanoelectrodes, *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 2008, 94, 831-836. DOI: 10.1007/s00339-008-4860-0.
- 4. Alexandre Kisner, Marina Rodrigues de Aguiar, and Lauro T. Kubota, Giant enhancement of light emission from Au nanocrystals into a porous matrix integrated with silicon platform, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2009**, *9*, 2592-2597.
- 5. Arnaldo César Pereira, Alexandre Kisner, César Ricardo Teixeira Tales, Nelson Duran and Lauro Tatsuo Kubota, Determination of Phenol Compounds Based on Electrodes with HRP Immobilized on Oxidized Multi-Wall Carbon Nanotubes. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*. **2009**, 3, 75-79.
- 6. Arnaldo C. Pereira, **Alexandre Kisner**, Nelson Duran, Lauro T. Kubota, The effects of dimensionality on electrochemical sensors based on carbon nanotubes and metallic nanowires. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2010** Feb;10(2):651-67.
- Arnaldo C. Pereira, Alexandre Kisner, César R. T. Tarley, Lauro T. Kubota, Development of a Carbon Paste Electrode for Lactate Detection Based on Meldola's Blue Adsorbed on Silica Gel Modified with Niobium Oxide and Lactate Oxidase. *Electroanalysis*, 2011, 23, No. 6, 1470 – 1477.
- 8. Jaydeep Bhattacharya, Alexandre Kisner, Andreas Offenhäusser, Bernhard Wolfrum, Microfluidic anodization of aluminum films for the fabrication of nanoporous lipid bilayer support structures. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 104–109.
- 9. Alexandre Kisner, Regina Stockmann, Michael Jansen, Ugur Yegin, Andreas Offenhäusser, Lauro Tatsuo Kubota, Yulia Mourzina, Sensing Small Neurotransmitter-Enzyme Interaction with Nanoporous Gated Ion-Sensitive Field Effect Transistors. *Accepted for publication at Biosensors and Bioelectronics*. doi:10.1016/j.bios.2011.10.010.

Resumo

Título : Preparação de Transistores de Efeito Campo Nanoestruturados na Análise de Processos Neuroquímicos

Autor : Alexandre Kisner Orientador : Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chaves : Transistores, Nanopartículas, PC12, Exocitose

Transistores de efeito de campo (FETs) modificados com nanoeletrodos de Au representam uma excelente ferramenta para o estudo eletrofisiológico de células, uma vez que as características de dimensionalidade destes últimos são comparáveis as espécies celulares a serem detectadas e medidas múltiplas podem ser realizadas simultaneamente. Neste trabalho, foram fabricados transistores de efeito de campo com três diferentes tipos de superfície em suas regiões de porta, transistores com somente SiO₂, SiO₂ e Al₂O₃ anódica porosa, e ainda SiO₂-Al₂O₃ contendo nanopartículas de Au dentro de seus poros. Os transistores foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura assim como por medidas elétricas convencionais. Estas últimas demonstraram que os processos de anodização e deposição de nanopartículas em sua superfície não comprometem as suas propriedades elétricas. Os transistores com portas nanoporosas foram modificados com tirosinase e empregados como biossensores para a detecção de dopamina. Os resultados demonstraram que estes FETs podem detectar dopamina num alcance de concentração normalmente encontrado durante a liberação destas moléculas por células neurais. Transistores com nanopartículas de Au foram empregados na detecção de serotonina utilizando-se uma metodologia de interação eletrostática através de monocamadas auto-organizadas, o que é ainda pouco explorado com FETs. Esta permitu a detecção de serotonina num alcance linear de 0,1 a 2 μ mol L⁻¹. Experimentos envolvendo a adesão celular e a detecção de prótons liberados por vesículas de células PC12 foram conduzidos, e demonstraram que os processos interfaciais entre as células e os transistores apresentam uma dependência das propriedades capacitivas da superfície, e que a presença das nanopartículas pode aumentar a sensibilidade elétrica da porta dos transistores. Estes efeitos interfaciais influenciaram diretamente na razão sinal-ruído da leitura de sinais de exocitose e sugerem que o uso de transistores nanoestruturados representa uma ferramenta promissora para análise deste tipo de célula in vitro.

Abstract

Title : Preparation of nanostructured field effect transistors in the analysis of neurochemical processes

Author : Alexandre Kisner Supervisor : Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota <u>Keywords :</u> Transistors, Nanoparticles, PC12, Exocytose

Field effect transistors modified with Au nanoparticles represent an excellent tool to electrophysiology analyzes. Because the dimensions of the devices are comparable to the size of the cells, multiple measurements can be performed simultaneously. In this work, field effect transistors were fabricated with three different kinds of surface in their gates, i.e. transistor with only SiO₂, SiO₂ and porous anodic Al₂O₃, and SiO₂-Al₂O₃ with Au nanoparticles embedded into the pores of Al₂O₃. The characterization of the transistors was performed by electron microscopy analysis and conventional electrical characterization. The last one showed that the anodization process and the Au nanoparticles deposition on surface of the transistors did not affect the electrical properties of the devices. The transistors presenting gates with only SiO_2 -Al₂O₃ were modified with tyrosinase and employed as biosensors to detect dopamine. The results of these analysis showed that the devices can detect dopamine in a range of concentration usually found when these molecules are released from neuronal cells. Transistors with Au nanoparticles were also applied as biosensors to detect serotonin. In doing so, the surface of the nanoparticles were modified with self-assembled monolayers that were able to interact with serotonin through electrostatic interactions. Although this approach is scarcely exploited with transistors, it showed promising results. For instance, serotonin could be detect in a linear range of concentration from 0,1 to 2 µmol L⁻¹. Experiments to analyze the cell adhesion on transistors and detect the release of protons from the extruded matrix of vesicles from PC12 cells were performed and demonstrated that the interfacial processes between cells and transistors were dependent on the capacitive properties of the surface. The presence of nanoparticles can enhance the electrical sensitivity of the gates from the devices. These interfacial effects presented a relationship with the signal to noise ratio of the exocytotic signals measured for vesicles release and suggested that the employment of nanostructurated transistors are promising tools to analyze these events from PC12 cells in vitro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS LISTA DE FIGURAS APRESENTAÇÃO		xxi
		xxii
		1
CAP. 1	Fundamentos	5
1.1	Os Neurônios	5
1.1.1	A Membrana Celular e o Potencial de Repouso	6
1.1.2	O Potencial de Ação	9
1.1.3	A Transmissão Sináptica e o Processo de Exocitose	11
1.1.4	Neurotransmissores e suas Funções	14
1.1.5	Monitoramento Eletrofisiológico	17
1.1.6	Modelos de Células Neurais	19
1.2	Transistores de Efeito de Campo	20
1.2.1	O Capacitor Metal-Óxido-Semicondutor	21
1.2.2	FETs – Modos de Operação	25
1.2.3	Transistores de Efeito de Campo Sensíveis a Íons	29
1.2.4	ISFETs Nanoestruturados	31
1.2	2.4.1 Nanoestruturas de Ouro	34
1.2	2.4.2 Alumina Anódica Porosa	35
1.2.5	A Interface Sólido-Líquido	36
1.3	A Interface entre Transistores e Células Eletrogênicas	39
1.3.1	O Modelo do Ponto de Contato	40

1.3.2	Análises de Adesão Celular por Função de Transferência	42
1.4	Objetivos	45
CAP. 2	Experimental	47
2.1	Fabricação de Capacitores Sub-micrométricos do tipo MOS	47
2.1.1	Reagentes e Materiais Empregados na Fabricação dos Capacitores	48
2.1.2	Oxidação de Silício, Deposição de Alumínio e Anodização	48
2.1.3	Crescimento de Nanopartículas de Au dentro dos Poros de Alumina	49
2.1.4	Caracterização por Microscopia Eletrônica	49
2.1.5	Formação de um Eletrodo de Pt sobre as Nanoestruturas de Au	50
2.1.6	Medidas Elétricas	51
2.2	Caracterização Elétrica dos Capacitores em Solução Eletrolítica	51
2.2.1	Caracterização Elétrica por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	52
2.3	Fabricação e Caracterização Elétrica de Transistores de Efeito de Campo	53
2.3.1	Layout dos Chips	53
2.3.2	Reagentes e Materiais Empregados na Fabricação dos Transistoros	55
2.3.3	Procedimentos Empregados na Fabricação dos FETs	55
2.3.4	Fabricação de Alumina Porosa sobre os FETs	57
2.3.5	Síntese de Nanopartículas de Au dentro dos Poros de	58
2.3.6	Análises por Microscopia Eletrônica	59
2.3.7	Encapsulamento dos Chips	59
2.3.8	Caracterização Elétrica e Aquisição de Dados	61

2.3.9	Medidas de Soluções Tampão com diferentes pHs	62
2.4	Detecção de Neurotransmissores usando Transistores Nanoestruturados	63
2.4.1	Modificação da Superfície Porosa dos FETs para Detecção de Dopamina	63
2.4.2	Modificação da Superfície de FETs contendo Nanopartículas de Au para a Detecção de Serotonina	63
2.5	Medidas de Adesão Celular e Liberação de Vesículas pelas Células PC 12	64
2.5.1	Cultivo de Células	64
2.5.2	Cultivo de Células no chips	64
2.5.3	Medidas de Função Transferência e Detecção da Liberação das Vesículas	65
CAP. 3	Resultados e Discussão	67
3.1	Fabricação de Membranas Porosas de Alumina sobre Si/SiO ₂	67
3.2	Síntese das Nanopartículas de Au	72
3.3	Medidas de Capacitância de Nanopartículas utilizando um Eletrodo submicrométrico de Pt	76
3.3.1	Armazenamento de cargas	81
3.4	Medidas de Capacitância em Solução utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	82
3.4.1	Caracterização de Capacitância Interfacial	83
3.4.2	Caracterização dos Estados de Protonação/Desprotonação de Superfície utilizando a técnica de EIE	88
3.5	Fabricação e Operação de Transistores de Efeito de Campo	98
3.5.1	Caracterização Elétrica de Transistores de Efeito de Campo	101
3.6	FETs como Sensores de pH	106
3.7	Imobilização de Tirosinase na Porta Porosa dos FETs e Detecção de Dopamina	110

3.8	Detecção de Serotonina através de Transistores à base de	116
	Nanopartículas de Au	
3.9	Adesão Celular e Medidas de Função de Transferência	122
	(Voltagem) utilizando Transistores	
3.10	Detecção da Liberação de Vesículas de Células PC12	138
CAP. 4	Conclusões e Perspectivas Futuras	143
Anexo A		147
Anexo B		155
Bibliografia		157

LISTA DE TABELAS

- **Tabela 3.1**Parâmetros utilizados para o cálculo de capacitância teórica e86comparados a capacitância experimental (C_{exp}) das superfícies deSiO2 e Al₂O3 (n=5).
- **Tabela 3.2**Voltagens de ruptura e os correspondentes campos elétricos87calculados a partir das curvas mostradas na Figura 3.12.
- **Tabela 3.3**Frequência de corte e valores calculados para as constantes95cinéticas de protonação e desprotonação dos gruposS-OH dosfilmes de óxido.
- Tabela 3.4Parâmetros elétricos importantes extraídos das caracterizações dos106transistores com dimensões de 12 x 7 μm, comprimento e largura,
respectivamente.106
- Tabela 3.5Parâmetros mantidos constante durante a simulação da influência127da variação de RJ no sinal da função de transferência.
- Tabela 3.6Parâmetros utilizados para o ajuste das curvas experimentais da 135função de transferência mostrados na Figura 3.39D.
- Tabela 3.7Parâmetros determinados a partir da Figura 3.39D e utilizados para136o cálculo da resistência específica da área de junção.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Ilustração da estrutura cellular de um neurônio motor. A Figura 6 foi adaptada da referência [7]. Figura 1.2 Ilustração do circuito elétrico equivalente para a membrana 8 celular de um neurônio proposto por Hodgkin e Huxley. A Figura foi adaptada da referência [5]. Figura 1.3 A- Ilustração da propagação de um potencial de ação através do 10 axônio de um neurônio. B- Representação do traço de potencial de membrana versus tempo para as diferentes fases de um potencial de ação conforme mostrado em A [22]. 12 Figura 1.4 Ilustração esquemática da formação de uma junção de sinapse elétrica. Nesta, seis unidades monoméricas da proteína conexina formam um conexón e os conexons de duas células forma uma junção sináptica. A Figura foi adaptada da referência [23]. Figura 1.5 Representação esquemática da transmissão sináptica em uma 13 sinápse química. A Figura foi adaptada da referência [7]. Figura 1.6 Estruturas químicas dos respectivos neurotransmissores 17 discutidos nesta sub-seção. Figura 1.7 Ilustração básica da técnica de *patch-clamp*. Nesta, a micropipeta 18 de vidro preenchida com eletrólitos é colocada em contato com a membrana celular e através da ruptura desta as correntes dos canais de íons são então registradas. A Figura foi adaptada da referência [27]. Figura 1.8 Ilustração esquemática de um transistor do tipo MOSFET. 21 Durante o funcionamento deste transistor os terminais de fonte e dreno são polarizados através de uma voltagem VDS, enquanto uma diferença de potencial VGS é aplicada entre a fonte e o eletrodo de porta. 22
- Figura 1.9A Estrutura física de um capacitor do tipo MOS. B Diagrama22de bandas de energia para o respectivo capacitor mostrado em A.
Os termos do diagrama são definidos no texto.22

- Figura 1.10Variação das bandas de energia durante a polarização de um
MOS apresentando os casos de: (A) acumulação, (B) depleção e
(C) inversão. Em todos os diagramas os termos E_C e E_V
correspondem as energias das bandas de condução e valência do
silício, respectivamente. O termo E_i representa a energia do nível
de Fermi intrínsico do silício e E_F é o nível de Fermi atual de
ambos, silício e metal. A Figura foi adaptada da referência [34].
- **Figura 1.11** Curvas de capacitância versus voltagem em alta e baixa frequência para um capacitor MOS ideal. Em ambas curvas a capacitância do óxido C_{ox} é determinada na região de acumulação. A Figura foi adaptada da referência [35].

24

- Figura 1.12 A Curvas de características de saída hipotéticas (lado esquerdo) 27 de um transistor pMOS. As ilustrações do lado direito mostram o comportamento elétrico no respectivo transistor durante as diferentes fases das curvas de saída. I) Uma camada de inversão é formada na porta do FET, mas não há uma corrente fluindo entre fonte e dreno. II) Mudança em I_{DS} no ponto de operação do FET como consequência do fenômeno de pinch-off. III) Transistor operando na região de saturação. B Curvas de características de transferência hipotéticas para o respectivo pMOS.
- Figura 1.13 Curvas de transcondutância hipotéticas de um transistor pMOS. 29
- **Figura 1.14** Ilustração esquemática de um transistor de efeito de campo 30 sensível a íons.
- **Figura 1.15** Curvas de características de transferência hipotéticas mostrando 34 a variação em V_T de um ISFET antes (V_{T1}) e após (V_{T2}) a mudança de função trabalho de partículas metálicas cobrindo a sua superfície.
- **Figura 1.16** Ilustração da estrutura geral de uma camada de alumina crescida 36 anódicamente sobre um substrato de alumínio.
- Figura 1.17 Representação esquemática do modelo de Bockris, Devanathan e 38 Müller para íons e moléculas da água distribuídos dentro da dupla camada elétrica e adsorvidos com dipolos orientados numa superfície metálica. Na representação das moléculas da água, as esferas azúis representam os átomos de hidrogênio, enquanto as esferas verdes correspondem aos átomos de oxigênio.
 - xxiii

- **Figura 1.18** Circuito equivalente para o modelo do ponto de contato contendo 40 os seguintes potenciais: O potencial de membrana V_M no citosol, o potencial de junção V_J na região de acoplamento e o potencial V_S entre a fonte e a solução de eletrólitos. Estes potenciais estão conectados entre si através dos elementos descritos por Hodgkin e Huxley para a membrana celular, isto é, a condutância G_J da junção de acoplamento e a capacitância do óxido na porta do transistor. A Figura foi adaptada da referência [56].
- **Figura 1.19** Curva hipotética do logarítmo da transferência de função H em 43 função do logarítmo da frequência angular ω . O termo ω_0 indica a frequência de corte.
- Figura 2.1. Ilustração esquemática das etapas de fabricação do capacitor 51 sub-micrométrico polarizado por nanopartículas de Au. Após a oxidação do substrato de Si e formação de um filme fino de SiO₂, um filme fino de alumínio foi depositado e posteriormente anodizado gerando assim uma fina camada porosa de alumina anódica (etapa I). Na sequência, nanopartículas de Au foram crescidas diretamente dentro dos poros de alumina (etapa II). Por fim, estas nanopartículas foram eletricamente conectadas a um eletrodo sub-micrométrico de Pt (etapa III). As ilustrações desta Figura não estão em escala.
- **Figura 2.2.** Illustração do arranjo de eletrodos para a célula eletroquímica utilizada nas medidasde impedância. Neste caso, a ilustração é demonstrada apenas para uma amostra de Si/SiO₂/Al₂O₃, porém o mesmo arranjo de eletrodos foi utilizado também para análises de amostras contendo nanopartículas de Au.
- Figura 2.3. Layout do chip fabricado (ilustração da esquerda). Os 16 FETs 54 são arranjados numa matriz de 4 x 4 no centro do chip e são indicados pelos retângulos verdes. As setas indicam os pads de contato para a fonte comum (indicada pela letra S) para todos os transistores, assim como o pad de contato para o dreno de um transistor. Os números ao lado dos pads servem como identificação dos FETs. A caixa retangular vermelha no centro do chip indica um FET e uma imagem ampliada deste é mostrada no layout a direita. Neste, as letras S e D indicam os contatos de fonte e dreno, enquanto a largura e o comprimento da porta do FET são indicados pelas letras WG e LG, respectivamente.
- **Figura 2.4.** Etapas de fabricação dos transistores de efeito de campo com 56 canal p.

Figura 2.5. A – Fotografia do arranjo experimental para anodização do chip contendo os FETs. O chip é colocado na parte inferior de uma célula eletroquímica feita de acrílico, enquanto um contraeletrodo de Pt é colocado na parte superior da célula. O chip e o contra-eletrodo são polarizados através de uma fonte de tensão e a corrente de anodização é monitorada através de um multímetro. B –Fotografia da célula eletroquímica mostrando o arranjo do chip, do contra-eletrodo e do compartimento para a solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. O contato elétrico no chip é feito através de um clip metálico conectando sua extremidade. C – Fotografia de um chip anodizado. O círculo na área central do chip indica a região anodizada.

58

- Figura 2.6. A Fotografia dos elementos utilizados para encapsulamento dos chips. i) chip, ii) *carrier*, iii) *oring* de PDMS, iv) oring de vidro. Para comparação de dimensões, uma moeda de 5 centavos de reais foi colocada junto a foto. B Ilustração de um chip eletricamente conectado a linhas metálicas de um *carrier* através do processo de *wire-bonding*. Os números representam o dreno do FET que está sendo conectado, enquanto as letras S e B correspondem a source (fonte comum para todos os FETs) e corpo (conexão para aterro da fonte), respectivamente. C Foto de um chip encapsulado ao final do processo.
- Figura 2.7. A – Fotografia da caixa amplificadora utilizada para medidas 62 elétricas dos chips. B –Diagrama básico do circuito elétrico da caixa amplificadora. O circuito foi adaptado da referência [60]. C -Ilustração esquemática do arranjo empregado na transferência de dados da caixa amplificadora para um computador com o programa BioMol. D – Imagem da tela do programa BioMol características registrando as elétricas de 16 **FETs** simultaneamente. Os ajustes de voltagem durante as medidas são feitos no lado direito da tela.
- **Figura 3.1** Perfil típico da corrente de anodização ao longo do tempo. Os 68 números no gráfico a esquerda representam os diferentes estágios do crescimento do filme anódico ilustrado nas figuras a direita.
- Figura 3.2 A) e B) Micrografias obtidas por MEV de um filme ultrafino de 69 alumina produzido sobre a superfície de Si/SiO₂ antes e após a etapa de corrosão por 40 min. com H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. As escalas das figuras são de 200 nm e 500 nm, respectivamente. C) Histograma de distribuição do diâmetro médio dos poros após a etapa de corrosão.
 - XXV

- Figura 3.3 A), B) e C) Micrografias de MEV de filmes ultrafinos de 71 alumina produzidos sobre a superfície de Si/SiO₂ após a etapa de corrosão por 25, 30 e 35 min. com H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. As escalas das figuras são de 200 nm. O tamanho médio dos poros após cada período de corrosão foi de 18, 23 e 27 nm para as micrografias mostradas em A, B e C, respectivamente.
- **Figura 3.4** Micrografia transversal do filme de alumina produzido sobre 72 Si/SiO₂ após a etapa de corrosão por 40 min. com H_3PO_4 0,1 mol L^{-1} . A escala da figura é de 100 nm. A figura inserida mostra uma imagem ampliada do corte transversal e as setas indicam a base dos poros.
- Figura 3.5 A) e B) Micrografias de MEV de um filme de alumina sobre a superfície de Si/SiO₂ após a primeira e a segunda etapa de redução galvânica para formação de nanopartículas de Au dentro dos poros da alumina respectivamente. Os círculos vermelhos na figura A indicam a formação de pequenas partículas de Au dentro dos poros. As escalas das figuras A e B são de 200 nm e 400 nm, respectivamente. C) Histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas de Au dentro dos poros da alumina após a segunda etapa de redução galvânica.
- **Figura 3.6** Difratograma de raios X das nanopartículas de Au produzidas 75 nos poros da alumina.
- Figura 3.7 A) Micrografia de TEM mostrando o arranjo de algumas 76 nanopartículas de Au (AuNPs) dentro dos poros da alumina produzida sobre Si/SiO₂. As setas indicam as posições dos filmes de óxido assim como das partículas de Au. Durante a preparação da amostra para análise de TEM, o topo da amostra foi protegido com a deposição de uma camada de Pt. A escala da figura é de 50 nm. B) Fotografia de uma amostra de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs após a segunda etapa de redução galvânica para o crescimento das nanopartículas de Au. Devido ao crescimento das nanopartículas até o topo dos poros de alumina, a superfície da amostra apresentou uma coloração verde musgo.

xxvi

- Figura 3.8 A) Micrografia de FEG-MEV mostrando o eletrodo de Pt 78 conectando as nanopartículas de Au. A escala é de 500 nm. A figura inserida mostra o pad de contato conectando o eletrodo de Pt. Nesta, a escala corresponde a 10 μm. B) e C) Curvas de I-V para os capacitores fabricados contendo as nanopartículas de Au e também o capacitor controle, respectivamente. A figura inserida na parte superior esquerda da Figura B representa uma ilustração da configuração das medidas. Os gráficos inseridos na parte inferior a direita mostram as curvas de condutância versus voltagem derivadas a partir das curvas de I-V para cada amostra.
- Figura 3.9 A) Curvas de C-V normalizadas para o capacitor de alumina sem 79 Au (AAO) (em preto) e com Au (AAO/Au) (em vermelho) respectivamente. B) e D) Curvas de C-V para o capacitor AAO/Au polarizado com diferentes janelas de voltagem. C) Curva de C-V simulada usando o software Sentaurus.
- **Figura 3.10** Decaimento de carga no capacitor de AAO/Au ao longo do 82 tempo. A Figura inserida mostra o decaimento de carga aplicando-se diferentes tensões durante 1220 s.
- **Figura 3.11** Curvas de capacitância versus voltagem para as amostras 84 analisadas. Os termos PF e PA nas legendas significam somente anodizada e anodizada e submetida a abertura de poros, respectivamente.
- **Figura 3.12** Curvas de corrente versus voltagem para as amostras de Si/SiO₂, 87 Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs. Para as amostras de Si/SiO₂/Al₂O₃, os poros da alumina foram previamente corroídos por 40 min. em H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹. A voltagem de ruptura nas amostras é indicada por um aumento na corrente.
- Figura 3.13 A), B) e C) Curvas de capacitância interfacial total versus pH 90 para as superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/Au-NPs, respectivamente. As medidas foram realizadas em soluções de KCl 0,01 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ com uma polarização de 0 V vs Ag/AgCl.
- Figura 3.14 A) e C) Curvas de capacitância interfacial total versus voltagem 95 em diferentes frequências para as superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃, respectivamente. B) e D) log ΔC_P versus frequência. Os valores de ΔC_P foram tomados a partir dos máximos de capacitância para as curvas mostradas em A) e B), respectivamente, e corrigidos para a capacitância de carga espacial.
- Figura 3.15A) e B) Densidade total de grupos ionizáveis versus pH para as
superfícies de Si/SiO2 e Si/SiO2/Al2O3, respectivamente. As
curvas foram calculadas a partir das Figuras 3.13A e B utilizando97

a Equação 3.20.

- Figura 3.16Imagens de microscopia óptica das portas de um FET produzido98conforme o processo descrito anteriormente.98
- Figura 3.17 A) Ilustração do design final de um ISFET possuindo uma 99 camada de alumina em sua porta. B) Micrografia de uma porta possuindo alumina. C) Micrografia com alta magnificação da região destacada com a caixa em vermelho em B). D) Micrografia do perfil da camada de alumina sobre o substrato.
- **Figura 3.18** Micrografia da extremidade inferior esquerda de um FET 100 mostrado na Figura inserida após anodização e corrosão em $H_3PO_4 0,1 \text{ mol } L^{-1} \text{ por } 40 \text{ min.}$ A barra de escala corresponde a 1 μ m.
- Figura 3.19 A) Micrografia da porta de um FET após a deposição de 101 nanopartículas de Au dentro dos poros de alumina cobrindo a sua superfície. A barra de escala é de 5 μm. B) Imagem de MEV de maior magnificação da área marcada pelo quadrado em vermelho na figura A mostrando as nanopartículas de Au na superfície do FET. A barra de escala é de 400 nm.
- **Figure 3.20** Ilustração demonstrando um ISFET de canal p e suas conexões 102 elétricas. Em destaque os eletrodos de fonte e o dreno (Si-p) e a solução eletrolítica com o eletrodo de referência, o qual atua como um eletrodo de porta. As linhas de contato para fonte e dreno foram isoladas eletricamente da solução eletrolítica por uma camada de ONO.
- Figura 3.21 Caracterização elétrica de FETs produzidos antes e após 103 anodização das portas, e após a deposição de nanopartículas de Au nos poros de alumina. A), B) e C) mostram curvas de I_{DS}-V_{DS} para FETs com SiO₂, SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs em suas portas, respectivamente. D), E) e F) exibem curvas de I_{DS}-V_{GS}, para FETs com SiO₂, SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs em suas portas, respectivamente. G), H) e I) curvas de transcondutância para FETs com SiO₂, SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs em suas portas, respectivamente. G), H) e I) curvas de transcondutância para FETs com SiO₂, SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs em suas portas, respectivamente.
- Figure 3.22 A) e B) Histogramas de valores da voltagem de limiar de mais de 105 45 transistores antes e após o processo de anodização e corrosão dos poros da alumina em H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹ por 40 min, respectivamente.
- Figura 3.23A) Detecção em tempo real de I_{DS} quando o FET SiO₂/Al₂O₃ é107exposto a soluções de pH 10 a 3. B) Ilustração esquemática

mostrando o comportamento do canal condutor entre fonte e dreno quando a superfície do sensor esta exposta em meios alcalinos I e meios ácidos II. C) Dependência de V_{GS} em função dos diferentes pH na superfície dos FETs de SiO₂/Al₂O₃ D) Dependência de I_{DS} em função de pequenas variações de pH (0.3 unidades).

- Figura 3.24 A) Detecção em tempo real da variação de I_{DS} quando FETs do 109 tipo SiO₂/Al₂O₃/AuNPs foram expostos a soluções de pH 10 a 3.
 B) Dependência de V_{GS} em função dos diferentes pH na superfície dos FETs (n = 5).
- Figura 3.25 A) Ilustração esquemática da oxidação de dopamina para o-111 dopaquinona catalisada por tirosinase. B) Curva de I_{DS} versus V_{GS} medida em tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10,0 mmol L⁻¹ de KCl para um FET com alumina porosa antes e após a imobilização de tirosinase em sua superfície.
- **Figura 3.26** A) Dependência de ΔV_{GS} em função do pH de uma solução 112 tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl, para a detecção de 10 µmol L⁻¹ de dopamina. **B**) Dependência de ΔV_{GS} em função da concentração de tirosinase imobilizada na superfície dos transistores para a detecção de 10 µmol L⁻¹ de dopamina.
- **Figura 3.27** A) Curvas de I_{DS} versus V_{GS} para um FET/Al₂O₃ modificado 113 com tirosinase e sobre a adição de diferentes concentrações de dopamina (DPM) ($V_{DS} = -1$ V). B) Variação em V_{GS} para uma ampla faixa de concentração de dopamina derivada a partir da curva A (n=5). ΔV_{GS} é determinado a partir do ponto de V_T do transistor.
- **Figura 3.28** A) Estruturas moleculares do ácido glutâmico e GABA. B) 115 Variação de I_{DS} ao longo do tempo para um FET/Al₂O₃ modificado com tirosinase e após a adição sucessiva de: (1) Tampão fosfato, (2) 3 µmol L⁻¹ de dopamina, (3) 50 µmol L⁻¹ de GABA, (4) 10 µmol L⁻¹ de dopamina, (5) 50 µmol L⁻¹ de ácido glutâmico, (6) 10 µmol L⁻¹ de dopamina, (7) 10 µmol L⁻¹ de dopamina. C) Curva de I_{DS} versus V_{GS} para um FET/Al₂O₃ modificado com tirosinase em presença de tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl, pH 7,3 e após a adição em sequência de 50 µmol L⁻¹ de GABA, 50 µmol L⁻¹ de ácido glutâmico e 50µmol L⁻¹ de dopamina. A figura inserida mostra uma amplificação da área destacada pela elipse vermelha, a qual corresponde a região de V_T para o FET/Al₂O₃.

- Figura 3.29 A) e B) Estruturas moleculares de tiofenol e captopril e as suas 118 organizações moleculares quando imobilizadas sobre nanopartículas de Au dentro dos poros de alumina cobrindo a superfície de um FET, respectivamente. C) Curva de I_{DS} V_{GS} para um FET antes e após a imobilização da SAM em sua superfície. D) Variação de V_{GS} em função do pH para um FET modificado com a SAM de captopril e tiofenol.
- Figura 3.30 A) Variação de V_{GS} em função do tempo durante a detecção de 119 0,5 μmol L⁻¹ de serotonina. B) Variação de V_{GS} em função do pH durante a detecção de serotonina. C) Curva de I_{DS} versus V_{GS} para um FET representativo modificado com a SAM empregado na detecção de diferentes concentrações de serotonina (V_{DS} = -1 V). D) Variação em V_{GS} em função da concentração de serotonina derivada a partir da curva C (n=4).
- Figura 3.31 A) Curvas representativas de I_{DS} versus V_{GS} para um FET de 121 SiO₂/Al₂O₃/AuNPs modificado com a SAM de captopril e tiofenol. As curvas foram primeiramente medidas em tampão fosfato e depois sequencialmente após a adição de noraadrenalina, ácido ascórbico, dopamina e serotonina. As concentrações de cada uma das espécies estão inseridas na figura.
- Figura 3.32 A), B) e C) Imagens de microscopia óptica por contraste de 123 interferência diferencial (DIC) de células PC12 após três dias de crescimento sobre transistores com superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. D), E) e
 F) Imagens de DIC após três dias de crescimento de camadas confluentes de células PC12 sobre os FETs de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. A setas indicam a região de porta dos transistores.
- Figura 3.33Ilustração do circuito elétrico equivalente para o acoplamento de
uma célula sobre um transistor.125
- **Figura 3.34** Curvas de função de transferência versus frequência simuladas 127 para os diferentes valores de R_J indicados na legenda da figura.
- **Figura 3.35** Curvas de função de transferência versus frequência simuladas 128 para os diferentes valores de R_{el} indicados na legenda da figura.
- Figure 3.36Curvas de função de transferência simuladas para diferentes129valores de C_{TM} indicados na legenda da figura.129
- **Figure 3.37** Influência de diferentes valores de C_{ox} (indicados na legenda da 130 figura) nas curvas de função de transferência simuladas.

- Figure 3.38 A), B) e C) Curvas experimentais da função de transferência em 132 diferentes tempos após a adição de anfotericina B sobre transistores possuindo suas superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs cobertas com células PC12, respectivamente. As funções de transferências para estas curvas foram normalizadas divindo-se os valores das curvas contendo células sobre os FETs por curvas de amostras sem células.
- Figure 3.39 A), B) e C) Curvas experimentais da função de transferência para 134 diferentes transistores possuindo suas superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs cobertas com células PC12, respectivamente. Para cada tipo de superfície são mostradas curvas de cinco transistores. As funções de transferências para estas curvas foram normalizadas divindo-se os valores das curvas contendo células sobre os FETs por curvas de amostras sem células. D) Curvas (pontos) da função de transferência do FET 2 da Figura A, do FET 8 da Figura B e do FET 13 da Figura C. As linhas continuas representam os ajustes feitos utilizando-se a Equação 3.23.
- Figura 3.40 139 A), B) e C) curvas i – Traços representativos de correntes I_{DS} versus tempo antes do crescimento de células para transistores superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ com as e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. Curvas ii correntes I_{DS} versus tempo para os respectivos transistores após de células 0 crescimento **PC12** sobre suas superfícies e estimulação química destas com alíquotas de 30 μ L de 3 KCl mol L⁻¹. Em todos os casos os valores de V_{DS} e V_{GS} aplicados foram de -1 V e -0,8 V, respectivamente.
- Figura 3.41 A) Traço de corrente I_{DS} ao longo do tempo mostrando o formato 140 de um dos picos detectados na curva ii da Figura 3.40C. B) Histograma do tempo de duração de picos de corrente detectados nas curvas ii das Figuras 3.40A, B e C.
- **Figura 3.42** Ilustração mostrando uma célula PC12 aderida sobre um FET 141 com a consequente fusão de vesículas na membrana celular e a liberação de íons H⁺ e dopamina na região de junção célula/transistor.

Apresentação

As células neurais são os blocos de construção do cérebro e também os elementos fundamentais mais sofisticados no processamento e transmissão de sinais elétricos nos seres vivos invertebrados e vertebrados. O cérebro humano por exemplo é formado por aproximadamente 10¹¹ células neurais, onde cada célula pode formar até 80000 conexões com outras células.^[1] Esta imensa quantidade de neurônios e suas vastas conexões tornam o processamento de sinais no sistema nervoso como um dos mais complexos e ainda não completamente compreendidos, mistérios entre todos os seres vivos.

A história da análise da condução elétrica através de espécies biológicas é datada desde as civilizações egípcias e gregas mais antigas, a mais de 4000 ac.^[2] Todavia, avanços mais significativos no estudo da bioeletricidade so vieram a ocorrer após 1791 com a publicação de Luigi Galvani, De Viribus Electricitatis In Motu Musculari, no qual ele descreveu suas observações sobre a contração muscular na perna dessecada de uma rã após a aplicação de estímulos elétricos com eletrodos metálicos nesta. A partir destas observações, Galvani propôs que o organismo biológico deveria possuir por si próprio uma eletricidade intrínsica. Embora Galvani tenha ignorado o fato de que dois eletrodos metálicos interconectados possam causar uma diferença de potencial, esta de fato foi a responsável pelo estímulo elétrico observado no nervo da rã. Anos mais tarde, o físico Alessandro Volta complementou com estas observações os resultados obtidos por Galvani. Estas interpretações deram origem a um novo ramo da ciência, hoje conhecido como eletrofisiologia.^[3] Baseados nestas observações de Galvani e Volta, em 1952 Hodgkin e Huxley sugeriram através de uma série de experimentos, um circuito elétrico equivalente para explicar a diferença de potencial constante da membrana celular de um neurônio (proveniente de uma lula) e o movimento de íons através desta.^[4,5] Durante seus experimentos, Hodgkin e Huxley demonstraram a detecção de potenciais de ação e a existência de canais de íons que são ativados pela despolarização da membrana celular.

Na década de 70, Neher e Sakmann conduziram o desenvolvimento de uma técnica capaz de analisar mais quantitativamente estes canais de íons.^[6,7] Esta técnica, chamada de *patch-clamping*, é baseada numa micropipeta de vidro ou quartzo fundido, preenchida com uma

solução iônica que conecta um eletrodo de Ag/AgCl a uma pequena área da membrana celular e possibilita a análise das correntes iônicas através de canais específicos presentes nesta. Com o desenvolvimento desta técnica foi possível analisar canais isolados na membrana plasmática.^[6-8] Da mesma forma, o potencial elétrico e as correntes geradas em toda a célula podem ser registrados. Pelo desenvolvimento desta técnica, em 1991 Neher e Sakmann receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. Apesar dos avanços promovidos pela técnica de *patch-clamp*, ela apresenta uma série de limitações tais como, procedimentos complicados durante sua realização, número limitado de até 4 micropipetas que podem ser utilizadas simultaneamente e apenas poucas células podem ser analisadas com estas. Além disso, a técnica é invasiva e destrói a membrana celular após uma medida, o que impossibilita análises com longos tempos de duração.

Simultaneamente, durante a década 70, com o avanço das técnicas de microfabricação uma nova tecnologia baseada em microeletrodos planares foi desenvolvida. Nesta, microeletrodos de diversos tipos de materiais como óxido de estanho-índio (ITO), nitreto de titânio, ouro (Au), platina (Pt) e negro de platina foram produzidos sobre superfície planares.^[9-11] Células como neurônios são então crescidas sobre estes, os quais podem ser usados não só para detectar os potenciais de ação extracelulares como também promover estímulos elétricos as células.^[10]

Uma outra alternativa para o monitoramento de eventos extracelulares também foi proposta em 1970. Piet Bergveld sugeriu o uso de transistores de efeito de campo como sensores eletrofisiológicos.^[12] Na ocasião, Bergveld desenvolveu os então conhecidos como transistores de efeito de campo sensíveis a íons ou ISFETs (do inglês, *ion-sensitive field effect transistors*), os quais diferem dos transistores convencionais por não possuirem uma camada metálica em sua superfície. Desde as publicações pioneiras de Bergveld na década de 70 descrevendo esses experimentos, este mesmo princípio tem sido aplicado até hoje na análise de potenciais de ação não só de neurônios como também de células cardíacas.^[13-15] Adicionalmente, ao longo desses anos os ISFETs foram também aplicados como biossensores na detecção de uma ampla gama de processos como por exemplo, a hibridização de moléculas de DNA, reconhecimento de antígenos por antícorpos e detecção de moléculas pequenas como a uréia.^[16-18] O emprego destes dispositivos tanto para a análise de processos envolvendo células eletrogênicas, como para biossensores moleculares, tem como vantagem em relação a outras técnicas como patch-clamp, a

sua capacidade de miniaturização e integração de múltiplos dispositivos funcionando simultâneamente. Embora os ISFETs tenham sido nos últimos anos vastamente empregados na detecção de potenciais de ação extracelulares, uma série de outras aplicações farmacológicas podem também ser exploradas com estes sensores. Por exemplo, a detecção de neurotransmissores que são liberados na fenda sináptica durante a propagação de um potencial de ação e a respectiva transmissão sináptica.^[19,20] Entretanto, uma das limitações tecnológicas é que os FETs são sensores de carácter capacitivo, e como um efeito da sua miniaturização, suas áreas superficiais e portanto suas capacitâncias, tendem também a diminuir, o que limita assim sua habilidade de monitorar pequenas mudanças de potencial na superfície. Uma alternativa para superar esta problemática, é o emprego de transistores com portas apresentando estruturas altamente porosas e/ou estruturas metálicas nanométricas, as quais apresentam uma razão de superfície/volume extremamente alta e podem portanto exibir maior sensibilidade a pequenas variações eletrostáticas.

Baseado nestas últimas observações, o objetivo geral deste trabalho foi produzir ISFETs com uma superfície nanoestruturada e utilizar estes para monitorar eventos de exocitose como a liberação de prótons contidos em vesículas de células modelos de neurônios. Assim, os capítulos desta tese foram organizados da seguinte maneira:

O **capítulo 1** apresenta os fundamentos sobre as células neurais e seus modos de transmissão elétrica através das sinapses. Além destes, os conceitos básicos sobre a física e o funcionamento de transistores de efeito de campo, assim como a modificação de suas superfícies com nanopartículas metálicas são também abordados. A última parte deste capítulo introduz o acoplamento de células com transistores e como estes dispositivos podem ser usados para monitorar eventos de exocitose.

O **capítulo 2** descreve os processos de fabricação e caracterização elétrica de capacitores e transistores utilizados nesta tese. Adicionalmente, os processos para formação de nanopartículas sobre a porta dos transistores e o seu emprego para a detecção de moléculas neurotransmissoras e eventos de liberação de prótons por vesículas de células modelos de neurônios são também apresentados.

O capítulo 3 apresenta os resultados e discussões sobre os processos de fabricação, caracterização elétrica e aplicação de transistores de efeito de campo modificados com

3

nanopartículas metálicas para a detecção de moléculas de neurotransmissores. Por fim, a última parte deste capítulo apresenta os resultados dos experimentos do acoplamento entre células e transitores.

O **capítulo 4** apresenta as conclusões desta tese e indica perspectivas futuras para a continuação desta linha de trabalho.

Capítulo 1

Fundamentos

Este capítulo irá introduzir os conceitos básicos sobre os processos de propagação de sinais elétricos nas células neurais e também os princípios físicos e de funcionamento de transistores de efeito de campo. Os detalhes sobre a modificação destes transistores com nanoestruturas metálicas e sua aplicação para o monitoramento de eventos sinápticos é também abordado. Desta maneira, a seção 1.1 apresentará os fundamentos sobre os neurônios e como ocorrem os potenciais de ação e eventos sinápticos com liberação de neurotransmissores. Na seção 1.2 será discutido os princípios físicos do efeito de campo na operação de capacitores e transistores, assim como sua aplicação como sensores químicos. Esta seção apresenta ainda a importância de desenvolver transistores com nanoestruturas metálicas em sua superfície. O acoplamento de células com transistores para análise de processos de adesão e monitoramento de sinais elétricos transmitidos pelas células é apresentado na seção 1.3. Por fim, a seção 1.4 descreve os objetivos deste trabalho.

1.1 Os Neurônios

Como já descrito na apresentação, as células neurais são consideradas os elementos fundamentais do sistema nervoso central (SNC), incluindo o cérebro e a medula espinhal. Os neurônios assim como as células cardíacas, são também conhecidos como células eletrôgenicas, ou seja, células que conduzem sinais elétricos por meio de íons e moléculas neurotransmissoras que fluem através da membrana celular. Distúrbios nesta atividade elétrica pode consequentemente resultar em disfunções fisiológicas que conduzem ao desenvolvimento de desordens neurológicas.^[8]

Os neurônios apresentam diferentes morfologias e tamanhos dependendo de suas funções e localização no sistema nervoso. A Figura 1.1 mostra uma ilustração genérica de um neurônio motor. Basicamente, este é formado por dezenas a centenas de dendritos, os quais atuam como


Figura 1.1 Ilustração da estrutura celular de um neurônio motor. A Figura foi adaptada da referência [7].

receptores de sinais vindos de outras células e transmitem estes para a soma (corpo), na qual o núcleo da célula está situado. A soma é então responsável pelo processamento dos sinais recebidos e transmite estes através do axônio, que pode apresentar comprimentos de mais de um metro. No caso de um neurônio motor, o axônio apresenta comprimentos desta magnitude e a sua principal função é atuar enviando sinais elétricos do cérebro para os músculos. Os axônios normalmente são cobertos com uma fina camada de lípidios, também conhecida como camada de mielina, a qual atua como um isolante elétrico. Em algumas partes, os axônios apresentam regiões não cobertas por esta camada e estas regiões são chamadas de nodos de Ranvier. A transmissão de sinais elétricos através de um axônio para outras células ocorre no que é conhecido também como um terminal sináptico. A sinapse é uma interconexão entre dois neurônios que permite com que íons sejam transportados de uma célula para outra.^[7,8,21] O mecanismo do processo de sinalização e os tipos de sinapses envolvidas serão descritos com mais detalhes nas próximas seções.

1.1.1 A Membrana Celular e o Potencial de Repouso

Um ponto importante a se considerar antes de se discutir os processos de sinalização é a membrana celular. Todas as células animais são formadas por uma membrana plasmática, na

qual seus principais constituintes são moléculas de fosfolipídios que juntas formam uma dupla camada com espessura entre 4 e 10 nm.^[8] Esta, a qual foi descrita através dos trabalhos de Singer e Nicholson como um mosaíco fluído, apresenta suas extremidades hidrofóbicas voltadas para o interior e as hidrofílicas voltadas para o meio extracelular e também para o citoplasma da célula.^[7,8] Encontram-se ainda na composição da membrana celular, proteínas integrais ou esféricas e glicídios ligados às proteínas (glicoproteínas) e também a certos lipídios (glicolipídios). Como uma bicamada lipídica, a membrana celular é semipermeável. Isto significa dizer que somente algumas moléculas ou íons podem atravessá-la. No caso de moléculas, estas podem ser tanto espécies relativamente pequenas como, por exemplo, alguns hormônios ou moléculas maiores de caráter lipofílico. Outras moléculas somente podem atravessar a membrana celular se certas moléculas transportadoras estiverem envolvidas. Portanto, dependendo da natureza da molécula, diferentes mecanismos de transporte que não consomem energia na forma de ATP, e transportes ativos, os quais envolvem um consumo de energia através da hidrólise do ATP.^[7,8]

Um tipo de proteína presente na membrana plasmática e que desempenha um papel crítico na função de células eletrogênicas como os neurônios, são as proteínas de canais de íons dependentes de voltagens (diferenças de potencial). Estas proteínas de canais de íons são seletivas a permeabilidade de íons como Na⁺, K⁺, Ca²⁺ e Cl⁻. A seletividade a estes íons é baseada nas configurações conformacionais adquiridas por estas proteínas, onde seus arranjos moleculares formam poros com tamanhos variáveis e que são dependentes da distribuíção de cargas nestes canais moleculares, que diferenciam os íons por seus estados de valência e seus tamanhos. Uma mudança na diferença de potencial elétrico próximo a estas proteínas pode fazer com que elas adotem uma configuração que permita o transporte de íons através da membrana celular.^[7,8,21] Um aspecto comum às células eletrogênicas é a diferença na concentração de íons no meio extracelular em comparação ao citosol. Por exemplo, a concentração de íons Na⁺ e Cl⁻ no fluído extracelular (~150 e ~120 mmol L⁻¹, respectivamente) é cerca de dez vezes maior do que no meio intracelular. A situação inverte-se para os íons de K⁺, os quais a concentração no citosol é de ~150 mmol L⁻¹, enquanto que no meio extracelular esta é apenas de ~ 5 mmol L⁻¹. ^[21] Este gradiente de cargas entre os meios intra e extracelular resulta em uma diferença de potencial elétrico através da membrana plasmática. Num estado considerado de repouso, isto é, quando os gradientes de cargas no citosol e no fluído extracelular estão em equílibrio e as células não estão transmitindo nenhum potencial de ação, a membrana celular é dita estar num potencial de repouso. No caso de neurônios este potencial é de cerca de -70 mV, enquanto que para células cardíacas este é de -90 mV e para adipócitos é de aproximadamente -40 mV.^[21]

Uma descrição da voltagem (V_m) desenvolvida através da membrana celular é dada pela seguinte equação formulada por Goldman-Hodgkin-Katz :

$$V_m = \frac{RT}{z_i F} ln \frac{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}}$$
(Eq. 1.1)

neste caso R corresponde a constante universal dos gases (8,314 472 J K⁻¹ mol⁻¹), enquanto T é a temperatura absoluta, z_i é a carga dos íons e F é constante de Faraday (96485 C mol⁻¹). O termo *P* representa a permeabilidade dos respectivos íons.^[21] Em 1952, Hodgkin e Huxley proporam, com base em suas observações experimentais, um circuito elétrico equivalente para explicar o transporte de íons através da membrana celular.^[4,5] Este é ilustrado na Figura 1.2 e descreve o comportamento elétrico da membrana por fontes de voltagem equivalentes ao potencial de equilíbrio (*E*_i) das espécies iônicas e por resistores com uma condutividade *G*_i proporcional a permeabilidade dos respectivos íons. Este modelo inclui ainda duas fontes de correntes iônicas, I_K^+ e I_{Na}^+ , as quais descrevem como a bomba de sódio-potássio pode contrabalancear e conduzir o gradiente de íons através da membrana celular a um estado de equilíbrio.^[4,5,21]



Figura 1.2 Ilustração do circuito elétrico equivalente para a membrana celular de um neurônio proposto por Hodgkin e Huxley. A Figura foi adaptada da referência [5].

O último elemento deste circuito é a capacitância da membrana lípidica (C_M). Esta bicamada lipídica é impermeável, mas pode ser carregada e descarregada assim como um capacitor. A capacitância específica desta membrana apresenta valores da ordem de 1 μ F cm⁻², enquanto a condutividade específica destas membranas possuindo proteínas pode variar de 1 S cm⁻² a 10⁻⁴ S cm⁻².^[21]

1.1.2 O Potencial de Ação

As grandes responsáveis por manter um equilíbrio entre os gradientes de íons dentro e fora das células são um grupo de protéinas presentes ao longo de toda membrana celular e que são conhecidas como bombas de sódio-potássio. Cada uma destas proteínas é responsável pelo transporte de dois íons de K⁺ para dentro da célula e três íons de Na⁺ para fora desta. Este fluxo estabelece uma distribuição particular de íons carregados positivamente através da membrana celular, com mais íons de Na⁺ fora das células e mais K⁺ dentro destas, como já mencionado anteriormente.^[7,8,21] Num estado de repouso, a diferenca de potencial através da membrana celular é praticamente constante, porém quando um estímulo externo é aplicado a esta, as proteínas de canais de íons dependentes de voltagem (também chamadas de gated ion channels proteins) são capazes de permitir o transporte passivo de íons Na⁺ para dentro das células. No caso de neurônios, se esta diferença de potencial exceder uma voltagem de limiar de - 60 mV a -55 mV, os canais de íons de Na⁺ são ditos estarem ativados e uma grande quantidade destes íons flui para o interior das células. Neste momento, a membrana celular passa por uma etapa chamada de despolarização. Esta despolarização faz com que canais de íons de K⁺ também começem a se abrir e permitam a saída destes íons para o meio extracelular. Se a etapa inicial de despolarização causar uma diferença de potencial suficientemente alta na membrana celular, outros canais de íons Na⁺ serão abertos e a despolarização irá se propagar ao longo da célula neural. A propagação desta diferença de potencial é chamada de um potencial de ação, que nada mais é do que um pulso de potencial elétrico viajando como uma onda através da célula. ^[7,8,21] A Figura 1.3A mostra uma ilustração esquemática da propagação de um potencial de ação pelo axônio de um neurônio.



Figura 1.3 A- Ilustração da propagação de um potencial de ação através do axônio de um neurônio. B- Representação do traço de potencial de membrana versus tempo para as diferentes fases de um potencial de ação conforme mostrado em A [22].

Uma vez que um potencial de membrana em torno de +40 mV é alcançado, os canais de Na⁺ começam a ser inativados, ou seja, o gradiente de potencial positivo faz com que os canais de Na⁺ se fechem evitando o influxo destes íons. Por outro lado, ao mesmo tempo canais de K⁺, os quais se abrem mais lentamente que os de Na⁺ continuam abertos e um largo efluxo destes íons para fora da célula continua ocorrendo em função do gradiente elétrico positivo dentro desta. Como os íons de K⁺ fluem agora para fora da célula, este movimento de cargas positivas causa um processo reverso no potencial de membrana tornando o gradiente elétrico no interior da célula novamente negativo. Em função dos canais de K⁺ fecharem-se mais lentamente, o potencial de repouso reestabelecido torna-se mais negativo do que em relação ao seu estado inicial. Neste momento dizemos que a célula sofre um processo de hiperpolarização. Logo após, os canais de potássio são inativados (fechados), mas o movimento destes íons através da membrana continua por meio de canais de ligação, os quais dominam neste instante o potencial

de membrana. Enquanto isso, a bomba de sódio-potássio continua com seu efluxo de íons de Na⁺ e seu influxo de íons de K⁺, evitando assim perdas devido a qualquer gradiente de íons. ^[21] Uma representação gráfica destas diferentes fases de um potencial de ação é demonstrada na Figura 1.3B.

1.1.3 A Transmissão Sináptica e o Processo de Exocitose

A Sinapse Elétrica

Durante a propagação de um potencial de ação, este viaja como uma onda ao longo do axônio até atingir sua extremidade, a qual também é chamada de um terminal sináptico. A transmissão deste sinal elétrico vindo através do axônio de um neurônio para o dendrito de outro neurônio pode ocorrer de duas maneiras, isto é, por meio de uma sinapse elétrica ou uma sinapse química. No caso de uma sinapse elétrica, a distância entre os terminais sinápticos separando as duas células é de aproximadamente 2 - 4 nm. Devido a esta pequena distância de separação, estes terminais estabelecem através de proteínas conhecidas como conexinas uma junção sináptica. As proteínas conexinas que compoem esta junção são agrupadas em cada célula por seis unidades monoméricas que formam hemicanais.^[8,21] A interação de um destes hemicanais de uma célula com outro hemicanal formado em outra célula forma, então, uma junção sináptica como demonstrado na Figura 1.4. Usualmente, centenas destas junções são estabelecidas durante este processo sináptico, o qual permite com que um fluxo direto de íons K⁺ provindos de um axônio seja transmitido através destes canais para a outra célula. O influxo destes íons no terminal pós-sináptico ativa desta forma um potencial de ação nesta célula. A propagação de sinais elétricos por meio destas sinapses é extremamente rápida e elas normalmente ocorrem em áreas do cérebro onde uma rápida comunicação interneural é necessária, como por exemplo, no sistema nervoso existente na retina.^[7,8,21]



Figura 1.4 Ilustração esquemática da formação de uma junção de sinapse elétrica. Nesta, seis unidades monoméricas da proteína conexina formam um conexón e os conexons de duas células forma uma junção sináptica. A Figura foi adaptada da referência [23].

A Sinapse Química

O outro modo de comunicação interneural é através da sinapse química. Nesta, a distância de separação entre as regiões pré e pós-sináptica é relativamente grande, sendo da ordem de 20 a 40 nm.^[24] Desta maneira, o sinal elétrico vindo do terminal pré-sináptico é convertido a um sinal químico, assim como demonstrado na Figura 1.5. O processo de sinapse química pode ser descrito basicamente através das seguintes etapas:

- A chegada de um potencial de ação até a região pré-sináptica do neurônio causa a despolarização da membrana celular e consequentemente a abertura de canais de íons Ca²⁺, os quais começam a fluir para dentro da célula aumentando portanto, sua concentração intracelular.
- 2. O aumento da concentração intracelular de íons Ca²⁺ faz com que estes íons ativem a fusão de vesículas contendo moléculas de neurotransmissores para a superfície da membrana celular. Neste momento, múltiplas interações entre proteínas da membrana celular e proteínas presentes na superfície das vesículas ocorrem e formam complexos conhecidos como

SNAREs (do inglês, *soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment receptors*), mantendo as vesículas em contato com a parede intracelular. A interação eletrostática de íons Ca^{2+} com estas proteínas faz com que as mesmas sofram mudanças de conformação e induzam a difusão das vesículas até a membrana celular.



Figura 1.5 Representação esquemática da transmissão sináptica em uma sinapse química. A Figura foi adaptada da referência [7].

- 3. A reorganização local da bicamada fosfolipídica conduz a formação de poros de fusão, os quais permitem com que as moléculas neurotransmissoras presentes dentro das vesículas sejam liberadas gradativamente através destes poros no meio extracelular do terminal sináptico.
- 4. A formação destes poros de fusão faz com que íons como Na⁺ e H₃O⁺ do meio extracelular difundam-se para o interior das vesículas, provocando assim o seu inchamento e consequentemente aumentando a tensão de Laplace na área de junção das membranas. Este aumento de tensão provoca então a expansão do poro de fusão, conduzindo à liberação de um grande fluxo de neurotransmissores no meio extracelular e a fusão completa da vesícula com a membrana plasmática.
- 5. As moléculas de neurotransmissores liberadas entre as regiões pré e pós-sinápticas podem interagir de forma não covalente com as proteínas de canais de íons presentes no terminal póssináptico, provocando então a abertura destes canais. Muitos tipos de canais existem nessas

regiões e, portanto a mudança de potencial resultante na célula pós-sináptica depende não somente do tipo de íon para o qual a membrana é permeável, mas também da quantidade de neurotransmissores presentes na região sináptica.

- 6. A despolarização da membrana celular (abertura de canais de íons) de um terminal póssináptico provoca uma mudança no seu potencial de membrana. Esta mudança pode ser tanto excitatória quanto inibitória.
- 7. Todos os potenciais excitatórios e inibitórios são somados na célula pós-sináptica, e caso o potencial resultante esteja acima de uma voltagem limiar um ou mais potenciais de ação podem ser gerados nesta célula.
- 8. A molécula neurotransmissora é então após esta, liberada e reabsorvida no terminal présináptico onde é novamente aprisionada em vesículas para futuros eventos de sinalização. Os processos sinápticos não são exclusivos dos neurônios e podem também ocorrer nos músculos e glândulas. ^[7,24,25]

1.1.4 Neurotransmissores e suas Funções

As substâncias consideradas neurotransmissoras são divididas em três grandes grupos, estes são: (1) alguns aminoácidos (ácido glutâmico, ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido aspártico e glicina), (2) peptídeos (vasopressina, neurotensina, etc), (3) monoaminas (norepinefrina, dopamina e serotonina) e ainda acetilcolina. Entre todos estes os mais abundantes encontrados no cérebro são o ácido glutâmico (também encontrado na forma de glutamato) e o GABA. As monoaminas e a acetilcolina realizam funções de modulações especializadas frequentemente confinadas à estruturas específicas. Enquanto os peptídeos por sua vez realizam funções especializadas no hipotálamo e atuam como cofatores em outras partes do cérebro.^[24] Na sequência serão descritos alguns neurotransmissores e suas principais funções.

<u>Acetilcolina</u>

A acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor descoberto e é o principal neurotransmissor do sistema nervoso periférico (SNP). A sua síntese ocorre na soma das células neurais a partir da colina e do acetil CoA, derivados do metabolismo da glicose através da enzima colina acetiltransferase, e é, então, posteriormente transportada ao longo do axônio para a região sináptica onde é conjugada para acetilcolina (Figura 1.6). Diferentemente da maioria dos neurotransmissores de monoamina, os quais atuam como inibidores, a acetilcolina usualmente atua como um neurotransmissor excitatório. As glândulas que recebem os impulsos da parte parasimpática do sistema nervoso autônomo são também estimuladas. Por isso, um aumento na concentração de acetilcolina durante a sinapse causa uma redução da frequência cardíaca e um aumento da produção de saliva. Em relação a outros neurotransmissores, o número de receptores de acetilcolina no cérebro é extremamente baixo, mas fora dele a acetilcolina liga-se aos seus receptores na fibras musculares, estas últimas sofrem contração.^[24]

<u>Ácido Glutâmico</u>

O ácido glutâmico (Figura 1.6) é o neurotransmissor mais comum no cérebro. Como os valores de pKa dos grupos carboxílicos do ácido glutâmico são menores do que o pH fisiológico (7,4), o ácido glutâmico encontra-se ionizado na forma de glutamato e atua sempre como um neurotransmissor excitatório, ou seja, a sua ligação com receptores no terminal pós-sináptico permite com que canais de íons se abram e espécies como Na⁺ fluam então para dentro deste terminal, transmitindo desta forma um potencial de ação para a outra célula. Entre todos os receptores de glutamato, o mais comum é o NMDA. Este é particularmente sensível aos efeitos de exocitotoxidade causada por um excesso de glutamato liberado durante a sinapse. Efeitos relacionados a essa toxidade são normalmente associados a problemas como isquemia. Como um mecanismo de autoreparo para toxicidade provocada por glutamato, os astrócitos (células glia) são capazes de absorver este neurotransmissor e convertê-lo a glutamina, a qual não é considerada uma espécie tóxica quando em excesso. A glutamina pode assim ser transportada novamente para os neurônios onde é então convertida a glutamato.^[8,24]

<u>Dopamina</u>

A dopamina (Figura 1.6) é um neurotransmissor que pertence ao grupo das monoaminas e é sintetizada em regiões do cérebro como a substância negra e a área tegmentária ventral a partir de L-dopa. Durante os processos sinápticos, a dopamina pode atuar tanto como um neurotransmissor excitatório como inibitório, desta forma amplificando ou suprimindo a propagação de um potencial de ação, respectivamente. O efeito amplificador ou inibidor depende da natureza do receptor pós-sináptico. Uma liberação de dopamina em excesso pode conduzir a um super estímulo dos neurônios controlando os músculos esqueléticos. Esta disfunção provocada por dopamina é associada às características de rigidez muscular desenvolvida por pessoas apresentando a doença de Parkinson. O processo de transmissão sináptica envolvendo dopamina pode ser artificialmente modulado através do uso de certas drogas. Por exemplo, as moléculas de cocaína são capazes de ligar-se e bloquear os receptores pré-sinápticos de dopamina, inibindo assim a reabsorção de dopamina dentro deste terminal. Este efeito é responsável, então, por um efeito de estimulação prolongada em certas áreas do cérebro causando o que é conhecido como experiência psicodélica.^[7,24]

<u>Serotonina</u>

A serotonina é também um neurotransmissor pertencente ao grupo das monoaminas, mas diferentemente das outras moléculas as quais são catecolaminas, a serotonina é uma indolamina (Figura 1.6).^[24] A serotonina é sintetizada em diferentes partes do cérebro a partir do triptofano transportado pela barreira hematoencefálica que controla a entrada de substâncias vindas do sangue para o sistema nervoso central. Em relação ao resto do corpo, somente 1-2% de serotonina encontra-se no cérebro, mas apesar desta baixa concentração, este neurotransmissor apresenta um papel importante em diversos aspectos incluindo a temperatura corporal, o apetite, a sexualidade e o ritmo circadiano (ciclo de dia e noite). Neste último ela desempenha uma função fundamental, pois a serotonina é a precursora para a síntese de melatonina. O ritmo circadiano dos mamíferos é regulado pelo hipótalamo em resposta à luz. Assim, ao anoitecer a produção de serotonina aumenta a formação de melatonina. Pelo contrário, ao amanhecer a

concentração desta última decai, pois a síntese de melatonina é inibida como uma resposta da exposição do hipotálamo a luz, e consecutivamente a concentração de serotonina aumenta. A redução de serotonina no ciclo circadiano é associada a senescência e a depressão.^[7,24]

As estruturas químicas destes quatro neurotransmissores discutidos nesta seção são mostradas na Figura 1.6.



Figura 1.6 Estruturas químicas dos respectivos neurotransmissores discutidos nesta sub-seção.

1.1.5 Monitoramento Eletrofisiológico

Como introduzido na apresentação, a análise do comportamento elétrico das membranas biológicas é convencionalmente realizada pela técnica de *patch-clamp*, a qual foi desenvolvida por Erwin Neher e Bert Sakmann na década de 70.^[6,21] A Figura 1.7 mostra uma ilustração esquemática do processo de *patch-clamp* conduzido com uma pipeta de vidro preenchida com uma solução de eletrólitos numa concentração equivalente a concentração de íons no meio intracelular. Diferentes tipos de configurações como, por exemplo, os modos de célula acoplada (do inglês, *cell attached*) e célula inteira (do inglês, *whole cell*), são utilizados para analisar os potenciais de membrana e correntes iônicas. O desenvolvimento destes diferentes tipos de configurações permite com que correntes geradas em toda a célula, assim como em um único canal de íons possa ser detectado. Além disso, medidas de *patch*-capacitância permitem, ainda, a análise das variações na capacitância da membrana celular durante um potencial de ação.^[26] No

caso da configuração de célula inteira, esta permite com que substâncias sejam injetadas através de uma micropipeta no citoplasma das células, possibilitando assim a análise de efeitos farmacológicos nestas. Esta última é de extrema importância, especialmente para o estudo do efeito de diferentes moléculas na transmissão sináptica onde como descrito previamente, neurotransmissores são liberados através de vesículas, sendo posteriormente captados pela região pós-sináptica de outra célula e desta forma podem transferir sinais elétricos entre estas.²¹



Figura 1.7 Ilustração básica da técnica de *patch-clamp*. Nesta, a micropipeta de vidro preenchida com eletrólitos é colocada em contato com a membrana celular e através da ruptura desta as correntes dos canais de íons são então registradas. A Figura foi adaptada da referência [27].

A análise desses processos sinápticos de exocitose (liberação de neurotransmissores) é usualmente realizada por meio da técnica de *patch*-amperometria, a qual é muito similar a técnica de *patch-clamp*, mas neste caso uma microfibra de carbono que atua como um microeletrodo é inserida dentro de uma micropipeta de vidro preenchida com uma solução iônica.⁷ Assim, ao passo que a micropipeta é acoplada a membrana celular em uma região pré ou

pós-sináptica, ela pode romper a membrana e coletar as moléculas neurotransmissoras para seu interior e estas podem então ser detectadas através de medidas amperométricas empregando-se a microfibra de carbono. Alternativamente, muitos pesquisadores preferem utilizar somente a microfibra de carbono, e aproximam estas da membrana celular para realizar a detecção amperométrica de neurotransmissores que são eletroquímicamente ativos.^[28,29] Embora factível, a análise experimental desses processos em células neurais *in vitro* requer a formação das regiões sinápticas, as quais normalmente começam a ocorrer após 15 dias do início do crescimento celular.^[21] Além disso, as regiões sinápticas possuem dimensões submicrométricas, o que torna difícil sua visualização em microscópios ópticos convencionais.

1.1.6 Modelos de Células Neurais

Devido a estas dificuldades em analisar eventos sinápticos em células neurais, outros tipos de células consideradas modelos para análises de processos de exocitose são normalmente empregadas. Estas, as quais não formam junções sinápticas, possuem vesículas relativamente grandes (0,25-1 μ m em diâmetro) em comparação às vesículas das células neurais (~20-50 nm em diâmetro) e consequentemente possuem também uma concentração relativamente maior de neurotransmissores.^[25,29] Entre alguns exemplos destas células modelos incluem-se, as cromafinas do sistema adrenal (provindas de bovinos, camundongos e humanos), as quais liberam uma mistura de catecolaminas como adrenalina, noradrenalina e dopamina. Os mastócitos de camundongos normais ou beges (liberam serotonina e histamina), as células beta do pâncreas de camundongos ou humanos e células enterocromafinas de íleos de cobaia as quais liberam serotonina.^[25] Além destas, outra linhagem celular também conhecida pela sigla PC12 (do inglês, pheochromocytoma), é comumente utilizada como um modelo para a análise de processos de exocitose em neurônios.^[30,31] Estas células são derivadas embriologicamente de glândulas adrenais cancerosas de ratos, das quais foram clonadas e expostas a fatores de crescimento neurais. As células PC12 são capazes de manifestar diversas características similares às células neurais, tais como a liberação de neurotransmissores (dopamina) a partir da despolarização da membrana celular, diferenciação e formação de axônios e dendritos quando co-cultivadas com fatores de crescimento neurais.^[32] Em comparação aos neurônios, estas células crescem e se reproduzem rapidamente de modo que em cerca 3-4 dias são capazes de

formar camadas confluentes e promover a exocitose de neurotransmissores. Devido estas características, estas células são usualmente utilizadas como células modelo na análise de processos de exocitose envolvendo a conformação de complexos protéicos na membrana celular, a fusão de vesículas nestes e a liberação de moléculas neurotransmissoras.^[25,32,33] Estes processos são basicamente analisados pelas técnicas amperométricas descritas anteriormente. Estas, as quais ainda possam detectar estes neurotransmissores com certa resolução espacial em uma única célula são, no entanto limitadas quanto a medidas múltiplas simultâneas e também medidas durante longos períodos sem danificar a membrana celular, como no caso da técnica de *patch*-amperometria.

Uma solução alternativa para a análise de tais processos são medidas empregando transistores de efeito de campo ou FETs (do inglês, *field effect transistors*), os quais devido a sua maior sensibilidade para a detecção de pequenas mudanças no potencial de superfície, são considerados ferramentas promissoras no estudo do comportamento elétrico de células eletrogênicas e seus processos sinápticos.^[12] Desta maneira, na próxima seção serão introduzidos alguns conceitos fundamentais sobre FETs e como estes podem ser explorados no estudo de processos de exocitose.

1.2 Transistores de Efeito de Campo

Os transistores são dispositivos bem conhecidos da indústria da microeletrônica, sendo considerados os elementos essênciais dos circuitos integrados (ICs).^[34] A Figura 1.8 mostra uma ilustração da estrutura básica de um FET, o qual consiste num substrato usualmente de silício (tipo p ou n) contendo duas regiões denominadas de fonte e dreno altamente dopadas com ³¹P⁺ (dopante tipo n) ou B⁺ (dopante tipo p), que são separadas por uma distância que é definida durante os processos de fabricação e que é chamada de região de porta. No topo desta região uma fina camada de óxido (normalmente SiO₂) cobre a sua superfície, enquanto um eletrodo metálico é depositado sobre este óxido, assim como também sobre as áreas de fonte e dreno (sem formar curto-circuito) para produzir contato elétrico nestas.^[34] Transistores com esta configuração são também conhecidos como MOSFETs (do inglês, *metal-oxide-semiconductor field effect transistors*).



Figura 1.8 Ilustração esquemática de um transistor do tipo MOSFET. Durante o funcionamento deste transistor os terminais de fonte e dreno são polarizados através de uma voltagem V_{DS} , enquanto uma diferença de potencial V_{GS} é aplicada entre a fonte e o eletrodo de porta.

O princípio de funcionamento de um MOSFET é baseado nas propriedades físicas do semicondutor utilizado em sua construção. Portanto, para uma melhor compreensão a respeito do seu funcionamento elétrico, alguns conceitos básicos sobre a física do estado sólido e a modulação elétrica destes dispositivos através de campos externos devem ser previamente considerados. A próxima subseção descreve estes conceitos considerando um capacitor metal-óxido-semicondutor.

1.2.1 O Capacitor Metal-Óxido-Semicondutor

A região de porta de um MOSFET pode ser descrita e compreendida de forma mais simplificada como um capacitor com uma configuração metal-óxido-semicondutor ou capacitor MOS (do inglês, *metal-oxide-semiconductor*), assim como demonstrado na Figura 1.9A. O diagrama de energia para o respectivo MOS formado por um semicondutor tipo p sem tensão aplicada no metal (V = 0 V) é mostrado na Figura 1.9B.^[34]



Figura 1.9 A - Estrutura física de um capacitor do tipo MOS. B - Diagrama de bandas de energia para o respectivo capacitor mostrado em A. Os termos do diagrama são definidos no texto.

Neste diagrama, as cargas na interface Si/SiO₂ e no óxido são ignoradas e as funções trabalho do metal e do semicondutor são ditas estarem alinhadas, ou seja, a diferença de energia (Φ_{MS}) entre elas é zero, conforme demonstrado através da seguinte Equação:

$$\Phi_{MS} = (\Phi_M - \Phi_S) = \Phi_M - \left(q\chi + \frac{E_g}{2} + q\psi_B\right) = 0$$
 (Eq. 1.2)

Nesta, a soma dos três itens entre parêntesis representa a função trabalho do semicondutor, onde o termo q χ representa o parâmetro de eletroafinidade, o qual é a diferença de energia entre a banda de condução e o nível de vácuo, ao passo que o fator q ψ_B que representa a diferença de energia entre o nível de Fermi e o nível de Fermi intrínseco (E_i). O termo E_g corresponde ao hiato de energia (*band gap*) do semicondutor. Esta condição, onde as bandas do semicondutor estão horizontalmente tocando as bandas do óxido, é também conhecida como condição de banda plana. Assim, as únicas cargas que existem no MOS sob condições de polarização são aquelas no semicondutor e aquelas iguais mas de sinal oposto na superfície do metal adjacente ao óxido.^[34]

Caso o capacitor MOS seja polarizado com tensões positivas ou negativas, três casos podem ocorrer na superfície deste semicondutor do tipo p. Estes são:

 Se uma tensão menor do que 0 V (V < 0) for aplicada ao metal, esta causará um aumento na diferença de energia entre E_F e E_i e um excesso de portadores de cargas positivas (lacunas) irão se acumular na interface Si/SiO₂. Neste caso, as bandas próximas a superfície do semicondutor serão curvadas para cima como mostrado na Figura 1.10A. Como para um MOS ideal nenhuma corrente flui independentemente da tensão aplicada, o nível de Fermi no semicondutor permanecerá constante e um caso de acumulação é então estabelecido.

- 2) Se uma pequena tensão positiva (V > 0) é aplicada ao MOS, as bandas de energia próximas a superfície do semicondutor serão curvadas para baixo e a maioria dos portadores são depletados, formando assim uma região de espaço de carga (space charge region) conforme mostrado na Figura 1.10B. Esta condição é também conhecida como caso de depleção.
- 3) Se esta tensão for aumentada ainda mais, as bandas de energia se curvarão ainda mais para baixo, de modo que o nível de Fermi intrínseco na superfície irá cruzar o nível de Fermi, assim como mostrado na Figura 1.10C. Isto significa que tensões positivas começam a induzir um excesso de cargas negativas (elétrons) na interface Si/SiO₂. Neste caso, tem-se que E_F- E_i > 0, ou seja, a concentração de elétrons (portadores minoritários)



Figura 1.10 Variação das bandas de energia durante a polarização de um MOS (semicondutor tipo p) apresentando os casos de: (A) acumulação, (B) depleção e (C) inversão. Em todos os diagramas os termos E_C e E_V correspondem as energias das bandas de condução e valência do silício, respectivamente. O termo E_i representa a energia do nível de Fermi intrínsico do silício e E_F é o nível de Fermi atual de ambos, silício e metal. A Figura foi adaptada da referência [34].

na superfície é maior do que as lacunas (portadores majoritários), estabelecendo-se então a condição conhecida como inversão.

A Figura 1.11 ilustra curvas de capacitância versus voltagem em baixa e alta frequência para este capacitor MOS. Para um caso considerado ideal, na condição de acumulação a capacitância do sistema MOS é igual a capacitância do óxido (C_{ox}). A medida que a voltagem aplicada migra da região de acumulação para a região de depleção, a capacitância da superfície começa a diminuir devido a formação da região de espaço de carga, a qual atua como um capacitor (com menor capacitância) em série com C_{ox} . No início da região de inversão, a capacitância da curva a baixa frequência apresenta um aumento equivalente a capacitância do óxido. Esta ocorre devido a eventos de carga e descarga decorrentes de processos de geração e recombinação de portadores minoritários na interface Si/SiO₂. Por outro lado, a capacitância da curva em alta frequência permanece baixa e quase constante, pois os processos de geração de portadores minoritários a altas frequências.^[34]



Figura 1.11 Curvas de capacitância versus voltagem em alta e baixa frequência para um capacitor MOS ideal. Em ambas curvas a capacitância do óxido C_{ox} é determinada na região de acumulação. A Figura foi adaptada da referência [35].

1.2.2 FETs – Modos de Operação

Baseado nos conceitos descritos na subseção anterior é possível agora avaliar o comportamento elétrico de transistores como MOSFETs. Uma característica fundamental dos transistores de efeito de campo é a sua alta sensibilidade elétrica para mudanças de voltagens aplicadas através do eletrodo de porta. Isto é, como demonstrado através do capacitor MOS, pequenas mudanças no potencial aplicado na porta do transistor são responsáveis por uma variação do campo elétrico atuando na direção perpendicular da fina camada de óxido cobrindo sua porta. Esta mudança pode, portanto, dependendo do tipo de transistor e da polarização aplicada, resultar em regiões de acumulação, depleção ou mesmo inversão no semicondutor integrando a porta do transistor.^[34,36] Assim, considerando-se o transistor p-FET ilustrado na Figura 1.8, este possui quatro terminais de contatos elétricos, sendo dois deles para fonte e dreno, um para o eletrodo de porta e um quarto terminal para o substrato de silício, o qual é conectado junto a fonte do dispositivo. A aplicação de um potencial (V_{GS}) negativo no eletrodo de porta resulta num fluxo de elétrons em direção oposta a porta do transistor e num fluxo de lacunas entre as regiões de fonte e dreno, estabelecendo-se assim uma região de depleção na porta do dispositivo. Caso esse potencial aplicado alcance um valor crítico, também conhecido como voltagem de limiar (V_T), uma área com uma forte inversão (alta concentração de lacunas) dos portadores de carga é estabelecida na porta do transistor. Para o caso de um transistor n-FET esta área de inversão é dominada por elétrons. A aplicação de uma diferença de potencial V_{DS} entre os terminais de fonte e dreno faz com que esta camada de inversão gere um canal condutor no qual uma corrente I_{DS} entre fonte e dreno possa fluir. Sem a formação deste canal condutor o transistor não opera, isto pois, o caminho entre a fonte e o dreno apresenta uma resistência da ordem de $10^{12} \Omega$. A magnitude de I_{DS} pode ser ajustada pelos potenciais aplicados em V_{GS} e V_{DS}, daí o nome transistor de efeito de campo.^[36]

Como a corrente I_{DS} é uma função das voltagens de V_{GS} e V_{DS} , os transistores exibem duas características: A característica de saída, onde curvas de I_{DS} versus V_{DS} em um potencial constante são registradas em função de diferentes valores de V_{GS} e a característica de transferência, onde curvas de I_{DS} versus V_{GS} constante são registradas enquanto diferentes valores de V_{DS} são aplicados entre fonte e dreno. A Figura 1.12 mostra as curvas típicas de saída e transferência de um p-FET e as respectivas mudanças no canal de condução do transistor. Considerando as características de saída (Figura 1.12A), quando V_{DS} e V_{GS} são iguais a 0 V nenhuma corrente flui e o dispositivo é dito estar num ponto de operação (I). A aplicação de uma tensão de V_{GS} negativa e uma tensão de V_{DS} também negativa mas relativamente baixa induz a formação de uma camada de inversão e consequentemente de um canal de condução entre fonte e dreno. Nestas condições de V_{GS} e V_{DS} este canal se comporta como um simples resistor apresentando uma relação linear entre a corrente de I_{DS} e V_{DS} . Esta região de operação entre o ponto (I) e o ponto (II), onde 0 < $V_{DS} \le V_{GS} - V_T$, é chamada de região linear e pode ser modelada com a seguinte Equação:^[36]

$$I_{DS} = \beta [2(V_{GS} - V_T)V_{DS} - V_{DS}^2]$$
(Eq. 1.3)

sendo β um parâmetro de sensibilidade do transistor, descrito através de

$$\beta = \mu C_{\text{ox}} \frac{W}{L}$$
 (Eq. 1.4)

onde μ é a mobilidade das lacunas (ou elétrons no caso de um n-FET) na camada de inversão e W/L é a razão entre comprimento e amplitude do canal condutor.



Figura 1.12 A – Curvas de características de saída hipotéticas (lado esquerdo) de um transistor pMOS. As ilustrações do lado direito mostram o comportamento elétrico no respectivo transistor durante as diferentes fases das curvas de saída. I) Uma camada de inversão é formada na porta do FET, mas não há uma corrente fluindo entre fonte e dreno. II) Mudança em I_{DS} no ponto de operação do FET como consequência do fenômeno de pinch-off. III) Transistor operando na região de saturação. B - Curvas de características de transferência hipotéticas para o respectivo pMOS.

Aumentando a magnitude de V_{DS} resulta em uma queda de tensão na extensão do canal e consecutivamente o valor de I_{DS} não se altera mais, permanecendo assim constante. Isto ocorre

devido a um efeito conhecido como pinch-off, o qual é na verdade um estrangulamento do canal no sentido da fonte para o dreno. Nesta condição tem-se que $V_{DS} > V_{GS} - V_T$ e o transistor é dito estar operando num regime de saturação (III). Neste ponto a corrente I_{DS} é modelada com a seguinte Equação:^[36]

$$I_{DS} = \beta (V_{GS} - V_T)^2$$
 (Eq. 1.5)

O leve aumento na corrente de I_{DS} na região de saturação é causado pela presença de uma região de depleção ao redor do ponto de pinch-off na região do dreno. Com o aumento de V_{DS} , o comprimento desta região de depleção muda e por sua vez afeta a corrente no canal. Este efeito é fatorado na Equação 1.6 pela voltagem de V_{DS} e um fator de escalamento chamado voltagem de Early (V_A):

$$I_{DS} = \beta (V_{GS} - V_T)^2 (1 + \frac{V_{DS}}{V_A})$$
(Eq. 1.6)

Da mesma forma que as características de saída, as curvas das características de transferência também exibem um regime linear e um regime de saturação. Em uma situação onde $V_{GS} > V_T$, a corrente de I_{DS} claramente aumenta de forma linear com o aumento de V_{DS} . Todavia, quando V_{DS} excede $V_{GS} - V_T$, a voltagem no dreno é menor do que a voltagem de limiar para a condição de inversão. Consequentemente, a região de inversão torna-se mais curta do que o comprimento do canal de condução. Um aumento adicional em V_{DS} ocasiona um encurtamento ainda maior na região de inversão. Este efeito resulta na saturação da corrente de I_{DS} devido aos aumentos de V_{DS} serem compensados pela alta resistência existente no canal de inversão. A partir destas curvas de características, um parâmetro muito importante que é a transcondutância ou ganho g_m pode ser extraído. Esta, a qual pode ser obtida pela diferenciação parcial da Equação 1.7, representa o quanto uma corrente I_{DS} pode variar em função de uma mudança em $V_{GS} - V_T$.^[34-36]

$$g_{\rm m} = \frac{\partial I_{DS}}{\partial V_{GS}} = \beta \left(V_{\rm GS} - V_{\rm T} \right) \tag{Eq. 1.7}$$

Curvas típicas de g_m versus V_{GS} para valores constantes de V_{DS} são mostradas na Figura 1.13. Seguindo as características de transferência, os valores de g_m aumentam na primeira metade do seu regime linear até o seu máximo e depois diminuem quando o regime de saturação é alcançado.^[36]



Figura 1.13 Curvas de transcondutância hipotéticas de um transistor pMOS.

Estes mesmos conceitos descritos até aqui são também aplicados para a compreensão do funcionamento de outro tipo de FET amplamente empregado como sensor químico, o transistor de efeito de campo sensível a íons. Os detalhes deste tipo de transistor serão introduzidos na próxima subseção.

1.2.3 Transistores de Efeito de Campo Sensíveis a Íons

Transistores como MOSFETs já são conhecidos desde 1950, porém em 1970 o holandês Piet Bergveld sugeriu que os transistores de efeito de campo poderiam também ser configurados como sensores ou biossensores. O princípio de detecção utilizando-se estes seria então baseado no efeito de campo gerado por espécies químicas elétricamente carregadas na superfície do transistor.^[12] A este novo tipo de sensor, Bergveld atribuiu o nome de transistor de efeito de campo sensível a íons ou ISFET (do inglês, *ion-sensitive field effect transistor*).^[37]

Uma ilustração de um típico ISFET é mostrada na Figura 1.14. Em termos de estrutura física, os ISFETs diferem dos MOSFETs convencionais por não possuirem uma camada metálica

em suas portas e por terem suas regiões de fonte e dreno isoladas elétricamente com um óxido de campo que limita os sinais capacitivos do transistor a serem provindos apenas de sua região de porta. Em termos de funcionamento elétrico, durante a operação do ISFET a voltagem de V_{GS} é



Figura 1.14 Ilustração esquemática de um transistor de efeito de campo sensível a íons.

aplicada através do óxido de porta por meio da fonte e da solução de eletrólito cobrindo a superfície do transistor. Da mesma forma que num MOSFET, em um ISFET a voltagem V_{GS} controla a densidade de lacunas (p-FETs) ou elétrons (n-FET) na porta do transistor. Como a densidade destes portadores de carga determina a resistência do canal de condução formado entre fonte e dreno, a corrente I_{DS} é altamente dependente de V_{GS} . O contato elétrico com a solução eletrolítica é realizado através de um eletrodo de referência convencional como Ag/AgCl e o potencial na superfície do transistor é medido em relação a este. Como não ocorre nenhuma reação faradáica entre a solução eletrolítica e o semicondutor na porta do transistor, este tipo de dispositivo é caracterizado como um sensor potenciométrico, de modo que sua resposta analítica segue a Equação de Nernst:

$$E = \text{const.} + \frac{RT}{nF} \ln a_i$$
 (Eq. 1.8)

Esta, indica que a diferença de potencial registrada entre dois eletrodos é devido à formação de uma dupla camada elétrica devido aos íons presentes em sua superfície, e a soma da queda de potencial dentro desta em cada uma das junções dos respectivos eletrodos.

Foi baseando-se nestes princípios que Bergveld originalmente propôs medir os potenciais de ação do meio extracelular neuronal.^[12] O mecanismo básico para a detecção de sinais eletrofisiológicos usando um ISFET é baseado nos mesmos princípios de resposta elétrica de um MOSFET, ou seja, uma tensão V_{DS} é aplicada entre fonte e dreno ao passo que, simultaneamente a corrente I_{DS} na porta é modulada por uma tensão externa que é gerada pelo potencial de membrana. Assim, dependendo dos processos de despolarização e hiperpolarização da membrana celular, estes acarretarão em uma depleção ou acumulação de portadores (lacunas ou elétrons livres) na superfície e consequentemente haverá uma redução ou aumento da corrente na porta do transistor. Desde as publicações pioneiras de Bergveld na década de 70 descrevendo esses experimentos, este mesmo princípio tem sido aplicado até hoje na análise de potenciais de ação não só de neurônios como também de células cardíacas.^[13-15] Adicionalmente, ao longo desses anos os ISFETs foram também aplicados como biossensores na detecção de uma ampla gama de processos como por exemplo hibridização de moléculas de DNA, reconhecimento de antígenos por antícorpos e detecção de moléculas pequenas como a uréia.^[16-18,38] O emprego destes dispositivos tanto para a análise de processos envolvendo células eletrogênicas, como para biossensores moleculares, tem como vantagem em relação a outras técnicas eletroquímicas ou ópticas, a sua capacidade de miniaturização e integração de múltiplos dispositivos funcionando simultâneamente.

1.2.4 ISFETs Nanoestruturados

Como descrito até o momento, os ISFETs são sensores nos quais o seu funcionamento é baseado nas características capacitivas de suas portas. Todavia, como um efeito de sua miniaturização para torná-los práticos na análise de células com resolução espacial, suas áreas superficiais e, portanto suas capacitâncias também tendem a diminuir, o que limita assim sua habilidade de monitorar processos envolvendo pequenas mudanças de potencial na superfície.^[38] Uma alternativa para contornar esta limitação, é o emprego de transistores com portas apresentando estruturas metálicas em escala nanométrica em sua superfície. O emprego de tal

configuração oferece uma série de vantagens em relação aos ISFETs convencionais contendo apenas SiO₂ em suas portas, estas são: i) estruturas metálicas apresentam maior capacitância em relação a outros materiais como óxidos ou semicondutores, ii) estruturas metálicas em escala nanométrica tais como nanopartículas possuem uma alta razão de superfície/volume, portanto aumentando a área superficial da porta, iii) as nanoestruturas metálicas podem servir como suportes para a imobilização de moléculas que interagem com outras espécies através do sistema receptor-doador, iv) devido a grande parte dos átomos nas nanoestruturas metálicas estarem em sua superfície, estas apresentam uma maior sensibilidade a pequenas variações eletrostáticas, sendo que a imobilização de moléculas através de ligação covalente ou adsorção física nestas muda a sua diferença de função trabalho em relação ao semicondutor e muda portanto a voltagem de limiar do transistor.

O primeiro trabalho utilizando ISFETs com este tipo de configuração foi reportado por Lundström *et al.*, os quais empregaram uma fina camada de paládio (Pd) no topo de um ISFET com o intuíto de detectar hidrogênio molecular (H₂).^[39] Os autores mostraram que durante o seu processo de adsorção na superfície de Pd, o H₂ sofre dissociação e os átomos de hidrogênio resultantes difundem-se através do Pd com um momento de dipolo que altera a função trabalho do metal e que consequentemente altera também o termo Φ_{MS} (diferença de função trabalho entre o metal e o semicondutor) no transistor. Esta alteração é responsável portanto pela mudança na tensão de limiar do ISFET, e sua magnitude depende do número de sítios de adsorção disponíveis por unidade de área na superfície de Pd.^[39,40]

Neste momento é importante considerar que o emprego de nanoestruturas metálicas como nanopartículas na superfície dos ISFETs é fundamental para este princípio de detecção baseado na mudança de função trabalho do metal. Isto pois, devido as pequenas dimensões destes cristais, os quais os tamanhos são comparáveis a algumas espécies moleculares e também devido a grande parte de seus átomos estarem em sua superfície (especialmente para partículas com diâmetro < 30 nm), os momentos de dipolo elétrico destas nanopartículas são extremamente sensíveis a pequenas variações eletrostáticas no ambiente ao seu redor.^[41-44] Estas variações podem assim mudar a magnitude da função trabalho do nanocristal como um todo. Por outro lado, caso um filme metálico com espessura ≥ 100 nm fosse utilizado na porta do FET, as pequenas variações de potencial eletrostático em sua superfície não afetariam o campo elétrico no semicondutor devido ao efeito de *screening* do metal que é relativamente espesso.^[44] Para a

adsorção física ou ligação covalente de moléculas/íons sobre partículas com diâmetros de poucas dezenas de nanometros, a mudança da função trabalho ($\Delta \Phi_M$) nestas nanoestruturas pode ser interpretada em termos de uma mudança no seu dipolo de superfície ($\Delta \mu$) através da seguinte relação eletrostática:^[45]

$$\Delta \Phi_M = \frac{e\Delta\mu}{A\varepsilon_0} \tag{Eq. 1.9}$$

Nesta, *e* representa a carga do elétron e *A* é a área ocupada por uma molécula/íon na superfície de um nanocristal. Como a eletronegatividade de uma superfície metálica é dada pela sua função trabalho, é importante considerar que a adsorção ou ligação química de uma espécie nesta superfície irá induzir a formação de uma camada dipolar superfícial, a qual é resultante da repulsão de Pauli entre elétrons da espécie química e da superfície do metal. O componente vetorial μ deste dipolo pode então estar direcionado no sentido do metal conduzindo assim a um decréscimo da barreira de potencial de superfície e portanto diminuindo a função trabalho do metal. Caso o componente vetorial μ deste dipolo esteja direcionado para o vácuo o efeito contrário é observado. Assim, o termo $\Delta \mu$ é dito ser uma função do momento de dipolo da espécie química não imobilizada na superfície metálica (μ_{es}) e da reorganização de dipolos no metal e na molécula (μ_{sur}) durante a imobilização desta, sendo portanto escrito como:^[45]

$$\Delta \mu = \mu_{\rm es} + \mu_{\rm sur} \tag{Eq. 1.10}$$

A mudança do termo Φ_{MS} em função da alteração da função trabalho do metal tem uma relação direta com a voltagem de limiar do transistor (V_T) conforme mostrado através da seguinte Equação:^[34]

$$V_{\rm T} = \Phi_M - \Phi_S - \frac{E_g}{2} + E_{\rm F} + \frac{(4\epsilon_S q N_A E_F)^{1/2}}{\epsilon_{ox}} W_{\rm ox} + \frac{\sigma_S}{\epsilon_{ox}} W_{\rm ox}$$
(Eq. 1.11)

onde N_A é a concentração de portadores majoritários no canal de condução no substrato de silício, ϵ_S e ϵ_{ox} correspondem as permissividades dielétricas do silício e de seu óxido (SiO₂) respectivamente. O termo W_{ox} é a espessura da camada óxido e σ_S é a densidade de cargas no

óxido responsável pelo estados de superfície. Mudanças na voltagem de limiar dos transistores como uma consequência da alteração da função trabalho do metal são claramente observáveis através de curvas de características de transferência dos FETs, assim como mostrado na Figura 1.15. A alteração em V_T gera consequentemente uma variação em V_{GS} e em I_{DS} , e estas variações podem assim serem utilizadas como parâmetros para a detecção de um determinado analíto ou evento químico ocorrendo na superfície dos transistores.



Figura 1.15 Curvas de características de transferência hipotéticas mostrando a variação em V_T de um ISFET antes (V_{T1}) e após (V_{T2}) a mudança de função trabalho de partículas metálicas cobrindo a sua superfície.

1.2.4.1 Nanoestruturas de Ouro

Outro aspecto importante a ser considerado é o tipo de metal a ser utilizado na porta dos FETs. Nanoestruturas de metais nobres, tais como ouro (Au) os quais são considerados termodinamicamente mais estáveis, demonstram-se ferramentas alternativas e promissoras para aplicações utilizando ISFETs com este tipo de configuração. A função trabalho do Au é de 5,4 eV mas esta pode ser modificada pela formação de dipolos interfaciais localizados devido a adsorção de espécies químicas na sua superfície.^[34,45] Como descrito anteriormente, a imobilização de moléculas nestas superfícies metálicas podem conduzir a um aumento ou decréscimo da função trabalho do metal, dependendo da direção do componente vetorial do dipolo formado.^[45]

Um típico exemplo e também um dos mais proeminentes para aplicação deste princípio na área de sensores é o uso destas nanoestruturas como suportes para a imobilização de espécies químicas e biológicas através de grupos tióis (-SH), o que não ocorre com a mesma afinidade com os demais metais.^[46] Nestas imobilizações o átomo de enxofre da molécula de tiol forma uma ligação covalente estável na superfície de Au, enquanto o resto da cadeia carbônica da molécula se organiza na direção vertical de forma compacta com as outras moléculas adjacentes, formando assim uma monocamada auto-organizada ou SAM (do inglês, *self-assembled monolayer*).^[46] A mudança da função trabalho do metal devido a imobilização de moléculas desta natureza são atribuídas principalmente aos momentos de dipolo da molécula não imobilização de mudar a função trabalho de superfícies de Au (111) e outros metais nobres em até 2 eV.^[45]

1.2.4.2 Alumina Anódica Porosa

Um problema prático é o crescimento e/ou imobilização de nanopartículas de Au com a superfície livre de espécies químicas na porta dos transistores. A maioria das partículas disponíveis comercialmente são recobertas com moléculas orgânicas que são difíceis de serem removidas. Uma solução alternativa para esta limitação é o emprego de finas camadas de alumina (Al₂O₃) anódica porosa, as quais se produzidas sobre a superfície dos transistores seus poros podem atuar como moldes para o crescimento de nanopartículas no topo destes. Dependendo do processo de síntese e crescimento das partículas, estas podem então apresentar uma superfície com um mínimo possível de impurezas.^[47]

A alumina anódica porosa já é conhecida por suas aplicações industriais na área de revestimentos a mais de um século.^[48] Este óxido de alumínio como é conhecido, é produzido pela oxidação eletrolítica do alumínio. Neste caso, o óxido formado apresenta uma estrutura geométrica diferenciada daquela produzida simplesmente por reações químicas. Isto é, a anodização de alumínio em meio ácido conduz ao crescimento e formação de uma camada de óxido altamente porosa, com poros apresentando diâmetros nanométricos crescendo na direção perpendicular ao substrato (Figura 1.16). O diâmetro e a altura destes poros demonstram-se bastante uniformes e podem ser controlados variando-se as condições de anodização.^[49] Uma



Figura 1.16 Ilustração da estrutura geral de uma camada de alumina crescida anódicamente sobre um substrato de alumínio.

importante consideração em relação ao processo de anodização é o pH do eletrólito utilizado. Anodizações realizadas em pHs próximos da neutralidade tendem a formar filmes compactados e pouco porosos, ao passo que anodizações em meios mais ácidos (pH < 3) conduz a formação de filmes com uma alta densidade de poros.^[48,50]

Apesar da formação de filmes finos (espessura < 100 nm) de alumina anódica sobre os ISFETs ser algo ainda novo e pouco explorado na área de sensores, estes apresentam uma série de características interessantes que se demonstram vantajosas em relação a superfícies planas e não porosas. Por exemplo, a formação de filmes finos de alumina anódica gera superfícies tridimensionais (3D), onde agora os efeitos eletrostáticos na porta dos transistores são dominados não só no topo da superfície deste óxido, mas também nas paredes dos poros.⁵¹ O aumento da área superfícial também representa uma vantagem para a aplicação destes dispositivos como sensores, pois ele possibilita com que uma maior quantidade de espécies possam ser imobilizadas em sua superfície. Além disso, a produção de camadas porosas gera superfícies com uma alta rugosidade (> 10 nm) o que permite uma melhor adesão celular sobre os dispositivos. Todas as observações mencionadas no ítem 1.2.4.1 e também neste são relevantes para o próximo tópico, o qual apresentará os conceitos básicos da interface sólido-líquido e os efeitos da dupla camada elétrica na superfície de nanoestruturas.

1.2.5 A Interface Sólido-Líquido

Quando um sólido formado por um óxido e/ou um metal é imerso em um solvente polar como água, a sua superfície irá desenvolver uma densidade de cargas estratificada dando origem

assim ao que é conhecido como uma dupla camada elétrica (DCE). A formação da DCE pode ocorrer devido aos seguintes mecanismos:^[52]

- (1) Adsorção preferencial de íons na superfície
- (2) Dissociação e ionização de grupos funcionais presentes na superfície
- (3) Substituição isomórfica de íons
- (4) Acúmulo ou depleção de elétrons na superfície

O modelo mais simples para explicar a DCE é o modelo de Helmholtz, o qual considera que uma única camada de contra-íons da solução adsorvem na superfície e neutralizam as cargas desta. Todavia, este modelo falha em vários aspectos incluindo o valor da capacitância decorrente da formação da DCE.^[52]

Atualmente, o modelo mais aceito é o de Bockris, Devanathan e Müller, os quais assumem que moléculas da água predominam na interface sólido-líquido e adsorvem fortemente através de interações de dipolo na superfície do sólido.^[53,54] A Figura 1.17 mostra uma ilustração deste modelo. Conforme este, as moléculas da água adsorvidas constituem uma primeira camada interna também chamada de plano interno de Helmholtz ou IHP (do inglês, *internal Helmholtz plane*). A segunda camada é conhecida como plano externo de Helmholtz ou EHP (do inglês, *external Helmholtz plane*) e refere-se a adsorção de íons solvatados e a camada conseguinte é a camada de difusão.^[53,54] Esta configuração iônica com dipolos orientados na superfície e a formação destas camadas pode ser descrita como um capacitor de placas em paralelo. Assim, a capacitância C_{DCE} promovida pela DCE é determinada pela permissividade do vácuo (ε_{o}), a constante dielétrica do eletrólito (ε_{r}), a área interfacial (A_i) e a distância (d_{EHP}) do EHP da superfície do sólido, podendo ser descrita como:

$$C_{DCE} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r A_i}{d_{EHP}}$$
(Eq. 1.12)

No modelo de Bockris, Devanathan e Müller o valor da constante dielétric da água, o qual é usualmente assumido como 80, é reconsiderado e estimado em \approx 6 para IHP em função do fato de que as moléculas da água nesta camada não podem rotacionar de forma livre. Desta maneira, os valores de C_{DCE} calculados são da ordem de 0,1 – 0,4 F m⁻², o que corresponde aos valores encontrados experimentalmente.^[54]



Figura 1.17 Representação esquemática do modelo de Bockris, Devanathan e Müller para íons e moléculas da água distribuídos dentro da dupla camada elétrica e adsorvidos com dipolos orientados numa superfície metálica. Na representação das moléculas da água, as esferas azúis representam os átomos de hidrogênio, enquanto as esferas verdes correspondem aos átomos de oxigênio.

O modelo de Bockris, Devanathan e Müller não é somente adequado para explicar os valores de capacitância da dupla camada elétrica, mas também serve para explicar a dependência desta capacitância com o potencial de superfície. O potencial na DCE decai linearmente dentro do plano interno de Helmholtz, mas após este passa a ser reduzido de forma exponencial até na camada de difusão quando é então praticamente constante. Assim, é importante considerar que no IHP o potencial eletrostático de um íon ou de uma molécula na sua forma ionizada pode ser descrito pela teoria de Debye-Hückel, a qual também é usada para descrever a espessura λ_D da DCE (comprimento de Debye), conforme mostrado através da seguinte Equação: ^[52]

$$\lambda_D = \frac{1}{\sqrt{4\pi l_B \sum_i c_i z_i^2}} \tag{Eq. 1.13}$$

onde l_B corresponde ao comprimento de Bjerrum (0,7 nm), e $\sum_i c_i z_i^2$ é a soma de todas as espécies iônicas, com uma concentração c_i e um estado de valência z_i . Para soluções salinas

compostas por sais binários simples como NaCl, este termo é também descrito como a força iônica da solução. A Equação 1.13 indica claramente que a espessura da DCE diminui com o aumento da concentração de íons e de seus respectivos estados de valência próximos da superfície, diminuindo portanto também o gradiente de potencial nesta.

Estes conceitos são todos baseados em processos ocorrendo em superfícies planas de sólidos com espessura de ao menos dezenas de micrômetros, para as superfícies curvadas de nanoestruturas metálicas, outros efeitos quanto ao seu potencial elétrico devem ser considerados. Para o caso de nanopartículas de Au com dimensões ≤ 30 nm grande parte de seus átomos estão em sua superfície, fazendo com que a razão de superfície/volume destas seja extremamente alta. Devido esta grande área superficial, as partículas são capazes de acumular uma alta densidade de elétrons, a qual por sua vez é também inversamente proporcional ao volume das partículas. Esta alta densidade de cargas na superfície das partículas é capaz de gerar assim gradientes de campos elétricos que aumentam o número de espécies adsorvidas e portanto aumentam o número de dipolos formados na interface nanopartícula/solução. Isto implica em dizer que variações no potencial elétrico da DCE devido a fatores como mudanças na concentração de eletrólito ou mudanças de pH refletem numa enorme alteração no gradiente de campo elétrico da nanopartícula e da capacitância desta. ^[43,44,55]

Os conceitos e considerações feitas nesta e nas outras seções são importantes e serão aplicados na próxima seção para uma melhor compreensão de como ISFETs nanoestruturados podem detectar eventos como potenciais de ação e processos de exocitose, assim como podem ser empregados na detecção de pequenas moléculas.

1.3 A Interface entre Transistores e Células Eletrogênicas

A aplicação de ISFETs para monitorar eventos como potenciais de ação ou processos de exocitose de células eletrogênicas depende primeiramente da adesão destas células sobre a porta do transistor. Para isso as células devem ser crescidas diretamente sobre os dispositivos. Desta forma, o acoplamento célula-transistor formará uma região de junção entre a superfície do transistor e a parede celular. A resistência elétrica da solução nesta junção é responsável então por uma queda de voltagem de um sinal elétrico vindo da célula que será detectado pela mudança de potencial na superfície do transistor.^[56] Para uma melhor compreensão deste fenômeno

gerado na junção célula-transistor, a próxima seção irá apresentar o modelo do ponto de contato o qual descreve este acoplamento híbrido através de um circuito equivalente.

1.3.1 O Modelo do Ponto de Contato

O modelo do ponto de contato foi originalmente desenvolvido por Regehr *et al.* para descrever o acoplamento de células eletrogênicas com microeletrodos de óxido de índio-estanho, sendo posteriormente adaptado para o acoplamento de células com transistores.^[56,57] Basicamente, este modelo é uma representação de um circuito elétrico equivalente descrevendo com cada um dos seus elementos o acoplamento de uma célula eletrogênica com a superfície de um transistor, conforme ilustrado na Figura 1.18. A membrana celular pode ser distinguida em duas partes, a parte da membrana livre (ML) exposta a solução e a parte da membrana aderida (JM) à superfície do transistor.



Figura 1.18 Circuito equivalente para o modelo do ponto de contato contendo os seguintes potenciais: O potencial de membrana V_M no citosol, o potencial de junção V_J na região de acoplamento e o potencial V_S entre a fonte e a solução de eletrólitos. Estes potenciais estão conectados entre si através dos elementos descritos por Hodgkin e Huxley para a membrana celular, isto é, a condutância G_J da junção de acoplamento e a capacitância do óxido na porta do transistor. A Figura foi adaptada da referência [56].

As características de capacitância da membrana (C_M) e os elementos descritos por Hodgkin-Huxley como os canais de íons e as correntes de fuga da membrana celular são também mostrados. O contato entre a célula e o transistor na junção do acoplamento é definido como um único ponto e é chamado de potencial de junção (V_J). A altura do espaço de junção entre a célula e o transistor é variável e normalmente encontra-se entre 50 e 110 nm.

Devido a esta pequena altura, esta região de junção é também interpretada como um resistor onde a sua condutância é representada por G_J . Assim, o termo V_J é dito estar acoplado a voltagem V_S entre fonte e dreno e também a capacitância C_{ox} do dielétrico cobrindo a porta do transistor.^[57] Aplicando-se a lei de Kirchhoff, o potencial de junção pode então ser correlacionado com o potencial intracelular através da seguinte Equação:^[58]

$$C_{ox}\frac{dV_{J}(t)}{dt} + G_{J}V_{J}(t) = C_{JM}\frac{d(V_{M}(t) - V_{J}(t))}{dt} + \sum_{i} G_{JM}^{i} (V_{M}(t) - V_{J}(t) - E^{i})$$
(Eq. 1.14)

Esta expressão pode ainda ser simplificada usando a seguinte aproximação:

• A corrente capacitiva através do óxido cobrindo a porta do transistor é desprezível:

$$C_{ox} \frac{dV_J(t)}{dt} \approx 0$$
 (Eq. 1.15)

• O potencial no ponto de contato é muito inferior em relação ao potencial da membrana celular:

$$V_{J}(t) \le V_{M}(t)$$
 (Eq. 1.16)

Aplicando-se estas considerações na Equação 2.14, a seguinte Equação para o potencial de junção pode ser derivada:

$$V_{J}(t) = \frac{1}{G_{J}} \left(C_{JM} \frac{d(V_{M}(t))}{dt} + \sum_{i} G_{JM}^{i} \left(V_{M}(t) - E^{i} \right) \right)$$
(Eq. 1.17)

Esta equação mostra o forte impacto da condutância de junção (G_J) na magnitude do sinal detectado pelo transistor para o acoplamento célula-transistor. Isto é, quanto menor for o valor de
G_J , maior será o sinal de V_J detectado pelo transistor. Portanto, para que um ótimo acoplamento célula-transistor seja realizado, é necessário que a porta do transistor seja muito bem selada do resto da solução por uma ou várias células aderindo-se a sua superfície.^[58]

A adesão celular é um outro tópico importante na análise de eventos celulares utilizando transistores e pode ser avaliada através da técnica de função de transferência. Desta forma, a próxima sub-seção irá introduzir os conceitos básicos desta técnica e como esta pode ser explorada para fornecer informações como a condutância da solução na região de junção célula-transistor.

1.3.2 Análises de Adesão Celular por Função de Transferência

Como visto através do modelo do ponto de contato, a adesão celular determina a geometria da região de junção célula-transistor e pode, portanto influenciar a magnitude de V_J detectável pelo transistor. Assim, considerando que na região de junção entre a membrana celular e a superfície do transistor existe uma fina camada de eletrólito, cuja condutividade é descrita pelo termo G_J, a adesão celular pode desta forma ser analisada por meio da aplicação de uma voltagem V_E ac através de um eletrodo de referência na solução. Neste caso, o sinal ac aplicado pode tanto ser atenuado devido ao seu acoplamento com a membrana celular ou simplesmente se propagar através da região de junção sofrendo uma atenuação mínima. Este cenário é muito similar e pode ser comparado ao dos filtros elétricos, os quais são caracterizados por uma função de transferência ou resposta em frequência $h(\omega)$.^[56] Para o caso do acoplamento de uma célula sobre a superfície de um transistor e a conseguinte aplicação de uma voltagem V_E ac por meio de voltagem V_J na junção célula-transistor e V_E aplicado externamente. Assim, esta pode ser escrita como:^[56,59-61]

$$h(\omega) = \frac{V_J}{V_E}$$
(Eq. 1.18)

A análise deste sinal de $h(\omega)$ obtido é mais fácil de se visualizar através de um diagrama log-log também chamado diagrama de Bode como mostrado na Figura 1.19. Nesta, o termo ω_0 corresponde a frequência de corte ou frequência na qual o sinal ac aplicado começa a ser atenuado. Assim, quanto maior for ω_0 maior será a faixa de frequência para o qual o sinal ac pode se propagar sem ser atenuado significativamente. Isto significa que para a análise do acoplamento de uma célula sobre um transistor, quanto menor for o valor de ω_0 melhor será a adesão celular neste.



Figura 1.19 Curva hipotética do logarítmo da transferência de função H em função do logarítmo da frequência angular ω . O termo ω_0 indica a frequência de corte.

Durante a adesão de uma célula sobre a porta de um ISFET, a membrana celular pode como já mostrado através do modelo do ponto de contato, ser distinguida em duas áreas: uma área A_{ML} da membrana que está exposta a solução e uma área A_{JM} que está na região de junção com o transistor onde sua fração α de acoplamento é dada pela seguinte relação:^[59, 61]

$$\alpha = \frac{A_{JM}}{A_{JM} + A_{ML}}$$
(Eq. 1.19)

Desta maneira, o espectro total da função de transferência em função da frequência angular ω pode ser obtido considerando-se a lei de Kirchhoff. Assim, assumindo que a condutância da membrana celular é relativamente pequena com $g_{JM} A_{JM} \ll G_J e g_{FM} A_{FM} \ll G_J$, a seguinte aproximação para descrever a função de transferência total $H(\omega)$ pode ser utilizada:

$$H(\omega) = \frac{1 + i\omega\tau_J h_{\infty}}{1 + i\omega\tau_J}$$
(Eq. 1.20)

Nesta, h_{∞} representa a transferência de função numa frequência infinita, enquanto τ_J é uma constante de tempo que depende das capacitâncias específicas da membrana celular (c_M) e do óxido (c_{ox}), assim como da condutividade específica da junção $g_J = G_J/A_{JM}$ e da fração de área α da membrana acoplada no transistor, conforme mostrado nas seguintes Equações: ^[61]

$$h_{\infty} = \frac{(1-\alpha) c_M}{(1-\alpha) c_M + c_{ox}}$$
(Eq. 1.21)

$$\tau_{\rm J} = \frac{(1-\alpha) \, c_M + c_{ox}}{g_{\rm J}} \tag{Eq. 1.22}$$

Em termos de amplitude $|\mathbf{h}|$ o espectro da função de transferência mostra uma transição de um limite $h_0 = 1$ a baixa frequência para um limite a alta frequência h_{∞} , conforme mostrado na Equação 1.23.^[61]

$$|\mathbf{h}|^{2} = \frac{1}{1 + (\omega\tau_{J})^{2}} (h_{0})^{2} + \frac{(\omega\tau_{J})^{2}}{1 + (\omega\tau_{J})^{2}} (h_{\infty})^{2}$$
(Eq. 1.23)

Enquanto o espectro de fase ϕ_h demonstra um vale em torno de uma frequência definida por τ_J , de acordo com a Equação 1.24:

$$\tan \phi_h = \frac{1}{\omega \tau_J + \frac{1}{\omega \tau_J h_{\infty}}} \left(1 - \frac{1}{h_{\infty}} \right)$$
(Eq. 1.24)

Todas estas relações mostram claramente que através de medidas de função de transferência, parâmetros como a condutividade da solução na região de junção do acoplamento célulatransistor podem ser obtidos e utilizados não só na análise da adesão celular, mas também no sinal decorrente de um potencial de ação ou evento de exocitose detectado pelo transistor.^[61]

Baseando-se na análise de cada um desses conceitos envolvendo a sensibilidade elétrica de nanopartículas metálicas em solução e a adesão de células sobre as superfícies de transistores, desperta-se uma motivação para o desenvolvimento de transistores nanoestruturados visando a

análise de processos interfaciais com células sobre suas superfícies e possível aplicação para o monitoramento da atividade elétrica destas últimas utilizando estes dispositivos, os quais conforme descrito apresentam algumas vantagens em relação ao transistores convencionais.

1.4 Objetivos

Baseado nos conceitos e fundamentos apresentados nas seções prévias, o objetivo geral deste trabalho é:

 A fabricação de transistores possuindo superfícies nanostruturadas com partículas de Au e análise da aplicação destes para detectar moléculas neurotransmissoras e monitorar os processos de exocitose de células modelos de neurônios.

E os objetivos específicos por sua vez foram:

- Produzir estruturas do tipo capacitores MOS com alumina anódica e nanopartículas de Au em suas superfícies e analisar as características de capacitância destas estruturas em solução.
- Fabricar e caracterizar eletricamente um conjunto de transistores do tipo ISFETs, com implementação de filmes finos de alumina anódica porosa e nanopartículas de Au em suas superfícies.
- Modificar químicamente a superfície destes transistores nanoestruturados visando a detecção de moléculas de neurotransmissores.
- Realizar o crescimento de células PC12 (modelos de neurônios) sobre a porta dos respectivos transistores e avaliar os processos de adesão celular, assim como detectar os sinais elétricos decorrentes da exocitose de células PC12.

Capítulo 2

Experimental

Como descrito no item 1.4, os objetivos desta tese envolveram a fabricação de capacitores e consequentemente de transistores de efeito de campo e a aplicação destes últimos como sensores para a detecção de moléculas neurotransmissoras e também de vesículas liberadas por células PC12. A metodologia empregada na fabricação dos dispositivos eletrônicos, assim como os métodos utilizados para a detecção de neurotransmissores e a integração de FETs com células são os principais tópicos deste capítulo. Desse modo, o item 2.1 aborda a fabricação de um capacitor sub-micrométrico polarizado através de nanopartículas de Au. O item 2.2 detalha a caracterização em meio aquoso destes capacitores, enquanto o item 2.3 descreve a fabricação e caracterização de transistores de efeito de campo. As modificações das superfícies dos FETs para a detecção de dopamina e serotonina são descritas no item 2.4. Por fim, o item 2.5 detalha o crescimento de células PC12 sobre transistores e as medidas de adesão celular e liberação de vesículas ácidas empregando-se estes últimos. No Anexo B desta tese incluiu-se uma tabela descrevendo típicos problemas experimentais observados e como estes podem ser resolvidos.

2.1 Fabricação de Capacitores Sub-micrométricos do tipo MOS

A etapa inicial deste trabalho visou a fabricação de capacitores possuindo a mesma estrutura física a ser desenvolvida posteriormente nos transistores. Esta estrutura física foi formada por um semicondutor (silício tipo p), um filme fino de óxido de silício (SiO₂) e posteriormente um filme de óxido de alumínio (Al₂O₃) e por fim nanopartículas de Au. As nanopartículas foram eletricamente conectadas a um eletrodo de platina sub-micrométrico e os capacitores apresentaram uma estrutura do tipo MOS. Toda esta parte do trabalho foi desenvolvida em sala limpa dentro do centro de componentes semicondutores (CCS) da UNICAMP. A fabricação e caracterização elétrica destes capacitores produzidos são descritos na sequência.

2.1.1 Reagentes e Materiais Empregados na Fabricação dos Capacitores

Para o processo de fabricação dos capacitores empregou-se lâminas de silício (Si) do tipo p (adquiridas através da empresa PCA) com resistividade 1–10 Ω .cm e orientação cristalina <100>. Os reagentes empregados na limpeza das lâminas foram todos de grau eletrônico, com pureza equivalente a 99,999%. Os reagentes orgânicos como acetona e álcool isopropílico e também os inorgânicos como os ácidos sulfúrico, fosfórico, fluorídrico (H₂SO₄, H₃PO₄, HF, respectivamente), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidróxido de amônio (NH₄OH) utilizados nos processos de limpeza foram adquiridos através da empresa J.T.Baker. Para o processo de anodização e abertura dos poros de alumina foram utilizados os ácidos sulfúrico (97%) e fosfórico (85%), ambos adquiridos da Merck. A síntese de nanopartículas de Au foi realizada utilizando-se como sal precursor o AuCl (Strem Chemicals) e como agente redutor o 1,4-dihidroxibenzeno (hidroquinona) (Merck).

2.1.2 Oxidação de Silício, Deposição de Alumínio e Anodização

Uma lâmina de Si foi inicialmente submetida a limpeza RCA (do inglês, *radio corporation of America*) e sequencialmente oxidada através de processo RTP (do inglês, *rapid temperature process*) utilizando um equipamento RTP-JIPELEC Jetfirst 150. A oxidação da lâmina foi conduzida aumentando-se a temperatura com uma razão de 50 °C s⁻¹ até 960 °C em uma atmosfera de oxigênio e mantida nesta mesma por 40 s. Após esta, a atmosfera de oxigênio foi substituída por uma atmosfera de nitrogênio e a amostra foi mantida nesta por mais 40 s numa temperatura de 960 °C. Em seguida, a temperatura foi gradativamente diminuída até alcançar a temperatura ambiente. A espessura da camada de SiO₂ obtida foi de 10 nm.

A evaporação de uma fina camada de alumínio de 80 nm sobre a lâmina oxidada foi realizada utilizando-se a técnica de deposição por feixe de elétrons (Balzer) com uma taxa de deposição de 10 nm s⁻¹ a uma pressão de 2 x 10^{-7} Torr. Para anodização desta lâmina uma placa de platina (Pt) foi utilizada como cátodo, enquanto o lado metalizado da lâmina de Si serviu de ânodo. Estes foram polarizados com uma fonte de corrente contínua construída em nosso laboratório, aplicando-se para tanto uma tensão de 25 V entre os eletrodos durante 55 segundos e utilizando-se como eletrólito uma solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, resultando assim em uma

camada de Al_2O_3 sobre o SiO₂. Durante esta etapa, a temperatura empregada nas anodizações foi controlada em 2 °C através de um banho termostático ThermoNeslab RTE 7 da Digital One. Ao final desta etapa a lâmina foi lavada excessivamente com água deionizada e seca ao ar. Por fim, a lâmina anodizada foi submetida a um processo de abertura dos poros da Al_2O_3 formada. Para tanto, a amostra foi submersa em H_3PO_4 0,1 mol L⁻¹ por 30 minutos à temperaturade 28 °C e posteriormente lavadas excessivamente com água deionizada e secas ao ar.

2.1.3 Crescimento de Nanopartículas de Au dentro dos Poros de Alumina

A síntese de nanoestruturas de Au foi realizada empregando-se o método de redução química. Para tanto, a lâmina contendo a camada de alumina foi imersa em uma solução mista de AuCl 50 mmol L⁻¹ e hidroquinona 15 mmol L⁻¹ (5:1, respectivamente) e levada ao banho ultrassom por 1 minuto. O pH desta solução estava em torno de 1, sendo este ajustado através da adição de HCl concentrado à mistura. Na sequência, a lâmina foi transferida para uma chapa de aquecimento a 90 °C e deixada nesta por 30 minutos. Em uma etapa posterior, a lâmina foi imersa novamente em uma mistura ácida (pH≈1) de AuCl 10 mmol L⁻¹ e hidroquinona 15 mmol L⁻¹ na proporção de 5:1, respectivamente. A lâmina foi deixada nesta por 1 minuto protegida da luz. Em seguida, a lâmina foi transferida para a chapa de aquecimento a 90 °C e deixada nesta

2.1.4 Caracterização por Microscopia Eletrônica

As análises de microscopia da membrana porosa de alumina e das estruturas de Au crescidas nesta foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de baixo vácuo (JEOL JSM 6360LV) equipado com um sistema EDS (Energy-Dispersive Spectrometry, Noran System SixModel 300), disponível no Instituto de Química da UNICAMP e um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FEG-MEV JSM 6330F) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Sendo que não foi necessário realizar a metalização das amostras para a obtenção das micrografias.

2.1.5 Formação de um Eletrodo de Pt sobre as Nanoestruturas de Au

A fabricação do capacitor com dimensões sub-micrométricas foi concluída através da deposição de um eletrodo de Pt com uma área de $0.35 \ \mu m^2$ sobre a superfície da alumina contendo as nanopartículas. O eletrodo de Pt foi depositado utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo acoplado a um sistema de feixe de íons focalizado (FIB - FEI Nanolab 200) disponível no CCS, e que permite o registro de imagens durante a deposição do metal. O processo de deposição do eletrodo de Pt foi conduzido empregando-se um feixe de íons com energia de 30 kV e corrente elétrica de 0,5 nA. A escolha da Pt para confecção do eletrodo foi baseada nas características eletroquímicas inertes, podendo evitar assim, possíveis contaminações quando esta é depositada diretamente sobre o material em análise. Desta forma, como material precursor para a deposição deste metal foi utilizado o composto organometálico trimetil-metilciclopentadienila de platina e o composto tetraetoxisilano foi empregado para a deposição de SiO₂ abaixo do eletrodo de Pt, evitando assim a capacitância parasita durante as medidas. Estes gases foram injetados separadamente através de uma agulha dentro da câmara de vácuo onde as amostras foram dispostas, e após então, foram decompostos sobre ação de um feixe de íons de gálio (Ga⁺), promovendo assim a deposição do metal (Pt) e do isolante (SiO₂) separadamente sobre a superfície das amostras. A espessura do eletrodo de Pt depositado foi de 100 nm. O contato elétrico neste foi estabelecido através de uma segunda deposição, porém agora de uma linha (200nm e 12 µm, espessura e comprimento, respectivamente) de Pt conectando este eletrodo a uma placa (pad) também de Pt com espessura de 200 nm e área de 1600 µm². Este mesmo procedimento foi realizado em uma amostra não contendo nanopartículas de Au e esta amostra foi denominada de amostra controle. A Figura 2.1 mostra uma ilustração esquemática e resumida das etapas de fabricação deste capacitor.



Figura 2.1. Ilustração esquemática das etapas de fabricação do capacitor sub-micrométrico polarizado por nanopartículas de Au. Após a oxidação do substrato de Si e formação de um filme fino de SiO₂, um filme fino de alumínio foi depositado e posteriormente anodizado gerando assim uma fina camada porosa de alumina anódica (etapa I). Na sequência, nanopartículas de Au foram crescidas diretamente dentro dos poros de alumina (etapa II). Por fim, estas nanopartículas foram eletricamente conectadas a um eletrodo sub-micrométrico de Pt (etapa III). As ilustrações desta Figura não estão em escala.

2.1.6 Medidas Elétricas

A caracterização elétrica destes capacitores foi realizada utilizando-se um Semiconductor Characterization System 4200 e um CV analyzer 590 da Keithley, equipado a um microscópio óptico de alto desempenho da marca Microzoom II (Cambridge Instruments) e acoplado a um micromanipulador modelo 600 (MM). Todas as medidas elétricas foram executas a temperatura ambiente na ausência de luz.

2.2 Caracterização Elétrica dos Capacitores em Solução Eletrolítica

A capacitância dos dispositivos produzidos conforme descrito nos itens anteriores foi também caracterizada em solução eletrolítica. No entanto, neste caso eletrodos submicrométricos de Pt não foram depositados sobre a superfície dos capacitores. A metodologia empregada na análise destes capacitores em solução é descrita no item 2.2.1. Todas as etapas de caracterização dos capacitores em solução, assim como as etapas posteriores descritas a seguir, foram conduzidas no Instituto Peter Gruenberg do centro de pesquisa de Jülich na Alemanha, o qual possui uma estrutura completa para a fabricação de transistores em escala micro e submicrométrica e suas aplicações para o monitoramento da atividade elétrica de células biológicas.

2.2.1 Caracterização Elétrica por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A caracterização dos capacitores em relação a sua capacitância em solução foi realizada através da técnica de EIE, utilizando-se um potenciostato/galvanostato modelo 283 (Princetton Applied Research) acoplado a um analisador de impedância por ganho de fase Solartron SI 160. As soluções utilizadas durante os experimentos foram constituídas de KCl 100 mmol L⁻¹ tamponadas em pH 7,2 com K₂B₄O₇ 8 mmol L⁻¹. Como eletrodos de referência e contra-eletrodo utilizou-se um eletrodo de Ag/AgCl (DRIREF-5SH, World Instruments) e um eletrodo de Pt, respectivamente. A amplitude do potencial AC aplicado durante as medidas foi de 10 mV e a faixa de frequência analisada foi de 10 Hz a 100 kHz. Os dados obtidos foram analisados através do software ZPlot 2.0 (Scribner Associates, Inc.). A Figura 2.2 exibe uma ilustração da configuração instrumental utilizada durante as medidas. As amostras analisadas foram, o substrato de silício oxidado (Si/SiO₂) como descrito na seção 2.1.2, o substrato de silício oxidado contendo alumina (Si/SiO₂/Al₂O₃) e o substrato de silício oxidado contendo alumina e nanopartículas de Au (Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs). A preparação destes seguiu o mesmo procedimento já descrito anteriormente no item 2.1, com a única diferença de que o eletrodo de Pt não foi depositado sobre as amostras. As curvas de capacitância versus voltagem (C-V) foram realizadas em uma frequência fixa. Assim, a capacitância foi subsequentemente calculada a partir do valor de impedância para um modelo de circuito equivalente a um diodo.



Figura 2.2. Ilustração do arranjo de eletrodos para a célula eletroquímica utilizada nas medidas de impedância. Neste caso, a ilustração é demonstrada apenas para uma amostra de Si/SiO₂/Al₂O₃, porém o mesmo arranjo de eletrodos foi utilizado também para análises de amostras contendo nanopartículas de Au.

2.3 Fabricação e Caracterização Elétrica de Transistores de Efeito de Campo

Seguida as etapas de caracterização dos capacitores, transistores de efeito de campo foram então produzidos buscando desenvolver na porta destes a mesma estrutura física empregada nos capacitores analisados até esta parte do trabalho. Os transistores foram fabricados na sala limpa do Instituto Peter Gruenberg do centro de pesquisa de Jülich na Alemanha e o layout dos chips e suas etapas de produção são descritas a seguir.

2.3.1 Layout dos Chips

Os chips a serem fabricados foram baseados num processo já descrito na literatura. Neste, 16 transistores foram organizados numa matriz de 4 x 4 no centro de um chip com dimensões de 5 x 5 mm, onde a distância entre cada FET foi 200 μ m. A Figura 2.3 mostra um layout de um chip produzido. Conforme visto através deste, o chip é formado por uma fonte comum (indicado pela letra S) para todos os FETs, os quais estão no centro do chip e são representados pelos retângulos em verde. Os contatos metálicos para as linhas de condução dos drenos de cada FET são indicados por quadrados nas extremidades superior e inferior. Estes contatos metálicos são também chamados de pads de contato. Os números ao lado dos pads seguem como uma identificação dos FETs. Os pads nas extremidades da esquerda e da direita do chip servem como contatos para teste de resistência elétrica de linhas de contato formadas nestas extremidades e para aterragem do chip, como é o caso dos pads marcados pela letra B. A Figura a direita indica a ampliação da porta de um FET. Neste processo, uma rodada de chips foi produzida com FETs apresentando portas com dimensões de 12 x 7 μ m e outra rodada produzindo FETs com portas de dimensões de 25 x 7 μ m, comprimento e largura, respectivamente. Os processos envolvidos na fabricação destes transistores são descritos na sequência.



Figura 2.3. Layout do chip fabricado (ilustração da esquerda). Os 16 FETs são arranjados numa matriz de 4 x 4 no centro do chip e são indicados pelos retângulos verdes. As setas indicam os pads de contato para a fonte comum (indicada pela letra S) para todos os transistores, assim como o pad de contato para o dreno de um transistor. Os números ao lado dos pads servem como identificação dos FETs. A caixa retangular vermelha no centro do chip indica um FET e uma imagem ampliada deste (vista do topo) é mostrada no layout a direita. Neste, as letras S e D indicam os contatos de fonte e dreno, enquanto a largura e o comprimento da porta do FET são indicados pelas letras WG e LG, respectivamente.

2.3.2 Reagentes e Materiais Empregados na Fabricação dos Transistores

Os reagentes empregados na construção dos dispositivos foram o fotoresiste AZ 5214-E (AZ Electronic Materials), o revelador AZ 312 MIF (*metal ion free* - Clariant), acetona e álcool isopropílico (J.T.Baker), H₂SO₄, H₂O₂, H₃PO₄, HF, e NH₄OH (J.T.Baker), todos de grau eletrônico com pureza equivalente a 99,999 %. Para a fabricação dos respectivos FETs foram empregadas lâminas de silício tipo n (adquiridas através da empresa Wacker Siltronic AG) com resistividade entre 8 e 12 Ω cm e orientação cristalina <100>.

2.3.3 Procedimentos Empregados na Fabricação dos FETs

Os principais métodos empregados na fabricação dos respectivos transistores foram a oxidação térmica, processos de fotolitografia, dopagem do substrato e metalização. Os detalhes técnicos de cada etapa são descritos no Anexo A. Um resumo das etapas do processo de fabricação dos transistores é ilustrado na Figura 2.4. Inicialmente as lâminas de Si tipo n foram oxidadas em um forno convencional com atmosfera úmida ($H_2O + O_2$) (Figura 2.4A). Esta etapa é realizada com o intuito de isolar os dispositivos entre si e formar um anteparo para os processos vindouros, como por exemplo, a implantação iônica para a formação das regiões de fonte e dreno e as linhas de contato. A etapa seguinte consiste na preparação das lâminas de Si agora com as superfícies oxidadas, para o processo de implante dos terminais p. Posteriormente, buscando formar as áreas para a implantação iônica de boro (B⁺, dopante tipo p) e as conseguintes linhas de contato, realizou-se o primeiro dos sete processos previstos de fotolitografia (Figura 2.4B). Após o primeiro processo de litografia, a corrosão do óxido destas regiões foi conduzida utilizando-se uma solução mista de HF e NH₄F. A etapa seguinte consistiu então na implantação iônica (120 keV, 8x10¹⁵ íons cm⁻²) de B⁺ nas regiões corroídas (Figura 2.4C). A próxima etapa consistiu no crescimento de uma fina camada de óxido sobre estas. Para tanto, as lâminas foram novamente submetidas a um processo de oxidação, neste agora se utilizando inicialmente apenas de O₂ (20 min. a 1000 °C), e numa segunda etapa com H₂O (1h a 1000 °C). Ao final deste processo, uma camada de óxido de silício com espessura de 180 nm foi crescida sobre as regiões implantadas, enquanto a espessura do óxido da região não implantada



Figura 2.4. Etapas de fabricação dos transistores de efeito de campo com canal p.

era 1100 nm. A partir desta, uma segunda etapa de fotolitografia para a definição de canal (porta) e aumento da concentração de dopantes nas linhas de contato, foi então realizada (Figura 2.4D).

Após a litografia, o óxido não coberto pelo fotoresiste foi removido com o uso de uma solução mista de HF e NH₄F. Assim, uma segunda etapa de implantação com B⁺ (80 keV, $5x10^{15}$ íons cm⁻²) foi conduzida e as regiões de fonte e dreno dos transistores foram criadas (Figura 2.4E). Para promover a difusão dos dopantes e também proteger as áreas implantadas, uma nova etapa de oxidação foi também realizada. Inicialmente, com somente O₂ (5 min. a 1000 °C) e posteriormente com H₂O (30 min. a 1000 °C). Após esta oxidação, camadas de óxido com espessuras de 250 nm e 1140 nm foram crescidas sobre as áreas implantadas e não implantadas, respectivamente. Na sequência, mais uma etapa de litografia seguida da corrosão de uma parte do óxido de porta foi realizada com o intuito de se definir a região desta (Figura 2.4F). Após, mais uma vez os chips foram oxidados, mas agora se utilizando de H₂O por 1h10min a 800 °C. Esta oxidação gerou uma fina camada de óxido de aproximadamente 50 nm na região de porta dos transistores. Após esta, os chips foram passivados com uma camada de 130 nm de nitreto de

silício e uma camada de 100 nm de óxido de silício, as quais foram depositadas utilizando-se as técnicas de LPCVD (do inglês, Low Pressure Chemical Vapor Deposition) e PECVD (do inglês, Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) (Figura 2.4G). Na próxima etapa, a quarta litografia foi conduzida com o objetivo de se abrir a região de porta para a corrosão das camadas de óxido em sua superfície (Figura 2.4H). Durante esta litografia, todo o chip, exceto as regiões de porta, foi coberto com uma camada de fotoresiste, e seguidamente o óxido e o nitreto de silício destas regiões não cobertas foram corroídos pela técnica de RIE (do inglês, Reactive Ion *Etching*). Finalmente, uma última etapa de oxidação durante 1h com O₂ a 820 °C foi conduzida, e esta então gerou uma fina camada de aproximadamente 8 nm de espessura na porta dos FETs (Figura 2.4I). Para a deposição de metais nas regiões externas de contato, realizou-se mais uma etapa de litografia, na qual o fotoresiste cobriu todo o chip, exceto as regiões de contato. Os chips foram imersos em solução de HF por 20 s, removendo assim tanto o óxido como o nitreto de silício destas áreas. Na sequência uma camada de 200 nm de Al, seguida de outra camada de 200 nm de Au foram depositadas por sputtering nos contatos. As camadas metálicas depositadas sobre o resto do chip foram então removidas por meio de lift-off. Ao final, os chips foram submetidos a um tratamento térmico por 30 min. a 400 °C em atmosfera de N₂.

2.3.4 Fabricação de Alumina Porosa sobre os FETs

A fabricação de membranas porosas de alumina sobre os FETs foi realizada de maneira similar aquela descrita no item 2.1.2. Inicialmente, as extremidades dos chips onde se encontram as placas metálicas (*pads*) para contato elétrico dos FETs, foram recobertas com fina camada do fotoresiste AZ-5214 e posteriormente os chips foram curados por 15 min. a 150 °C. Na sequência, uma camada de alumínio de 80 nm foi depositada a uma taxa de 5 nm min⁻¹ por feixe de elétrons sobre estes chips. Esta fina camada de Al foi então anodizada sobre agitação em ácido sulfúrico (0,5 mol L⁻¹) por 1 min a 7 °C aplicando-se uma voltagem de 25 V através de uma fonte de tensão da Lambda model 120-1.8. Na Figura 2.5 são mostradas fotos do arranjo de um chip dentro da célula eletroquímica para o processo de anodização. Após as anodizações as amostras foram lavadas excessivamente com água deionizada e secas ao ar. O aumento do diâmetro dos poros da alumina formada foi realizado pela submersão dos chips em H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹ por 30 min. a 30 °C. Na sequência, os chips foram lavados com água deionizada e secos



Figura 2.5. A – Fotografia do arranjo experimental para anodização do chip contendo os FETs. O chip é colocado na parte inferior de uma célula eletroquímica feita de acrílico, enquanto um contra-eletrodo de Pt é colocado na parte superior da célula. O chip e o contra-eletrodo são polarizados através de uma fonte de tensão e a corrente de anodização é monitorada através de um multímetro. B –Fotografia da célula eletroquímica mostrando o arranjo do chip, do contra-eletrodo e do compartimento para a solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. O contato elétrico no chip é feito através de um clip metálico conectando sua extremidade. C – Fotografia de um chip anodizado. O círculo na área central do chip indica a região anodizada.

ao ar. Por fim, os chips foram submetidos a um processo de lift-off para remoção do fotoresiste e do alumínio não anodizado cobrindo os pads de contato.

2.3.5 Síntese de Nanopartículas de Au dentro dos Poros de Alumina

A síntese de nanopartículas de Au dentro dos poros de alumina cobrindo os FETs foi realizada conforme já descrito no item 2.1.3.

2.3.6 Análises por Microscopia Eletrônica

As superfícies dos FETs anodizados e contendo as nanopartículas de Au foram analisadas através de um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo modelo LEO 1550 VP. Análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram também conduzidas, utilizando um instrumento Tecnai G2 F20. Todas estas análises foram realizadas sem recobrimento das superfícies com qualquer tipo de material condutor.

2.3.7 Encapsulamento dos Chips

Cada chip produzido possui 16 transistores, para que todos os dispositivos possam ser medidos simultaneamente e possam ser re-utilizados várias vezes com líquidos sobre a sua superfície, estes foram encapsulados. A Figura 2.6A mostra uma foto dos elementos necessários para o encapsulamento dos chips. Basicamente, este processo consiste em colar um chip (i), utilizando tinta de prata (Ag), na região central de um suporte (carrier-Spectrum Semiconductor) (ii) e curar este a 150 °C por 30 min. O carrier possui diversas linhas metálicas em sua extremidade e estas foram ligadas aos pads de contato do chip através de fios de Al num processo conhecido como wire-bonding (Figura 2.6B). Desta maneira, os chips ficam eletricamente conectados ao carrier. Na próxima etapa, dois o-rings, um feito de poli-dimetilsiloxano (PDMS) (iii) e outro de vidro (iv) são colados utilizando PDMS no carrier contendo o chip. Enquanto o o-ring de PDMS, o qual tem um formato cônico é colado sobre o chip deixando apenas a área central contendo os FETs exposta ao ar, o *o-ring* de vidro é colado sobre o carrier. O processo de endurecimento do PDMS utilizado para colar os dois o-rings é realizado curando este a 150 °C por 1h. Na sequência, o espaço entre os dois o-rings foi preenchido com PDMS e este foi curado novamente a 150 °C por 1h. A Figura 2.6C mostra a foto de um chip encapsulado no carrier. É possível observar que através desta, somente a região central do chip está exposta ao ar, desta forma, é possível preencher esta região com um volume de líquido de aproximadamente 400 µL.



Figura 2.6. A – Fotografia dos elementos utilizados para encapsulamento dos chips. i) chip, ii) *carrier*, iii) *oring* de PDMS, iv) *o-ring* de vidro. Para comparação de dimensões, uma moeda de 5 centavos de reais foi colocada junto a foto. B – Ilustração de um chip eletricamente conectado a linhas metálicas de um *carrier* através do processo de *wire-bonding*. Os números representam o dreno do FET que está sendo conectado, enquanto as letras S e B correspondem a source (fonte comum para todos os FETs) e corpo (conexão para aterro da fonte), respectivamente. C – Foto de um chip encapsulado ao final do processo.

2.3.8 Caracterização Elétrica e Aquisição de Dados

A caracterização elétrica dos dispositivos produzidos foi realizada utilizando-se uma caixa amplificadora desenvolvida internamente no Instituto Peter Gruenberg (Figura 2.7A). Para a realização das medidas nesta, os carriers contendo os chips encapsulados são encaixados na caixa amplificadora na parte indicada pela seta na Figura 2.7A. Um diagrama do circuito elétrico básico desta caixa é mostrado na Figura 2.7B, onde é possível observar que a caixa é composta por 16 amplificadores independentes de fase seletiva e um dispositivo DDS (do inglês, directdigital-synthesis) para controle de amplitude e frequências exatas de sinais aplicados durante medidas impedimétricas. A aquisição dos sinais de saída desta caixa amplificadora foi feita por um cartão de aquisição de dados (DAQ-NI 6071E) adquirido da empresa National Instruments. Os dados foram então transferidos através de uma conexão USB para um computador contendo o programa BioMol, também produzido internamente, empregando-se a linguagem de programação Delphi 5.0[®] (Borland Software Corporation) (Figura 2.7C). Através do programa BioMol, as voltagens aplicadas durante as medidas puderam ser todas controladas e as características elétricas como saída (output) e transferência (transfer) de 16 FETs de um único chip foram monitoradas simultaneamente como mostrado na Figura 2.7D. Uma das grandes vantagens deste sistema é a possibilidade de caracterizar e de quantificar de forma relativamente rápida os FETs que estão funcionando apropriadamente. A caracterização elétrica básica para avaliar o funcionamento destes dispositivos consistiu em adicionar na superfície do chip encapsulado uma solução tampão fosfato de potássio 1 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl em pH 7,3. Um eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de porta. Sendo que todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.



Figura 2.7. A – Fotografia da caixa amplificadora utilizada para medidas elétricas dos chips. B
–Diagrama básico do circuito elétrico da caixa amplificadora. O circuito foi adaptado da referência [60]. C –Ilustração esquemática do arranjo empregado na transferência de dados da caixa amplificadora para um computador com o programa BioMol. D – Imagem da tela do programa BioMol registrando as características elétricas de 16 FETs simultaneamente. Os ajustes de voltagem durante as medidas são feitos no lado direito da tela.

2.3.9 Medidas de Soluções Tampão com diferentes pHs

Os chips foram também caracterizados em relação ao seu comportamento elétrico em função do pH do meio. Para isso, foram empregadas soluções tampão fosfato de potássio 1 mmol L^{-1} contendo 10 mmol L^{-1} de KCl em diferentes valores de pH, sendo estes obtidos através da adição de soluções de ácido clorídrico (HCl) 1 mol L^{-1} e/ou hidróxido de potássio (KOH) 1 mol L^{-1} . Durante estas caracterizações, tanto medidas elétricas de saída (*output*) quanto medidas de correntes I_{DS} ao longo do tempo foram realizadas.

2.4 Detecção de Neurotransmissores usando Transistores Nanoestruturados

Após terem sido caracterizados eletricamente, os transistores fabricados foram empregados como sensores, atuando em duas configurações diferentes, visando a detecção de dopamina e serotonina respectivamente. A detecção destas moléculas foi baseada na modificação química da superfície dos respectivos FETs. Os procedimentos empregados nestas estão descritos a seguir.

2.4.1. Modificação da Superfície Porosa dos FETs para Detecção de Dopamina

Um procedimento de única etapa foi utilizado para a adsorção física da enzima tirosinase (EC 232-653-4, 5370 U mg⁻¹de sólido, Sigma-Aldrich) na porta dos FETs que continha somente a alumina porosa. Para tanto, a enzima foi imobilizada através do gotejamento de uma solução de tirosinase 2,4 mg mL⁻¹ preparada em tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl, pH 7,3, na superfície dos transistores por 2h a temperatura ambiente. Após essa modificação, a superfície dos FETs foi levemente lavada com tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl. A detecção de dopamina (Hidrocloreto de 3-hidroxitiramina, Sigma-Aldrich) foi realizada através da adição de diferentes concentrações deste analito a superfície dos FETs contendo tirosinase. Previamente a estas medidas, as soluções de dopamina foram oxigenadas por 7 min.

2.4.2 Modificação da Superfície de FETs contendo Nanopartículas de Au para a Detecção de Serotonina

A formação de monocamadas auto-organizadas de moléculas orgânicas na superfície das partículas de Au presentes nos transistores foi realizada através da exposição destas áreas por 15 minutos a uma solução mista de captopril ((2S)-1-[(2S)-2-metil-3-sulfanilpropanol] pirrolidona-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich) 1,0 mmol L⁻¹ e tiofenol (Sigma-Aldrich) 200 μ molL⁻¹, ambas preparadas em etanol. Após, as superfícies foram lavadas com água Milli-Q (18 MΩ).

2.5 Medidas de Adesão Celular e Liberação de Prótons por Vesículas de Células PC 12

Dois tipos de experimentos foram realizados utilizando-se células cromafinas PC12. No primeiro, avaliou-se através de medidas da função de transferência a adesão celular sobre os FETs com diferentes superfícies. Numa segunda etapa, os FETs foram utilizados para a detecção das substâncias liberadas das vesículas destas células. Os procedimentos utilizados para o cultivo de células e as respectivas medidas são detalhados abaixo.

2.5.1 Cultivo de Células

As células cromafinas PC 12 utilizadas neste trabalho foram doadas pelo grupo do Prof. Joachim Weis da Uniklinikumem Aachen na Alemanha. As células foram cultivadas em frascos T25 e mantidas em uma incubadora a 37 °C com 5% de CO₂. O meio de cultivo utilizado foi o meio *Dulbecco' s modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma, St. Luis, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (FCS, Sigma, St. Luis, USA) e uma mistura dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Penstrep, Sigma, St. Luis, USA).

2.5.2 Cultivo de Células nos Chips

Quando as células em cultivo nos frascos T25 alcançavam confluência de aproximadamente 70%, foi feita a passagem. Para tanto, o meio de cultivo foi removido e o frasco T25 contendo as células PC12 foi rinsado com 2 mL de solução de tripsina 0,05% / EDTA (6 mL) previamente aquecida a 37°C, sendo sequencialmente removida. Em seguida, 5 mL da solução mista de tripsina / EDTA foram novamente adicionados ao frasco T25, o qual foi levado a incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 2-3 minutos para remoção das células das paredes do frasco. Após, a solução de tripsina / EDTA foi removida e 5 mL do meio de cultivo DMEM foram adicionados ao frasco T25. Este meio de cultivo contendo as células suspensas foi transferido para um tubo de ensaio, sendo este centrifugado a 500 g por 5 minutos. Na sequência o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi resuspendido em 1 mL do meio de cultivo DMEM.

Neste momento, uma alíquota das células suspensas foi adicionada a uma câmara de Neubauer para contagem do número de células. Durante a etapa de passagem de células, a superfície dos chips encapsulados foi esterilizada com luz ultra-violeta durante 30 minutos e após então coberta com uma solução de poli-lisina 0,1 mg / mL por 40 minutos. Na sequência, removeu-se a solução de poli-lisina dos chips e adicionou-se sobre estes 60 μ L (~ 1500 células/mm²) da solução contendo as células suspensas. Os chips foram estocados na incubadora a 37 °C com 5% de CO₂ por 3 h e após a sedimentação das células sobre a superfície adicionou-se mais 400 μ L do meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e uma mistura dos antibióticos penicilina e estreptomicina. Todas as medidas envolvendo as células foram realizadas pelo menos após um dia de cultivo *in vitro*.

2.5.3 Medidas de Função Transferência e Detecção de Prótons Liberados por Vesículas

Para as medidas de função de transferência (voltagem), detecção de prótons liberados por vesículas das células e demais caracterizações elétricas, foi utilizada a caixa amplificadora descrita no item 2.3.7. Esta, possibilita com que 16 FETs possam ser medidos simultaneamente, enquanto correntes de I_{DS} ao longo do tempo, assim como leituras potenciométricas externas provenientes de mudanças de corrente entre fonte e dreno, possam ser registradas. Adicionalmente, medidas impedimétricas também podem ser realizadas utilizando-se esta caixa. Assim, para análise das células, o chips contendo as células cultivadas sobre suas superfícies foram removidos da incubadora e conectados a caixa amplificadora através do soquete na parte superior.

Para as medidas de transferência de função, um sinal de teste senoidal com amplitude de 10 mV foi aplicado através do eletrodo de referência enquanto a frequência foi variada de 1 Hz a 100 kHz. A amplitude e a frequência exatas do sinal teste aplicadas foram obtidas através do dispositivo DDS. As medidas foram obtidas utilizando-se o software BioMol. As análises envolvendo a detecção dos prótons liberados pelas vesículas foram conduzidas com FETs operando em saturação com o mesmo ponto de funcionamento do modo de leitura de externa. Isto é, todos os transistores operavam com a mesma voltagem entre fonte e dreno (V_{DS}). Um eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado durante estas medidas.

Durante toda a parte experimental deste trabalho alguns problemas quanto a fabricação e caracterização dos dispositivos foram comumente observados, uma rápida descrição destes problemas assim como uma possível alternativa para resolvê-los é apresentada no Anexo B.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados os resultados e discussão para a fabricação e caracterização elétrica dos transistores, assim como a implementação dos filmes finos de alumina anódica e nanopartículas em suas superfícies e os experimentos envolvendo a detecção de neurotransmissores e acoplamento com células PC12. Desta maneira, o capítulo foi organizado da seguinte maneira: Inicialmente serão apresentados os resultados de MEV e caracterização elétrica dos transistores com as diferentes superfícies. Nas seções 3.5 a 3.8 serão discutidos os resultados da aplicação dos respectivos transistores como biossensores para a detecção de dopamina e serotonina. Na última parte deste capítulo, serão então apresentados os resultados por vesículas de células PC12.

3.1 Fabricação de Membranas Porosas de Alumina sobre Si/SiO₂

Como detalhado na seção experimental, a parte inicial deste trabalho envolveu a oxidação de uma lâmina de silício tipo p com a formação de um filme fino (espessura de ~ 10 nm) de SiO₂ seguido da deposição de um filme de alumínio de 80 nm de espessura sobre esta. A anodização deste filme de alumínio gerou uma fina camada de alumina sobre o substrato de Si/SiO₂. A Figura 3.1 mostra o perfil da corrente de anodização ao longo do tempo (curva de I-t) durante a eletrooxidação do filme de alumínio. Conforme esta uma das características mais marcantes do processo de anodização empregado neste trabalho, foi o curto período de tempo para a oxidação completa do alumínio, que neste caso foi da ordem de 55–60 s. Este tempo de anodização de filmes finos de alumina porosa sobre substratos de silício.^[62-67] Este curto período de tempo da anodização do alumínio foi estabelecido baseando-se no comportamento da corrente de anodização observada através da curva de I-t, a qual apresentou um perfil de corrente típico de

formação de um filme de alumina porosa. Isto é, durante os primeiros segundos da anodização a corrente apresentou uma queda acentuada em função da formação de um filme fino de óxido (isolante) sobre toda a superfície do alumínio (Figura 3.1, região 1). Durante esta queda a corrente atingiu então um valor mínimo e o campo elétrico na superfície ficou centrado localmente em flutuações no óxido pré-formado (Figura 3.1, região 2).



Figura 3.1 – Perfil típico da corrente de anodização ao longo do tempo. Os números no gráfico a esquerda representam os diferentes estágios do crescimento do filme anódico ilustrado nas figuras a direita.

Este campo elétrico local associado ao efeito da temperatura de anodização conduziu desta forma, a dissolução local do óxido formado e consequentemente ao crescimento dos poros. Este crescimento pode ser observado através de um leve aumento na corrente de anodização, a qual é seguidamente mantida constante ao longo do tempo (Figura. 3.1, região 3 e 3.1, região 4). O leve aumento da corrente nesta etapa foi importante pois ele demonstra que não houve ruptura da camada anódica durante o crescimento dos poros.^[68-70] Após o filme de alumínio ter sido totalmente anodizado, os poros pararam de crescer e a corrente anódica começou a decair novamente. Neste momento então, o processo de anodização foi interrompido (3.1, região 4). A reação de formação da alumina (Al₂O₃) anódica é mostrada na sequência:

Reação no ânodo: $2Al + 3H_2O \rightarrow Al_2O_3 + 6H^+ + 6e^-$ Reação no cátodo: $6H^+ + 6e^- \rightarrow 3H_2$ A Figura 3.2A mostra uma micrografia do filme poroso de alumina após a anodização. Como visto através desta, o filme de alumina apresentou uma alta densidade de poros (~ 140 x 10^9 poros/cm^2) exibindo um diâmetro médio de cerca de ~ 10 nm. Estas características foram já também observadas em outros trabalhos reportados na literatura e são consistentes com a acidez



Figura 3.2 – A) e B) Micrografias obtidas por MEV de um filme ultrafino de alumina produzido sobre a superfície de Si/SiO₂ antes e após a etapa de corrosão por 40 min. com H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. As escalas das figuras são de 200 nm e 500 nm, respectivamente. C) Histograma de distribuição do diâmetro médio dos poros após a etapa de corrosão.

do eletrólito empregado na anodização, auxiliando o efeito de campo elétrico local na dissolução dos poros.^[50,69] De um modo geral, quanto mais forte for o ácido empregado, menores serão os

poros formados.^[69] No caso das anodizações discutidas aqui, o ácido utilizado foi o H_2SO_4 numa concentração de 0,5 mol L⁻¹ (pH=1), o qual devido a sua forte acidez em comparação a outros ácidos utilizados na anodização como ácido oxálico e ácido fosfórico, é capaz de produzir poros mais finos nos filmes de alumina.^[69-71]

Este filme ultrafino de alumina anódica apresenta uma fina camada de óxido, também conhecida como camada barreira, na base dos seus poros.^[70] A remoção desta camada barreira e o consequente aumento do diâmetro dos poros pode ser realizado empregando-se uma solução diluída de H₃PO₄, assim como demonstrado na Figura 3.2B. A imersão do substrato de silício com o filme de alumina dentro de uma solução de H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹ por 40 min. a 30 °C, resultou em poros com um diâmetro médio de aproximadamente 30 nm, como pode ser observado no histograma da Figura 3.2C. A distância (centro a centro) entre os poros mostrados na Figura 3.2B varia entre 63 e 75 nm, o que está de acordo com valores típicos descritos na literatura para filmes porosos de alumina produzidos sobre chapas de alumínio usando ácido sulfúrico ou soluções mistas de ácido sulfúrico/ácido oxálico.^[50,69,71] Este é um aspecto importante, pois ele indica que mesmo com a redução do stress mecânico na interface metal/óxido durante a anodização, os filmes porosos de alumina ultrafina apresentam características geométricas similares a aqueles de filmes de alumina com espessura micrométrica. A versatilidade para modular o tamanho dos poros é demonstrada através do controle no tempo de imersão da alumina dentro da solução de H₃PO₄ (Figura 3.3). Este processo de corrosão pode ser usado não só para o aumento no diâmetro dos poros, mas também para a remoção da camada barreira na base destes.



Figura 3.3 – A), B) e C) Micrografias de MEV de filmes ultrafinos de alumina produzidos sobre a superfície de Si/SiO₂ após a etapa de corrosão por 25, 30 e 35 min. com H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. As escalas das figuras são de 200 nm. O tamanho médio dos poros após cada período de corrosão foi de 18, 23 e 27 nm para as micrografias mostradas em A, B e C, respectivamente.

A Figura 3.4 exibe uma micrografia transversal do filme de alumina mostrado na Figura 3.2B. Através desta, é possível observar que a espessura da camada de alumina formada após o processo de corrosão em H_3PO_4 foi de aproximadamente 50 nm.



Figura 3.4 – Micrografia transversal do filme de alumina produzido sobre Si/SiO₂ após a etapa de corrosão por 40 min. com H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹. A escala da figura é de 100 nm. A figura inserida mostra uma imagem ampliada do corte transversal e as setas indicam a base dos poros.

A micrografia inserida na Figura 3.4 revela claramente que após a etapa de corrosão a camada barreira foi completamente removida da base dos poros. Este é um detalhe extremamente importante, pois ele possibilita a deposição de partículas metálicas diretamente na base dos poros. Os detalhes sobre a síntese de nanopartículas dentro dos poros da alumina serão discutidos na próxima seção.

3.2 Síntese das Nanopartículas de Au

Posteriormente a etapa de formação do filme de alumina porosa sobre Si/SiO₂, nanopartículas de Au foram sintetizadas dentro dos poros desta através do método de *bottom-up*, empregando-se para tanto um processo de redução química utilizando como redutor o reagente hidroquinona (HQ). A reação foi conduzida em duas etapas, onde durante um primeiro estágio um aparelho de ultrassom foi utilizado com a finalidade de acelerar o preenchimento dos poros com a solução mista de AuCl/hidroquinona através do fenômeno de capilaridade e promover assim um aumento no transporte de massa dos íons de Au(I) dentro destes. Estes íons de Au(I) que foram capturados nas paredes dos poros de alumina, onde a energia de superfície é supostamente alta, foram então espontâneamente reduzidos, já que o potencial de redução (E°) do íon Au(I) é extremamente positivo comparado com o da HQ, conforme mostrado através das semi-reações e reações a seguir:^[52]



$$Au^+ + e^- = Au^0$$
 $E^0 = 1,834 V$

A reação redox correspondente é então

Conforme estas, o potencial de oxi-redução para a célula pode ser descrito conforme a seguinte relação:

$$E_{cel} = E_{Au'/Au}^{+0} - E_{HQ/p-BQ}$$
 (Eq. 3.1)

Substituindo os respectivos valores nesta, o potencial determinado para a célula foi de 2,53 V vs EPH. Demonstrando-se assim que a reação ocorre de forma totalmente espontânea. Esta primeira etapa conduziu então a formação de pequenas partículas, as quais atuaram como sítios de nucleação para a deposição e crescimento das nanopartículas em uma segunda etapa. A Figura 3.5A mostra uma micrografia do filme de alumina após a primeira etapa de crescimento das partículas de Au dentro dos poros de alumina. Nesta, observa-se claramemente que pequenas partículas (indicadas por círculos) foram criadas dentro dos poros durante esta primeira etapa de redução. Após a segunda etapa, estas partículas cresceram e atingiram um tamanho médio de 28 \pm 5 nm, conforme exibido nas Figuras 3.5B e C. Um detalhe importante a se notar nestas micrografias é que embora um processo de redução química (o qual não possibilita um crescimento de partículas em áreas específicas) tenha sido empregado nesta síntese, percebe-se



Figura 3.5 – A) e B) Micrografias de MEV de um filme de alumina sobre a superfície de Si/SiO₂ após a primeira e a segunda etapa de redução galvânica para formação de nanopartículas de Au dentro dos poros da alumina respectivamente. Os círculos vermelhos na figura A indicam a formação de pequenas partículas de Au dentro dos poros. As escalas das figuras A e B são de 200 nm e 400 nm, respectivamente. C) Histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas de Au dentro dos poros da alumina após a segunda etapa de redução química.

que a grande maioria das nanopartículas cresceram dentro dos poros da alumina e seu tamanho foi limitado pelas dimensões destes poros. Embora não aplicado neste trabalho, técnicas físicas como evaporação térmica e deposição por vapor químico poderiam ser também utilizadas para a formação de nanopartículas neste substrato.^[66]

A síntese de nanopartículas de Au foi confirmada através da técnica de espectroscopia de raios X por dispersão em energia ou EDS (do inglês, *energy-dispersive x-ray spectroscopy*), dados não mostrados. Através das análises por difratometria de raios X (Figura 3.6) foi possível confirmaram também que as nanopartículas são policristalinas, com uma estrutura cúbica de face centrada, típica para partículas de Au sintetizadas via redução química. Os picos no difratograma em 38,2°, 44,3° e 64,5° foram atribuídos aos planos cristalinos (111), (200) e (220), respectivamente. Estes também estão de acordo com os padrões de difração de Au (PDF 04-0784).^[72]



Figura 3.6 – Difratograma de raios X das nanopartículas de Au produzidas nos poros da alumina.

A Figura 3.7A exibe uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão, demonstrando que poros e nanopartículas seguem uma razão de 1:1 (poro:nanopartícula), sem agregação de várias partículas dentro do mesmo poro, como é usualmente observado quando nanopartículas dispersas em uma solução que é gotejada sobre uma superfície, são imobilizadas dentro dos poros. Uma característica marcante para o acompanhamento visual do crescimento das nanopartículas de Au é a mudança da coloração da superfície de cinza escuro para verde

musgo quando as partículas atingem o topo dos poros. Este processo de síntese de nanopartículas adotado neste trabalho não é restrito a áreas relativamente pequenas e pode ser extendido para amostras maiores do que 1 cm², assim como observado na Figura 3.7B.



Figura 3.7 – A) Micrografia de TEM mostrando o arranjo de algumas nanopartículas de Au (AuNPs) dentro dos poros da alumina produzida sobre Si/SiO₂. As setas indicam as posições dos filmes de óxido assim como das partículas de Au. Durante a preparação da amostra para análise de TEM, o topo da amostra foi protegido com a deposição de uma camada de Pt. A escala da figura é de 50 nm. B) Fotografia de uma amostra de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs após a segunda etapa de redução galvânica para o crescimento das nanopartículas de Au. Devido ao crescimento das nanopartículas até o topo dos poros de alumina, a superfície da amostra apresentou uma coloração verde musgo.

3.3 Medidas de Capacitância de Nanopartículas utilizando um Eletrodo submicrométrico de Pt

Na primeira parte do trabalho experimental visou-se desenvolver um capacitor submicrométrico de Pt para a polarização das nanopartículas de Au crescidas dentro dos poros de alumina. O próposito destas medidas foi a caracterização da capacitância ao ar livre dos substratos de alumina contendo Au e ao mesmo tempo avaliar a viabilidade do uso de tais nanoestruturas metálicas como eletrodos de porta para os transistores de efeito de campo. A Figura 3.8A mostra uma micrografia do eletrodo de Pt depositado sobre uma amostra de alumina contendo

nanopartículas de Au. Nas Figuras 3.8B e C são mostradas as curvas de corrente por voltagem (I-V) do substrato com somente alumina e alumina contendo as nanoestruturas de Au. Estas medidas foram inicialmente realizadas visando determinar a tensão máxima que deveria ser aplicada para as respectivas medidas de capacitância versus voltagem (C-V). Assim, para evitar efeitos de fotocorrentes, todas as curvas foram realizadas em um ambiente na ausência de luz. A Figura 3.8B mostra a curva de I-V obtida para o substrato contendo as partículas de Au. Através desta, observa-se um comportamento não linear para I-V, indicando assim a formação de um capacitor. A Figura inserida mostra a condutância diferencial calculada a partir da curva de I-V. A resistência na tensão de 0 V foi estimada na ordem de 250 MΩ. Esta alta resistência reduz ou elimina as correntes de ligação ao longo do capacitor, portanto possibilitando um acoplamento/desacoplamento uniforme de cargas quando o capacitor é polarizado. A Figura 3.8C mostra a curva de I-V do capacitor formado somente no substrato de alumina sem Au. Conforme pode ser visto o capacitor exibe também um comportamento de I-V não linear, mas o início das correntes diretas e reversas ocorre agora em + 0.3 e - 0.3 V dc respectivamente, seguido de um rápido aumento da condutância. Resultados similares foram também observados por Das e Garman.^[73]


Figura 3.8 – A) Micrografia de FEG-MEV mostrando o eletrodo de Pt conectando as nanopartículas de Au. A escala é de 500 nm. A figura inserida mostra o pad de contato conectando o eletrodo de Pt. Nesta, a escala corresponde a 10 μm. B) e
C) Curvas de I-V para os capacitores fabricados contendo as nanopartículas de Au e também o capacitor controle, respectivamente. A figura inserida na parte superior esquerda da Figura B representa uma ilustração da configuração das medidas. Os gráficos inseridos na parte inferior a direita mostram as curvas de condutância versus voltagem derivadas a partir das curvas de I-V para cada amostra.

Os resultados das curvas de C-V são apresentados nas Figuras 3.9A-D. A Figura 3.9A exibe os resultados das curvas de C-V normalizados para o capacitor polarizado com os nanoeletrodos de Au e também para o capacitor com somente alumina, chamado aqui também de capacitor controle. Os dados foram normalizados considerando $\Delta C/\Delta C_s$, onde ΔC corresponde a diferença entre uma capacitância específica medida e a capacitância mínima, enquanto ΔC_s é a diferença entre a capacitância de acumulação e a de inversão observadas nas curvas de C-V para o capacitor polarizado com os nanoeletrodos de Au.



Figura 3.9 – A) Curvas de C-V normalizadas para o capacitor de alumina sem Au (AAO) (em preto) e com Au (AAO/Au) (em vermelho) respectivamente. B) e D) Curvas de C-V para o capacitor AAO/Au polarizado com diferentes janelas de voltagem. C) Curva de C-V simulada usando o software Sentaurus.

É válido mencionar que embora ambos capacitores apresentem uma voltagem de limiar similar (~ 2,8 V), o capacitor polarizado com as nanoestruturas de Au exibe uma voltagem de bandaplana de 0,1 V e uma camada de acumulação levemente maior do que o capacitor polarizado com somente alumina, o qual a voltagem de banda-plana é de - 0,7 V. Este valor negativo de voltagem de banda-plana para o capacitor controle se deve principalmente a presença de cargas fixas no óxido e cargas de interface que tendem a modificar o potencial de superfície deslocando a curva de C-V.^[34,35] As curvas de C-V em duas janelas diferentes de voltagem são mostradas nas Figuras 3.9B e D. A partir destas curvas as seguintes conclusões foram tomadas: Primeiramente, as curvas de C-V do capacitor polarizado com os nanoeletrodos de Au exibem um comportamento típico de um capacitor MOS com dimensões de algumas centenas de micrômetros, isto é, houve a formação de uma camada de acumulação-depleção-inversão. Segundo, a voltagem de banda plana é de 0,1 V e é independente da voltagem de varredura. Além disso, nenhuma histerese é observada. Estas observações são interessantes, pois elas mostram que o capacitor polarizado com os nanoeletrodos de Au exibe um comportamento quase ideal, ou seja, aplicando-se uma pequena voltagem negativa cargas podem ser injetadas no metal inserido dentro da matrix dielétrica. Para remover estas cargas, aplica-se agora uma pequena voltagem positiva aos nanoeletrodos de modo que todas as cargas serão transferidas novamente para o eletrodo de Pt sem que ocorra perdas ou dissipação (histeresis), assim como mostrado através das curvas. Por terceiro, a capacitância medida na camada de acumulação é relativamente alta, (~ 24 pF), comparando este com os dados simulados (Figura 3.9C) onde o máximo de capacitância estimado está em torno de 10-15 fF, os valores medidos representam um aumento de 24 vezes. A disparidade entre estes resultados são atribuídas a configuração 3D do capacitor e a distribuição de carga em torno dos nanoeletrodos, pois estes apresentam uma distribuição de tamanho de 27 ± 12 nm, enquanto que para o caso das partículas simuladas o tamanho foi considerado constante. Desta forma, a área superficial e consequentemente as cargas estocadas mudam a distribuição de campo elétrico através do dielétrico, aumentando assim a capacitancia total (capacitância devido aos nanoeletrodos metálicos e a capacitância devido ao substrato de alumina), mesmo quando comparado com somente alumina. Adicionalmente, este valor de 24 pF é um dos maiores já reportados na literatura para capacitores polarizados com metais nobres.^[74,75]

As duas camadas de acumulação observadas na Figura 3.9D foram associadas às cargas de superfície, isto é, aos elétrons livres presentes nos nanoeletrodos de Au e sua energia de superfície, de modo que o comportamento da capacitância na primeira camada de acumulação está num alcance de voltagem entre + 3 V e + 7.5 V. Invertendo a polarização e aumentando a tensão aplicada num alcance negativo conduz a observação de uma segunda camada de acumulação. Esta ocorre pois durante as etapas de acoplamento/desacoplamento, elétrons são transferidos temporariamente para o substrato e então sofrem um processo de retroespalhamento, o que implica em dizer que a capacitância observada não é somente resultado dos nanoeletrodos de Au, mas também devido a uma contribuição do substrato.^[76-78]

3.3.1 Armazenamento de cargas

De um ponto de vista prático, é importante se conhecer o tempo de decaimento de cargas quando o capacitor é polarizado. Para realização destas medidas, ambos capacitores foram polarizados por 5 s com uma tensão de 10 V. Após então, curvas de carga versus tempo foram registradas polarizando o dispositivo com uma tensão de + 2 V e acompanhando o decaimento das carga durante um período de 1220 s. O resultado desta análise é mostrado na Figura 3.10. Nesta, pode ser observado que um decaimento de aproximadamente 25 % ocorre durante os primeiros 540 s. Este rápido decaimento inicial é correlacionado a transferência de carga para o substrato. Este mecanismo tem sido nos últimos extremamente proposto na literatura.^[79,80] Após este rápido decaimento inicial, a retenção de carga remanesce quase constante, com um decaimento de somente 2 % durante os últimos 680 s. Estes resultados corroboram o potencial do dispositivo desenvolvido, não são somente para aplicações neste trabalho, mas também para outras que requerem uma estocagem de uma alta densidade de carga com baixa dissipação de calor. Os resultados apresentados nesta seção foram publicados no periódico Applied Physics A: Materials Science & Processing (2009), 94, 831-836. Na próxima seção serão apresentados os resultados das caracterizações de capacitância das mesmas superfícies em solução aquosa.



Figura 3.10 Decaimento de carga no capacitor de AAO/Au ao longo do tempo. A Figura inserida mostra o decaimento de carga aplicando-se diferentes tensões durante 1220 s.

3.4 Medidas de Capacitância em Solução utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A partir de agora todos os experimentos e caracterizações realizadas foram feitas no Instituto de Bionanoeletrônica 2 (IBN-2) do centro de pesquisa de Juelich na Alemanha.

Após a caracterização da capacitância ao ar livre das superfícies de alumina e alumina contendo nanopartículas de Au, a próxima etapa do trabalho antes da fabricação dos transistores envolveu a caracterização da capacitância destas superfícies em solução aquosa contendo KCl 100 mmol L^{-1} e tamponadas com K₂B₄O₇ 8 mmol L^{-1} em diferentes pHs. Como descrito na parte experimental, esta etapa foi realizada utilizando-se a técnica de EIE onde as características de capacitância das superfícies em função frequência e da voltagem de polarização foram analisadas. Desta maneira, a primeira parte (sub-seção 3.4.1) desta seção irá tratar das

características de capacitâncias das amostras em condições experimentais próximas das condições fisiológicas para análise de células eletrogênicas. Na sub-seção 3.4.2 serão tratados a dependência da capacitância em função do pH e os aspectos cinéticos de protonação/desprotonação das superfícies.

3.4.1 Caracterização de Capacitância Interfacial

Considerando que as amostras em solução formam uma estrutura genérica com um semicondutor, um dielétrico e uma solução de eletrólitos, um circuito elétrico conveniente para modelar estas superfícies é o circuito de Randles. Neste, a resistência do eletrólito R_s , a qual é conectada em série com a resistência R_p e a capacitância C_p da superfície é considerada insignificante e a seguinte impedância Z para este circuito pode ser dada por:

$$Z = Z' + iZ'' = \frac{1}{\left(\frac{1}{R_p} + i\omega C_p\right)}$$
 (Eq. 3.2)

Nesta, Z['] e Z^{''} correspondem as partes reais e imaginárias dos complexos de impedância, enquanto ω representa a frequência angular. Desta forma, resolvendo C_p para a impedância medida, a seguinte expressão para a capacitância pode ser obtida

$$C_p = \frac{-Z''}{\omega(Z'^2 + Z''^2)}$$
(Eq. 3.3)

A Figura 3.11 mostra as curvas de C-V para as superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs.



Figura 3.11 Curvas de capacitância versus voltagem para as amostras analisadas. Os termos PF e PA nas legendas significam somente anodizada e anodizada e submetida a abertura de poros, respectivamente.

Todas as curvas mostradas na Figura 3.11 foram medidas em uma frequência fixa em 1000 Hz (1kHz). A escolha desta foi baseada no tempo de duração dos sinais eletrofisiológicos demonstrado pelas células, os quais usualmente ocorrem em torno de 1 ms.^[21] Assim, a capacitância medida em 1 kHz constitui uma parte relevante da capacitância de entrada durante o crescimento de uma célula sobre a área ativa de um transistor. Adicionalmente, nesta frequência a influência da resistência do eletrólito, a qual é mantida em série com o capacitor é suficientemente baixa e não interferiu na capacitância das superfícies em análise. Como visto através da Figura 3.11, a capacitância das amostras com alumina foi comparada com a de uma amostra referência formada apenas por Si/SiO₂ e esta apresentou capacitância maior do que das amostras de alumina sem nanopartículas. Estes resultados podem ser compreendidos considerando-se que a soma das capacitâncias de cada filme de óxido sobre a superfície está em série com a capacitância total (C_T) da superfície, como mostrado na equação a seguir:

$$\frac{1}{c_T} = \frac{1}{c_{SiO_2}} + \frac{1}{c_{Al_2O_3}}$$
(Eq. 3.4)

nesta, C_{SiO_2} e $C_{Al_2O_3}$ representam as capacitâncias do SiO_2 e da Al₂O_3 respectivamente. Assim, a capacitância total da superfície tenderá a ser menor com a adição de novos filmes sobre ela. Comparando-se também a capacitância das amostras de alumina antes (Al₂O₃-PF) e após (Al₂O₃-PA) a abertura de seus poros em H₃PO₄, verificou-se que a capacitância desta previamente a etapa de corrosão é muito menor do que aquelas com poros abertos. Esta diferença é atribuída a maior área superficial e consequentemente ao maior fluxo e adsorção de íons nos poros da alumina corroída.

Considerando que a alumina possui uma estrutura porosa com uma área tridimensional (A_{3D}), a área desta pode ser estimada baseada nos parâmetros observados através das imagens de MEV usando a seguinte relação^[81]

$$A_{3D} = A_0 + \frac{\pi d_p h_p A_0}{sen \, 60^0 \, (\chi_p + d_p)^2}$$
(Eq. 3.5)

onde A_0 é a área bidimensional projetada (0,565 cm²) e d_p , h_p e χ_p correspondem ao diâmetro dos poros, a espessura do filme de alumina e a distância de separação entre os poros, respectivamente. Desta forma, assumindo que o diâmetro médio dos poros foi de 30 nm, que espessura da camada de alumina foi de 50 nm e que a distância entre os poros variou entre 63 a 75 nm, a área geométrica tridimensional calculada utilizando a Equação 3.5 foi de 0,893 cm². Este valor representa um aumento de aproximadamente 60% na área geométrica superficial em relação a A_0 . Conhecendo-se então as áreas superficiais, foi possível determinar-se a capacitância teórica (C_{Te}) para os filmes de SiO₂ e Al₂O₃ utilizando-se a Equação 3.6

$$C_{\text{Te}} = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 A_s}{h_p} \tag{Eq. 3.6}$$

nesta ε corresponde a constante dielétrica para o óxido, ε_0 é a permissividade do vácuo (8,8541 x 10^{-12} F m⁻¹) e A_s é a área superficial, no caso da alumina esta é equivalente a A_{3D}. A Tabela 3.1 apresenta os valores de capacitância teóricos calculados para SiO₂ e Al₂O₃ e os correspondentes valores encontrados experimentalmente.

Filme	3	$h_{\rm p}$ / nm	A_s / cm^2	C _{Te} / nF cm ⁻²	$C_{exp} / nF cm^{-2}$
SiO ₂	3.9	8.5	0,565	229	255 (± 20)
Al_2O_3	9.7	50	0,893	153	177 (± 15)

Tabela 3.1 – Parâmetros utilizados para o cálculo de capacitância teórica e comparados a capacitância experimental (C_{exp}) das superfícies de SiO₂ e Al₂O₃ (n=5).

Conforme esta, verifica-se que os valores encontrados experimentalmente para ambos filmes de óxidos são muito próximos dos valores calculados para as capacitâncias teóricas. Os possíveis erros relacionados as medidas experimentais podem ser atribuídos a adsorção de íons na superfície e também a erros nas áreas geométricas calculadas, especialmente para alumina pois muitos poros apresentam um formato cônico ao invés de tubular como considerado para o cálculo. De fato, a área tridimensional estimada para a alumina pode ser muito maior do que a área calculada. Assumindo por exemplo que a área de único poro após o processo de corrosão é de cerca de $6,12 \times 10^{-11}$ cm² e multiplicando-se esse pela quantidade total de poros (~ 140 x 10⁹ poros/cm²) em 1 cm², o aumento da área superficial total poderia ser estimado em aproximadamente 1520%, bem superior ao valor encontrado utilizando-se a Equação 3.5.

A presença das nanoestruturas de Au dentro dos poros da alumina proporcionou um aumento drástico na capacitância da amostra. Este aumento foi de cerca de 3 vezes em relação ao Si/SiO₂ e de 4,6 vezes em relação a amostra de Si/SiO₂/Al₂O₃ - PA. A grande área superficial proporcionada pelas nanopartículas de Au, assim como a sua alta quantidade de cargas interfaciais são atribuídas como as grandes responsáveis por esta capacitância relativamente mais alta em comparação as outras amostras. Como introduzido na sub-seção 1.2.5, esta alta densidade cargas interfaciais é capaz de gerar gradientes de campos elétricos que aumentam o número de espécies adsorvidas e portanto aumentam o número de dipolos formados na interface nanopartícula/solução, causando assim um aumento na capacitância interfacial.^[44,55] A presença de cargas na superfície das partículas pode ainda ser evidenciada através da histerese da curva de capacitância.

Além destas características de capacitância, um outro aspecto importante analisado foi a voltagem de ruptura dos filmes dielétricos formados na superfície do silício. A Figura 3.12 mostra as curvas semi-logarítmicas de corrente por voltagem (I-V) para as superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs. O perfil destas curvas segue as predições teóricas, isto é, em tensões relativamente baixas dois tipos de tunelamento ocorrem através das camadas

dielétricas, um direto e um outro via defeitos, como cargas presentes nos óxidos e no metal, para o caso das amostras contendo nanopartículas.^[82] Aplicando-se agora tensões relativamente mais altas, a corrente começa a aumentar moderadamente seguindo o mecanismo de tunelamento conhecido como Fowler-Nordheim até então atingir a tensão de ruptura (correntes > 5 x 10^{-7} A).



Figura 3.12 Curvas de corrente versus voltagem para as amostras de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs. Para as amostras de Si/SiO₂/Al₂O₃, os poros da alumina foram previamente corroídos por 40 min. em H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹. A voltagem de ruptura nas amostras é indicada por um aumento na corrente.

Este aumento nas correntes é mais pronunciado nas amostras contendo as nanopartículas e quase não é observável nas amostras de Si/SiO₂/Al₂O₃, o que confirma a boa isolação elétrica quando os filmes de alumina são formados no topo do SiO₂. A Tabela 3.2 lista as voltagens de ruptura e os respectivos campos elétricos para a ruptura do dielétrico nas amostras exibidas na Figura 3.12.

Tabela 3.2 – Voltagens de ruptura e os co	orrespondentes campos	elétricos	calculados a	partir das
curvas mostradas na Figura 3	3.12.			

Superfície	Voltagem de ruptura / V	Campo elétrico de ruptura / MV cm ⁻¹
Si/SiO ₂	2	2,35
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃	>>2	>> 0,35
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃ /AuNPs	1,25	1,5

Os valores encontrados para os campos elétricos de ruptura estão de acordo com valores observados na literatura que cita estes sendo da ordem de 1 a 30 MV cm^{-1. [82]} Estes valores de campo elétrico sugerem que mesmo na presença de baixos campos é possível que ocorra a ruptura da camada do dielétrico e portanto um controle cuidadoso na voltagem aplicada deve ser considerada durante a aplicação destes dispositivos. Para o caso da amostra de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, considera-se que as partículas de Au estejam em contato direto com a superfície de SiO₂, assim a espessura do filme considerado foi apenas a do SiO₂.

Os resultados apresentados nesta sub-seção demonstram que a presença de nanopartículas metálicas na superfície dos capacitores contribuem significativamente para um aumento nas propriedades de capacitância interfacial destas amostras. Embora as voltagens de ruptura das camadas dielétricas sejam relativamente pequenas, estes resultados indicam que a configuração de capacitores apresentado nanopartículas é extremamente promissora para o desenvolvimento de sensores baseados em mudanças capacitivas. Neste sentido, um ponto importante a se compreender é a dependência dos equilíbrios ácido-base na capacitância destas amostras. Assim, a próxima sub-seção irá apresentar os resultados desta dependência.

3.4.2 Caracterização dos Estados de Protonação/Desprotonação de Superfície utilizando a técnica de EIE

Como demonstrado até agora, a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica é uma ferramenta poderosa para análise de processos eletroquímicos envolvendo capacitâncias interfaciais. Considerando que a capacitância de superfície é sensível também aos equilíbrios ácido-base interfaciais, onde os processos de protonação/desprotonação de grupos funcionais na superfície conduzem a mudanças na capacitância interfacial total, a técnica de EIE representa uma excelente alternativa para monitorar tais processos de equilíbrio químico. Este princípio foi demonstrado pela primeira vez por Smith e White, os quais utilizaram a impedância eletroquímica para determinar o pK_a de grupos carboxílicos de moléculas de alcanotióis imobilizados em um eletrodo de Au.^[83]

Para a caracterização dos processos interfaciais de ionização dos grupos hidroxílas do SiO_2 e da Al_2O_3 nas três superfícies analisadas, empregou-se soluções aquosas com diferentes concentrações de KCl e também com diferentes pHs, os quais foram ajustados com $K_2B_4O_7$ 8

mmol L⁻¹. O uso de espécies eletroinativas neste caso foi essencial, pois desta forma evitou-se processos indesejados de eletro-oxidação nas superfícies, permitindo assim com que a capacitância das amostras fosse dominada somente pela capacitância interfacial total, isto é, a capacitância da dupla camada elétrica e a capacitância dos filmes de óxido. A capacitância interfacial total C_T das amostras em diferentes concentrações de KCl e também diferentes pHs foi calculada através da análise das curvas de Bode (Z versus log f) usando a seguinte relação:

$$Z = \frac{1}{j\omega C_T}$$
(Eq. 3.7)

onde j = $-1^{1/2}$. Em frequências intermediárias das curvas de Bode, a impedância Z apresenta um comportamento linear. A extrapolação desta região linear da curva de impedância para o eixo de Z onde $\omega = 1$ (log $\omega = 0$, f = 0,16 Hz) simplifica a Equação 3.7 para

$$Z_{(f=0,16 \text{ Hz})} = \frac{1}{c_T}$$
 (Eq. 3.8)

As Figuras 3.13A, B e C mostram as curvas de C_T versus pH em duas condições de força iônica (KCl 0,01 mol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹) para os três tipos de superfície analisadas. Conforme estas se observa claramente que nas três superfícies quando a concentração de KCl é de 0,01 mol L⁻¹ as curvas de capacitância apresentam um típico formato sigmoidal, com a capacitância das superfícies apresentando um máximo (região de acumulação) em meios mais alcalinos. Esta observação é consistente com a desprotonação dos grupos silanóis e aluminóis das superfícies de SiO₂ e Al₂O₃, respectivamente, os quais causam um aumento na queda do potencial da dupla camada elétrica e conduzem assim a um aumento da capacitância interfacial total. Graficando-se as curvas de capacitância com curvas sigmoidais de titulação (dado não mostrado) foi possível então determinar-se o pK_a para as três superfícies analisadas, sendo estes de 7,2, 7,45 e 7,6 para Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/Au-NPs, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com valores de pK_a determinados para superfícies de SiO₂ e Al₂O₃ utilizando-se outras técnicas.^[84,85] A dependência de C_T em função do grau de ionização dos grupos funcionais nas superfícies foi corroborada através dos experimentos utilizando KCl 0,1 mol L⁻¹. Neste caso, a curva sigmoidal não foi observada e a capacitância das superfícies foi praticamente constante

dentro de toda a faixa de pH analisada, isto pois, a capacitância da dupla camada elétrica foi muito superior a capacitância do filme. Esta observação experimental está de acordo com modelos teóricos que predizem que os efeitos de potencial e pH na capacitância são mínimos quando a força iônica da solução é relativamente alta.^[83,86-88]



Figura 3.13 A), B) e C) Curvas de capacitância interfacial total versus pH para as superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/Au-NPs, respectivamente. As medidas foram realizadas em soluções de KCl 0,01 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹ com uma polarização de 0 V vs Ag/AgCl.

Estes resultados são importantes, pois eles demonstram que as propriedades capacitivas dos filmes analisados neste trabalho são extremamente dependentes do equílibrio ácido-base em suas superfícies. Assim do ponto de vista prático, um outro parâmetro importante a se considerar são os processos cinéticos de ionização destas superfícies e a densidade de estados eletricamente ativos nestas quando expostas a soluções com pHs fisiológicos. As reações de ionização para as superfícies consideradas neste trabalho podem ser descritas como:

S-OH
$$\xrightarrow{k_1}$$
 S-O⁻ + H⁺

para condições fisiológicas onde o pH das soluções encontra-se normalmente entre 7,2 a 7,4, a reação direta de formação dos grupos silanóis ou aluminóis (-S-O⁻) como visto através dos valores de pK_a é extremamente favorecida. Desta maneira, os grupos -S-O⁻ que contribuem efetivamente para a capacitância interfacial dos filmes de óxidos são chamados de grupos eletricamente ativos. Em termos de circuito elétrico, as interfaces semicondutor-óxido/solução podem ser genericamente modeladas com um circuito de Randles como descrito na sub-seção 3.4.1. Nesta, é importante considerar que a capacitância do filme de óxido, a qual contribui para a capacitância interfacial total, esta conectada em série a capacitância de espaço de carga presente no semicondutor. No caso da presença de grupos eletricamente ativos na superfície, estes induzem a uma impedância/capacitância interfacial do filme adicional ao circuito, que pode ser caracterizada também pela técnica de EIE. Um modelo simples baseado nos processos de geração e recombinação de cargas na superfície de semicondutores foi adaptado aqui para caracterização destes processos cinéticos e de grupos eletricamente ativos, sendo este descrito a seguir.^[89-92]

Para a reação de ionização dos grupos silanóis/aluminóis mostrada anteriormente, a impedância correspondente a ionização dos grupos –SOH em função do tempo (t) pode ser dada por

$$dO'(t) / dt = k_2 O^0 a_{H_S^+} - k_1 O^-$$
 (Eq. 3.9)

onde O⁻ e O⁰ correspondem a densidade de grupos ionizados e não ionizados, e k_1 e k_2 são as constantes cinéticas de desprotonação e protonação das superfícies, respectivamente. O termo

 $a_{H_S^+}$ corresponde a atividade dos íons H⁺ na superfície das amostras. Numa condição de equilíbrio, a densidade de grupos ionizados pode ser descrita da seguinte maneira:

$$O^{-} = \frac{k_2 a_{H_s^+}}{k_1 + k_2 a_{H_s^+}} O_t$$
 (Eq. 3.10)

onde O_t é a densidade total de grupos ionizáveis ($O_t = O^- + O^0$). Para obter a impedância diferencial da ionização destes grupos funcionais, um pequeno potencial \tilde{E} de modulação, com uma amplitude E_a é sobreposto sobre o potencial aplicado E. Assim, o potencial total aplicado E' é definido como,

$$\mathbf{E}' = \tilde{\mathbf{E}} + \mathbf{E} \tag{Eq. 3.11}$$

com

$$\tilde{E} = E_a \exp(i\omega t)$$
 (Eq. 3.12)

nesta i = $\sqrt{-1}$. Por conveniência, a notação ~ nesta sub-seção será usada para todas as variáveis consistindo de uma parte dc e uma pequena parte ac. Para um pequeno sinal ac de amplitude modulada, a equação de distribuição de Boltzmann para a dependência do potencial de superfície em função da atividade dos íons H⁺ no seio da solução e na superfície dos óxidos é dada por:

$$a_{H_{S}^{+}} = a_{H_{B}^{+}} exp \frac{e\tilde{E}}{\kappa T}$$
 (Eq. 3.13)

onde *e* é a carga do elétron e a $a_{H_B^+}$ é a atividade dos íons H⁺ no seio da solução. Considerando então que um pequeno sinal de amplitude modulada é aplicado às amostras, a Equação 3.9 pode ser reescrita como:

$$dO^{-}(t) / dt = k_2 \tilde{O}^0 a_{H_s^+} + k_2 O^0 \tilde{a}_{H_s^+} - k_1 \tilde{O}^-$$
(Eq. 3.14)

Desta maneira, como $\tilde{O}^0 = -\tilde{O}^-$ e equivalentemente a Equação 3.9, $\tilde{O}^- = O_a exp(i\omega t)$, a Equação 3.14 pode ser reduzida para

$$\tilde{O}^{-} = \frac{k_2 O^{0}}{i\omega + k_1 + k_2 a_{H_s^+}} \tilde{a}_{H_s^+}$$
(Eq. 3.15)

O fluxo de elétrons j_e resultante da modulação do potencial aplicado pode ser avaliado a partir das Equações 3.13 e 3.15 como:

$$j_e = \frac{d\tilde{0}^-}{dt} = -\frac{e}{\kappa T} k_2 0^0 a_{H_S^+} \frac{i\omega}{i\omega + k_1 + k_2 a_{H_S^+}} \tilde{E}$$
(Eq. 3.16)

A impedância diferencial Z correspondente é assim dada por

$$Z = -\frac{\tilde{E}}{ej_e} = -\frac{\kappa T}{e^2} (k_2 0^0 a_{H_s^+})^{-1} \left(1 + \frac{k_1 + k_2 a_{H_s^+}}{i\omega}\right)$$
(Eq. 3.17)

Esta equação mostra que a impedância diferencial é equivalente a uma resistência conectada em série a um capacitor (circuito RC). Desta forma, é mais conveniente converter este circuito em série a um em paralelo, onde a capacitância em paralelo é dada como uma soma das capacitâncias da camada de carga espacial (C_{sc}) e dos grupos eletricamente ativos (C_{EA}) em função da frequência. Assim, C_{EA} é definido como

$$C_{\rm EA}(\omega) = -\frac{e^2}{\kappa T} \left(\frac{k_1 k_2 a_{H_s^+}}{\omega^2 + (k_1 + k_2 a_{H_s^+})^2} \right) O_t$$
(Eq. 3.18)

Experimentalmente, C_{EA} pode ser obtido pela subtração de C_{sc} e dependendo da frequência a Equação 3.18 pode ser escrita como

$$\omega^{2} << (k_{2}a_{H_{s}^{+}} + k_{1})^{2} \qquad C_{\text{EA}}(\omega) = -\frac{e^{2}}{\kappa T} \left(\frac{k_{1}k_{2}a_{H_{s}^{+}}}{(k_{1} + k_{2}a_{H_{s}^{+}})^{2}} \right) O_{t} \qquad (\text{Eq. 3.19a})$$

$$\omega^{2} >> (k_{2}a_{H_{s}^{+}} + k_{1})^{2}$$
 $C_{EA}(\omega) = -\frac{e^{2}}{\kappa T} \left(\frac{k_{1}k_{2}a_{H_{s}^{+}}}{\omega^{2}}\right) O_{t}$ (Eq. 3.19b)

A baixas frequências (Equação 3.19a), a capacitância C_{EA} exibe um máximo com uma função do potencial em $k_2a_{H_s^+} + k_1$, o qual corresponde a um estado de ionização de 0.5 (Equação 3.10). A partir desse máximo de C_{EA} é possível então determinar-se a densidade total de grupos ionizáveis usando a seguinte relação

$$C_{EA}(\max) = \frac{1e^2}{4\kappa T}O_t$$
 (Eq. 3.20)

A partir do máximo de capacitância das curvas de C – V pode-se desta maneira determinar a baixas frequências a densidade de grupos ionizáveis. Para altas frequências (Equação 3.19b), C_{EA} é esperada ser proporcional a ω^{-2} e os grupos ionizáveis já não respondem a estas frequências, não havendo assim máximo de capacitância em função da voltagem.

As Figuras 3.14A e C mostram as curvas de capacitância interfacial versus voltagem aplicada para as amostras de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃ em solução de KCl 0,01 mol L⁻¹ e pH 7,8 em diferentes frequências, respectivamente. Como já observado através da Figura 3.10, estas curvas de capacitância exibem uma forma sigmoidal com o máximo de capacitância apresentando uma dependência com a frequência. Em altas frequências, o máximo de capacitância desaparece e somente um pico em torno de 0 V é observado, indicando assim que os processos responsáveis pela capacitância interfacial não respondem mais a estas frequências. Tomando-se o máximo das capacitâncias interfaciais e descontando-se capacitância de carga espacial ($\Delta C_P = C_T - C_{SC}$) obtem-se a capacitância interfacial em função dos estados eletricamente ativos. As Figuras 3.14B e D mostram a dependência do log de ΔC_P em função da frequência para as curvas mostradas em A e C, respectivamente. Em ambos casos (Figuras 3.14 B e D) para frequências abaixo de 10 kHz, onde $\omega^2 \leq (k_2 a_{H_s^+} + k_1)^2$, ΔC_P demonstra um *plateau*. Em frequências acima de 10 kHz onde $\omega^2 >> (k_2 a_{H_s^+} + k_1)^2$, ΔC_P decai linearmente e o coeficiente angular destas região se aproxima de -2, indicando que ΔC_P é proporcional a ω^{-2} de acordo com a Equação 3.19b. Assumindo que na região da frequência de corte $\omega^2 = (k_2 a_{H_s^+} + k_1)^2$ e $k_2 a_{H_{\epsilon}^+} = k_1$ no potencial de capacitância máxima, as constantes k_1 e k_2 foram desta forma determinadas. A Tabela 3.3 mostra as frequências de corte e os correspondentes valores obtidos para $k_1 e k_2$ em cada superfície. O valor, considerando para $a_{H_s^+}$ foi de 1,6 x 10⁻⁸ mol⁻¹ (pH 7,8).



Figura 3.14 A) e C) Curvas de capacitância interfacial total versus voltagem em diferentes frequências para as superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃, respectivamente. B) e D) log ΔC_P versus frequência. Os valores de ΔC_P foram tomados a partir dos máximos de capacitância para as curvas mostradas em A) e B), respectivamente, e corrigidos para a capacitância de carga espacial.

Tabela 3.3 – Frequência de corte e valores calculados para as constantes cinéticas de protonaçãoe desprotonação dos grupos S-OH dos filmes de óxido.

Superfície	Frequência de corte / Hz	k_1 / s mol ⁻¹	<i>k</i> ₂ / s
Si/SiO ₂	1584	3,21 x 10 ⁻⁶	80,25
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃	10094	6,25 x 10 ⁻⁹	0,15

Conforme mostrado na Tabela 3.3, os valores obtidos de k_1 e k_2 demonstram claramente que na condição de pH utilizada, a qual foi levemente superior aos valores de pK_a determinados, as

superfícies estão predominantemente desprotonadas (S-O⁻), isto pois a razão desprotonação ocorre muito mais rapidamente do que o processo inverso de protonação. Para o caso de medidas em meios ácidos, as constantes k_1 e k_2 devem ser invertidas nas fórmulas mostradas anteriormente. Estes resultados, ainda que preliminares demonstram que o modelo apresentado nesta sub-seção pode ao menos de forma qualitativa descrever através da técnica de EIE a formação de sítios elétricos na superfície de óxidos.

Para a determinação de quantos destes sítios estão eletricamente ativos nas superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃ em função do pH, utilizou-se os valores de capacitância das Figuras 3.13A e B e a Equação 3.20 para se calcular a densidade total de grupos ionizáveis, Figuras 3.15A e B. Para ambas as curvas, observa-se um formato sigmoidal com uma densidade de grupos ionizáveis de cerca de 10^7 cm⁻² para pHs baixos seguido de um aumento mais abrupto em pHs em torno 6 até atingir um valor quase constante de 7 x 10^9 cm⁻² para Si/SiO₂ e 6 x 10^8 cm⁻² para Si/SiO₂/Al₂O₃ após pH 8. Estes resultados estão de acordo com o pK_a das superfícies para desprotonação dos grupos S-OH em pHs acima de 7,5. Neste momento, é importante considerar que durante as medidas as amostras de silício tipo p são polarizadas pela parte de baixo, assim, na ausência da aplicação de um potencial externo (V = 0 V), o acúmulo ou depleção de portadores (lacunas) na superfície do semicondutor é dominado somente pelas cargas presentes na superfície dos óxidos. Desta forma, quando cargas positivas como S-OH₂⁺ (meios ácidos) são acumuladas no óxido, as lacunas serão depletadas da superfície do semicondutor e a capacitância interfacial total será consequentemente diminuída. No caso do acúmulo de cargas negativas como S-O⁻ (meios alcalinos) no óxido, o processo inverso ocorrerá e a capacitância interfacial será maior. Como a capacitância dos óxidos é inversamente proporcional as suas espessuras, esta desempenha um papel fundamental na determinação da densidade de cargas superficiais, pois para filmes muito espessos a resistência elétrica do filme irá sobrepor as contribuições puramente capacitivas, e consequentemente os valores de capacitância medidos serão menores.



Figura 3.15 A) e B) Densidade total de grupos ionizáveis versus pH para as superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃, respectivamente. As curvas foram calculadas a partir das Figuras 3.13A e B utilizando a Equação 3.20.

Esta observação é consistente com os dados mostrados nas Figuras 3.15A e B, onde a densidade máxima de grupos ionizáveis dos filmes de alumina foram menores do que aqueles para os filmes de SiO₂, mostrando portanto uma das limitações deste modelo para a determinação da densidade de grupos ionizáveis em óxidos muito espessos.

De uma maneira geral, os resultados apresentados nesta seção 3.4 demonstraram que as superfícies analisadas apresentam uma sensibilidade ao potencial de superfície quando expostas a diferentes pHs. As medidas de capacitância mostraram também que a presença das nanopartículas na superfície dos filmes realça a capacitância interfacial total e demonstra-se uma ferramenta promissora para aplicação destas na porta de FETs. Baseado nestas observações, a próxima seção irá apresentar os resultados da fabricação dos FETs nanoestruturados e suas caracterizações elétricas em solução.

3.5 Fabricação e Operação de Transistores de Efeito de Campo

Após a fabricação e caracterização elétrica ao ar e em solução dos capacitores contendo alumina anódica e nanopartículas de Au, os transistores de efeito de campo foram fabricados. Na Figura 3.16 são mostradas imagens de microscopia óptica dos FETs produzidos em um chip antes da etapa de formação do filme de alumina anódica em sua superfície. Conforme visto nesta, os chips com dimensões de 5 x 5 mm, possuem em seu centro 16 FETs arranjados em uma matriz de 4 x 4. As dimensões de comprimento por largura dos respectivos transistores é de 12 x 7 μ m, enquanto a distância centro a centro entre cada transistor é de 100 μ m. Transistores com dimensões de 25 x 7 μ m (comprimento e largura, respectivamente) foram também produzidos.



Figura 3.16 Imagens de microscopia óptica das portas de um FET produzido conforme o processo descrito anteriormente.

A Figura 3.17A mostra uma ilustração do design final dos FETs produzidos após a etapa de formação do filme de alumina anódica sobre os chips. A passivação das áreas de contato dos transistores foi realizada com uma camada de nitreto de silício/óxido de silício/nitreto de silício (ONO), que ao final apresenta uma espessura de 1 μ m. Na Figura 3.17B é mostrada uma imagem de MEV da porta de um FET (12 x 7 μ m) contendo a alumina porosa em sua superfície. A

Figura 3.17C exibe uma imagem de maior magnificação desta camada de alumina (ampliada do retângulo vermelho na Figura 3.17B). O diâmetro médio dos poros formados varia entre 20 e 35 nm, o que proporciona uma média de cerca de 150 poros por μ m². Uma micrografia mostrando uma visão lateral dos poros formados é apresentada na Figura 3.17D. A partir desta é possível estimar que a espessura do filme de alumina formado é de 50 nm. A Figura 3.17D também mostra que os poros se estendem diretamente até o substrato, o que representa uma característica importante, pois possibilita que eletrólitos possam se difundir pelos poros até alcançarem a superfície do SiO₂, minimizando assim a resistência elétrica na porta dos FETs.



Figura 3.17. A) Ilustração do design final de um ISFET possuindo uma camada de alumina em sua porta. B) Micrografia de uma porta possuindo alumina. C) Micrografia com alta magnificação da região destacada com a caixa em vermelho em B). D) Micrografia do perfil da camada de alumina sobre o substrato.

Na Figura 3.18 é mostrada uma micrografia da extremidade de um FET anodizado (Figura inserida) e exposto a solução de H_3PO_4 0,1 mol L⁻¹ por 40 min. Comparando-se esta micrografia com a da região central de um outro FET (Figura 3.17C), percebe-se claramente que



Figura 3.18 Micrografia da extremidade inferior esquerda de um FET mostrado na Figura inserida após anodização e corrosão em H_3PO_4 0,1 mol L⁻¹ por 40 min. A barra de escala corresponde a 1 μ m.

os poros da alumina apresentam as mesmas dimensões independentes da posição da área da porta do transistor. Além disso, as mesmas características geométricas como, diâmetro dos poros, distância entre os poros e espessura apresentada pelos filmes ultrafinos de alumina anódica produzidos sobre Si/SiO₂ mostrados na seção 3.1, foram também reproduzidas sobre os transistores. A fabricação destes filmes de alumina anódica sobre os FETs confere a estes características importantes para sua aplicação como sensores. Por exemplo, a área superficial das portas dos FETs foi aumentada em cerca de 1520% em comparação com transistores que possuem somente SiO₂, sugerindo assim que uma quantidade relativamente grande de biomoléculas, como por exemplo enzimas, podem ser imobilizadas nestas áreas o que possibilita a aplicação destes biosensores para o reconhecimento específico de eventos mediados por estas espécies.

A formação destes filmes anódicos sobre os FETs permitiu também o emprego destes como moldes para o crescimento de nanopartículas de Au sobre os transistores. As Figuras 3.19A e B mostram micrografias representativas de um transistor contendo nanopartículas de Au em sua superfície. Conforme estas é possível observar que as partículas de Au possuem um diâmetro médio equivalente ao diâmetro dos poros e similar as partículas descritas na seção 3.2,

isto é, cerca de 30 nm. De maneira geral, através da análise da Figura 3.19A é possível estimar que cerca de 80% das portas dos transistores foram recobertas com as nanopartículas de Au.



Figura 3.19 A) Micrografia da porta de um FET após a deposição de nanopartículas de Au dentro dos poros de alumina cobrindo a sua superfície. A barra de escala é de 5 μm. B) Imagem de MEV de maior magnificação da área marcada pelo quadrado em vermelho na figura A mostrando as nanopartículas de Au na superfície do FET. A barra de escala é de 400 nm.

3.5.1 Caracterização Elétrica de Transistores de Efeito de Campo

A caracterização elétrica dos respectivos transistores produzidos foi realizada conforme especificado na seção 2.3.8. Para tanto, os chips foram conectados a uma caixa amplificadora na qual os transistores foram eletricamente ligados, conforme mostrado na ilustração da Figura 3.20.



Figure 3.20 Ilustração demonstrando um ISFET de canal p e suas conexões elétricas. Em destaque os eletrodos de fonte e o dreno (Si-p) e a solução eletrolítica com o eletrodo de referência, o qual atua como um eletrodo de porta. As linhas de contato para fonte e dreno foram isoladas eletricamente da solução eletrolítica por uma camada de ONO.

Nas Figuras 3.21A-I são apresentadas as curvas de $I_{DS} - V_{DS}$, $I_{DS} - V_{GS}$ e as curvas de transcondutância (g_m) para transistores referências contendo apenas SiO₂ na porta, transistores contendo SiO₂/Al₂O₃ e transistores contendo SiO₂/Al₂O₃/AuNPs. As Figuras 3.21A, B e C mostram as curvas de $I_{DS} - V_{DS}$ para as amostras referências e amostras com as nanoestruturas, respectivamente. Através destas é possível observar que quando aplicamos um valor de V_{DS} entre 0 e -0,15 V e um valor de V_{GS} entre 0 e -2 V a relação $I_{DS} - V_{DS}$ apresenta-se linear mostrando portanto, um comportamento ôhmico. Esta região é conhecida também como região de triodo ($V_{DS} = V_{GS} - V_T$). Esta relação linear entre I_{DS} e V_{DS} nesta região ocorre porque neste momento o canal de condução na porta é contínuo.^[34,36] A partir deste ponto, o transistor começa a operar na região de saturação, isto é, à medida que começamos a aumentar o valor de V_{DS} o canal da porta se torna mais estreito e sua resistência aumenta consecutivamente.^[34,36] Como

resultado a curva I_{DS} - V_{DS} sofre o respectivo encurvamento. O aumento excessivo de V_{DS} pode levar o canal de condução do transistor a sofrer um fenômeno conhecido como estrangulamento, ou seja, o canal se move discretamente do dreno para a fonte e o valor de V_{DS} não afeta mais o canal. Este fenômeno de modulação de comprimento do canal é chamado de efeito Early.^[34,36]



Figura 3.21 Caracterização elétrica de FETs produzidos antes e após anodização das portas, e após a deposição de nanopartículas de Au nos poros de alumina. A), B) e C) mostram curvas de I_{DS}-V_{DS} para FETs com SiO₂, SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs em suas portas, respectivamente. D), E) e F) exibem curvas de I_{DS}-V_{GS}, para FETs com SiO₂, SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs em suas portas, respectivamente.

Para o pMOS o canal de condução é formado basicamente por lacunas as quais apresentam mobilidade menor do que os elétrons livres, tornando as curvas I_{DS} - V_{DS} mais resistivas, ou seja, as curvas apresentam um perfil mais inclinado. Nas Figuras 3.21 D), E) e F) são apresentadas as curvas de I_{DS} - V_{GS}, enquanto as Figuras 3.21 G), H) e I) apresentam as curvas de transcondutância para os respectivos FETs. Nestas, a voltagem aplicada na porta dos transistores foi mantida constante em -3 V, enquanto a voltagem entre fonte e dreno foi variada entre 0 e -1 V. A partir das curvas de I_{DS} - V_{GS} foi possível determinar a tensão de limiar (V_T) dos transistores, ou seja, a tensão onde há a formação de um canal de condução entre fonte e dreno, que para este caso foi de -0,8 V. As curvas de transcondutância (gm) demonstram o desempenho dos FETs, isto é, sua capacidade de ganho ou amplificação de corrente. No caso de um FET, ela corresponde a razão da mudança da corrente do dreno sobre uma mudança de voltagem aplicada na porta. Os valores de gm determinados aqui estão dentro do alcance esperado para as dimensões dos transistores avaliados.^[34,36] Comparando os diferentes transistores, algumas pequenas diferenças, embora ainda não totalmente compreendidas, podem ser observadas e são atribuídas ao processo de anodização e formação de alumina na porta dos FETs, uma vez que durante este processo uma voltagem de 25 V, que pode gerar um campo elétrico de até 10⁷ V/m, é aplicada na parte frontal do chip, podendo assim afetar as regiões de fonte e dreno e mesmo a organização estrutural do cristal de Si. Uma mudança, por exemplo, nas regiões de fonte e dreno pode provocar uma alteração no comprimento efetivo de canal, o que por sua vez refletirá direto nas características elétricas como g_m e V_T dos FETs.

Para caracterizar a reprodutibilidade destas observações e confirmar que a voltagem de limiar (V_T) dos transistores não foi afetada de forma significativa pelo processo de anodização, realizou-se a caracterização elétrica de mais de 45 transistores de 10 chips independentes antes e após a formação do filme de alumina através da anodização. Estes resultados são exibidos nas Figuras 3.22A e B e demonstram que o V_T dos FETs após a anodização (Figura 3.22B) sofreu apenas uma leve mudança em comparação ao V_T dos mesmos FETs antes do processo anódico (Figura 3.22A).



Figure 3.22 A) e B) Histogramas de valores da voltagem de limiar de mais de 45 transistores antes e após o processo de anodização e corrosão dos poros da alumina em H₃PO₄ 0,1 mol L⁻¹ por 40 min, respectivamente.

Por exemplo, antes da anodização a voltagem de limiar média dos transistores foi de cerca de - 0,8 V, enquanto após o processo anódico o V_T médio foi de - 1,1 V. Esta pequena mudança pode ser atribuída como já mencionado ao alto campo elétrico estabelecido durante a anodização e também a presença de cargas fixas no filme de alumina.

De uma maneira geral, em cada chip fabricado, cerca de 80% dos transistores estavam funcionando apropriadamente, isto é, em condições de corrente e voltagem similares aos mostrados na Figura 3.21. Na Tabela 3.4 é apresentado um resumo das principais características elétricas dos FETs como as correntes de fuga (I_{GS}) e a razão de on/off para as três superfícies analisadas. Como visto, para os três casos as correntes de fuga são da ordem de picoampere, demonstrando assim um bom isolamento elétrico dos FETs. Além destas, verificou-se que a razão de on/off é relativamente alta, garantindo assim com que o chaveamento dos transistores possa ocorrer de forma eficiente durante suas polarizações. Os coeficientes angulares extraídos do regime sub-limiar demonstram também uma tendência para um maior aumento de corrente em função da mudança de voltagem no eletrodo de porta para FETs com nanopartículas, corroborando assim que a presença das nanopartículas aumenta a sensibilidade elétrica das superfícies. Por fim, estes resultados demonstram e asseguram claramente as características elétricas destes FETs para as etapas posteriores de sua aplicação.

FET	$g_m / \mu S$ (V _{DS} = -1 V)	V _T / V	I _{GS} / A	Razão de on/off	Coeficiente angular do regime sub-limiar / V dec ⁻¹
SiO ₂	200 ± 20	- 0,8	< 10 ⁻¹²	10^{4}	- 0,450
SiO ₂ /Al ₂ O ₃	180 ± 15	- 1,1	$< 10^{-12}$	10^{4}	- 0,983
SiO ₂ /Al ₂ O ₃ /AuNPs	170 ± 20	-1,3	$< 10^{-12}$	10^{4}	- 1,307

Tabela 3.4 – Parâmetros elétricos importantes extraídos das caracterizações dos transistores com dimensões de 12 x 7 μ m, comprimento e largura, respectivamente.

3.6 FETs como Sensores de pH

Baseando-se nos resultados de caracterização elétrica, a próxima etapa consistiu em caracterizar a influência do pH do meio no valor de V_{GS} , através de experimentos de fluxo contínuo de soluções com diferentes valores de pH sobre os transistores produzidos. Para estes experimentos, priorizou-se a caracterização dos transistores formados por SiO₂/Al₂O₃ e SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, uma vez que as superfícies de Si/SiO₂ já foram caracterizadas em trabalhos prévios e exibem uma sensibilidade de 30 mV/pH.^[94]

Desta maneira, as primeiras caracterizações foram realizadas para as superfícies de SiO_2/Al_2O_3 . As medidas de I_{DS} em função do tempo e de soluções com diferentes pHs, demonstram que a corrente entre fonte e dreno diminui quando soluções com pH = 10 a 3 são inseridas sobre os FETs (Figura 3.23A).



Figura 3.23 A) Detecção em tempo real de I_{DS} quando o FET SiO₂/Al₂O₃ é exposto a soluções de pH 10 a 3. B) Ilustração esquemática mostrando o comportamento do canal condutor entre fonte e dreno quando a superfície do sensor esta exposta em meios alcalinos I e meios ácidos II. C) Dependência de V_{GS} em função dos diferentes pH na superfície dos FETs de SiO₂/Al₂O₃ D) Dependência de I_{DS} em função de pequenas variações de pH (0.3 unidades).

Este comportamento pode ser compreendido pela alteração do potencial de superfície devido as mudanças de pH na região de porta dos FETs. Esta dependência é descrita através da seguinte equação^[95]

$$\Delta \Psi = 2.303 \frac{\kappa_B T}{q} \cdot \alpha \cdot (pH_{pzc} - \Delta pH)$$
(Eq. 3.21)

onde $\Delta \Psi$ é a mudança de potencial de superfície induzido por uma determinada solução de pH, o termo $\kappa_B T/q$ corresponde a voltagem termal, onde κ_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e q é a carga do elétron. O fator α é um parâmetro de sensibilidade,

enquanto pH_{*pzc*} representa o potencial de carga zero do óxido e Δ pH é a variação de pH na superfície do sensor. A superfície do óxido apresenta grupos hidroxilas, que em meio aquoso podem estar tanto protonados como desprotonados, dependendo do pH do meio.^[95] Em meios altamente alcalinos os grupos hidroxila (-OH) estão desprotonados (-O⁻) e atuam como um eletrodo de porta, aplicando tensão negativa nesta, causando assim um aumento em I_{DS} devido a um aumento na densidade de lacunas no canal condutor entre fonte e dreno (Figura 3.23B, I). Em situações opostas, isto é, em meios ácidos, os grupos hidroxilas estão protonados $(-OH_2^+)$ e as cargas positivas na porta dos FETs causam uma depleção nos portadores de cargas majoritários (lacunas) presentes no canal condutor, fazendo desta forma com que a corrente de I_{DS} diminua (Figura 3.23B, II).^[38] Esta corrente de I_{DS} pode ser diretamente convertida para V_{GS}. A Figura 3.23C mostra uma variação linear de V_{GS} dentro da faixa de pH analisada. Todavia, a sensibilidade dos dispositivos foi de 16 mV/pH, o qual corresponde a um limite sub-Nernstiniano. Esta diferença em relação a uma resposta Nernstiniana pode ser atribuída a um aumento da resistência total em série da porta dos transistores devido à formação de uma nova camada (alumina anódica) em sua superfície. A Figura 3.23D demonstra que os FETs são capazes de diferenciar valores de pH com 0,3 unidades dentro uma faixa de pH fisiológico. Estes resultados são de extrema importância, pois possibilita que estes dispositivos possam ser aplicados em experimentos eletrofisiológicos visando a detecção de pequenas variações de pH em células, como por exemplo durante os processos sinápticos de liberação de neurotransmissores.

Nas Figuras 3.24A e B são apresentados os resultados referentes aos transistores contendo as nanopartículas de Au (SiO₂/Al₂O₃/AuNPs). Da mesma forma que foi observado para os transistores de SiO₂/Al₂O₃, verificou-se também, através da Figura 3.24A que a corrente de I_{DS} diminuiu de forma discreta quando soluções com pH 10 a 3 foram inseridas sobre os FETs. Este decréscimo de corrente em função do aumento da acidez da solução é consistente com o mesmo mecanismo descrito na Figura 3.23B. A variação de V_{GS} em função do pH para estas medidas foi linear conforme visto na Figura 3.24B, e a sensibilidade obtida para estes transistores foi de 34 mV/pH.



Figura 3.24 A) Detecção em tempo real da variação de I_{DS} quando FETs do tipo $SiO_2/Al_2O_3/AuNPs$ foram expostos a soluções de pH 10 a 3. B) Dependência de V_{GS} em função dos diferentes pH na superfície dos FETs (n = 5).

Este valor corresponde a um pouco mais do que o dobro obtido para SiO₂/Al₂O₃ e indica que a variação de potencial elétrico na superfície dos FETs pode ser realçada quando nanopartículas estão presentes sobre estes. Este é um aspecto importante destes transistores nanoestruturados, pois, este valor de sensibilidade é muito similar ao valor encontrado experimentalmente para as superfícies de Si/SiO₂, porém com uma área superficial muito superior. A razão desta maior sensibilidade pode ser atribuída às maiores variações de campo elétrico na superfície das partículas, as quais devido a sua natureza metálica e sua grande área superficial apresentam também uma alta densidade cargas, como elétrons.^[43,44] Desta forma, com a mudança de pH é naturalmente esperado que ocorra também uma mudança nos momentos de dipolo das espécies adsorvidas na superfície das partículas, afetando assim o gradiente de campo elétrico destas e

consequentemente mudando a magnitude do campo que modula a corrente entre fonte e dreno.^[42] Como já destacado, estas análises foram importantes e demonstraram que estes resultados são bastante promissores, de modo que nas próximas duas seções serão apresentados os resultados da aplicação destes FETs para a detecção de moléculas de neurotransmissores.

3.7 Imobilização de Tirosinase na Porta Porosa dos FETs e Detecção de Dopamina

Um dos objetivos deste trabalho é o uso dos respectivos FETs para a detecção de neurotransmissores como a dopamina, que é liberada por células como neurônios e PC12 através de vesículas durante os processos sinápticos.^[25,28] Portanto, para realizar a deteccão destas moléculas, utilizando os princípios de efeito de campo dos transistores, é necessário que haja uma mudança no potencial de superfície dos FETs. Esta mudança pode, por exemplo, ser devido a alterações do pH na superfície ou mesmo ser proveniente de alterações na densidade de cargas de macromoléculas adsorvidas na porta dos transistores. Baseando-se nos resultados do aumento de área superficial dos FETs com a formação de um filme de alumina anódica sobre estes, buscou-se nesta parte do trabalho desenvolver um sensor para detectar dopamina utilizando-se apenas a configuração de SiO₂/Al₂O₃. Assim, umas das formas para desenvolver uma superfície seletiva e sensível a alterações de potencial durante a detecção de moléculas como dopamina, é a imobilização de macromoléculas biológicas como enzimas específicas, que são não só capazes de reconhecer seletivamente estes neurotransmissores, mas também gerarem ao mesmo tempo uma alta densidade de cargas na porta dos ISFETs. Desta maneira, uma das enzimas específicas para o reconhecimento de catecolaminas como dopamina, é a enzima tirosinase (monofenol monooxigenase).^[96]

A enzima tirosinase é uma metaloenzima contendo dois íons de $Cu^{I/II}$ em seu sítio ativo, os quais o estado de valência depende da ligação destes com oxigênio molecular.^[96,97] Por exemplo, o sítio ativo pode ser encontrado em três estados intermediários, isto é, na forma *deoxi* ($Cu^{I}-Cu^{I}$), na forma *oxi* ($Cu^{II}-O_2-Cu^{II}$) ou ainda na forma *met* ($Cu^{II}-Cu^{II}$). Estes três estados determinam a habilidade da tirosinase de ligar-se ao substrato, deste modo, determinam a cinética da reação. Na forma *met* a enzima pode se ligar com difenóis e subsequentemente oxidar estes a o-quinonas, convertendo por sua vez seu sítio catalítico na forma *deoxi*. Nesta forma, a

enzima é capaz de se ligar reversivelmente com oxigênio molecular, convertendo assim seu sítio ativo na forma *oxi*, a qual capacita a enzima a se ligar tanto com mono ou difenóis. Assim, como mostrado na Figura 3.25A, durante o processo catalítico para cada mol de catecol oxidado 2 mols de H⁺ são gerados e portanto podem alterar o pH na superfície dos transistores sensibilizando estes para a detecção dos respectivos catecóis. ^[97,98] Além disso, mudanças conformacionais na enzima imobilizada na porta dos ISFETs também podem modificar a densidade de cargas nestes, contribuindo desta forma para alterações no potencial de superfície.



Figura 3.25 A) Ilustração esquemática da oxidação de dopamina para o-dopaquinona catalisada por tirosinase. B) Curva de I_{DS} versus V_{GS} medida em tampão fosfato 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10,0 mmol L⁻¹ de KCl para um FET com alumina porosa antes e após a imobilização de tirosinase em sua superfície.

A Figura 3.25B mostra o perfil das curvas de I_{DS} - V_{GS} antes e após a imobilização da tirosinase na superfície dos transistores. Através desta é possível observar um deslocamento na voltagem de limiar dos FETs após a imobilização da enzima. Esta mudança é atribuída às cargas de superfície da própria enzima, já que esta é uma biomacromolécula e portanto, apresenta

diversos grupos ionizáveis em sua superfície tais como -NH₂ e -COOH. A presença destes grupos ionizáveis afeta a voltagem de banda plana dos dispositivos e consequentemente causa alterações na magnitude de V_T, mudando o ponto de operação dos FETs.^[34,38] Este aspecto é muito importante, pois durante a detecção de dopamina com estes transistores, o ΔV_{GS} é derivado do ponto de V_T do transistor medido apenas em tampão fosfato.

Previamente a detecção de dopamina empregando os respectivos transistores, foram otimizados dois parâmetros importantes para as análises, isto é, o pH do meio e a concentração da enzima na superfície dos FETs. Para isto, em ambos os casos, foi aplicado um potencial constante de -1 V entre fonte e dreno e monitorou-se a voltagem de porta-dreno (Vgs) desenvolvida na presença de 10 μ mol L⁻¹ de dopamina, antes e após as variações de pH e concentração da enzima respectivamente. Os resultados destas análises são mostrados nas Figuras 3.26A e B. Conforme estas, as melhores condições para a detecção de dopamina foram obtidas empregando uma solução tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl, pH 7,3, (Figura 3.26A) e concentração de enzima de cerca de 2,4 mg mL⁻¹ (Figura 3.26B).



Figura 3.26 A) Dependência de ΔV_{GS} em função do pH de uma solução tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl, para a detecção de 10 µmol L⁻¹ de dopamina. B) Dependência de ΔV_{GS} em função da concentração de tirosinase imobilizada na superfície dos transistores para a detecção de 10 µmol L⁻¹ de dopamina.

Após terem sido realizadas as devidas otimizações, os sensores foram empregados na detecção de dopamina, onde soluções com diferentes concentrações de dopamina foram aplicadas sobre a superfície dos FETs. Simultaneamente curvas de I_{DS} - V_{GS} foram obtidas aplicando uma voltagem fixa de -1 V entre fonte e dreno. As Figuras 3.27A e B mostram as curvas de I_{DS} - V_{GS} e a curva analítica para a detecção de dopamina empregando os respectivos ISFETs. O princípio de detecção, como já adiantado previamente, baseia-se na mudança de potencial na superfície dos FETs. Assim, durante a oxidação de dopamina pela enzima tirosinase, fons H⁺ são gerados e, consequentemente, provocam uma mudança no potencial de porta dos transistores, assim como na corrente entre fonte e dreno.



Figura 3.27 A) Curvas de I_{DS} versus V_{GS} para um FET/Al₂O₃ modificado com tirosinase e sobre a adição de diferentes concentrações de dopamina (DPM) (V_{DS} = -1 V). B) Variação em V_{GS} para uma ampla faixa de concentração de dopamina derivada a partir da curva A (n=5). ΔV_{GS} é determinado a partir do ponto de V_T do transistor.

Desta maneira, como os transistores são do tipo pFETs um aumento na concentração de íons H^+ na porta dos FETs tende a diminuir a magnitude da corrente entre fonte e dreno, como observado nas curvas da Figura 3.27A. Experimentos controle, onde os FETs analisados não possuem tirosinase imobilizada em seus poros, mostram que os níveis de corrente entre fonte e dreno são praticamente constantes para todas as concentrações de dopamina empregadas. Observando a curva analítica na Figura 3.27B verifica-se que a mesma possui duas regiões lineares, uma em uma faixa de concentração de 2 a 10 μ mol L⁻¹ (curva i) e outra de 20 a 500 μ mol L⁻¹ (curva ii). A
razão para estas duas regiões lineares pode ser associada a quantidade de oxigênio (O_2) disponível em solução. A enzima tirosinase é uma metaloenzima que contém dois íons de cobre em seu sítio ativo e necessita da ligação de O₂ a estes íons de cobre para mediar a oxidação de dopamina.^[98] Considerando que as medidas foram realizadas com adições sucessivas de soluções oxigenadas contendo dopamina sobre os sensores, é possível que a partir de uma determinada concentração de dopamina adicionada, a quantidade de O_2 dentro da solução não foi suficiente para auxiliar a oxidação destas espécies. Assim, quando a concentração de dopamina excedeu um certo limite, este efeito pode consecutivamente conduzir a uma segunda região linear (Figura 3.27B, curva ii). Estudos prévios mostraram que o consumo total de O_2 por tirosinase durante a oxidação de dopamina ocorre dentro dos primeiros minutos da reação.^[99] O mecanismo cinético da oxidação de dopamina por tirosinase não foi avaliado nesta parte do trabalho, no entanto notase que a concentração de dopamina detectada na primeira região linear da curva (curva i) mostrada na Figura 3.27B foi uma das mais baixas para detecções de dopamina envolvendo FETs.^[100] A sensibilidade obtida para a curva analítica à baixas concentrações de dopamina foi 76 mV/log da concentração de dopamina (µmol L⁻¹). Experimentos controle com FETs não funcionalizados com tirosinase não mostraram mudanças significativas no V_T dos transistores. Estes experimentos controle corroboraram que a oxidação de dopamina praticamente não ocorreu na ausência de tirosinase.

A seletividade dos sensores também foi avaliada, para tanto, determinações de dopamina foram conduzidas na presença de possíveis interferentes, como o ácido glutâmico e o ácido γ aminobutírico (GABA) (Figura 3.28A). O ácido glutâmico é o neurotransmissor mais comum encontrado no cérebro, enquanto GABA é considerado o maior inibidor de neurotransmissores, estando presente em cerca de 30-40% de todas as sinapses.^[101] O efeito destas duas moléculas interferentes na determinação de dopamina foi avaliado através de experimentos em tempo real pela adição de diferentes concentrações de dopamina, GABA e ácido glutâmico (Figura 3.28B). Medidas de I_{DS} *versus* tempo mostram que a corrente diminui à medida que dopamina é adicionada a solução, enquanto nenhuma modificação significativa foi observada quando GABA e ácido glutâmico foram adicionados à solução, mesmo em excesso. Estes resultados também foram confirmados com a análise das curvas de I_d-V_{GS}, realizadas durante a adição de soluções destes mesmos neurotransmissores (Figura 3.28C). Os resultados desta corroboram que as



Figura 3.28 A) Estruturas moleculares do ácido glutâmico e GABA. **B**) Variação de I_{DS} ao longo do tempo para um FET/Al₂O₃ modificado com tirosinase e após a adição sucessiva de: (1) Tampão fosfato, (2) 3 μ mol L⁻¹ de dopamina, (3) 50 μ mol L⁻¹ de GABA, (4) 10 μ mol L⁻¹ de dopamina, (5) 50 μ mol L⁻¹ de ácido glutâmico, (6) 10 μ mol L⁻¹ de dopamina, (7) 10 μ mol L⁻¹ de dopamina. **C**) Curva de I_{DS} versus V_{GS} para um FET/Al₂O₃ modificado com tirosinase em presença de tampão fosfato de potássio 1,0 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl, pH 7,3 e após a adição em sequência de 50 μ mol L⁻¹ de GABA, 50 μ mol L⁻¹ de ácido glutâmico e 50 μ mol L⁻¹ de dopamina. A figura inserida mostra uma amplificação da área destacada pela elipse vermelha, a qual corresponde a região de V_T para o FET/Al₂O₃.

mudanças em I_{DS} ocorrem devido às interações específicas e oxidação de dopamina pela tirosinase imobilizada nos transistores.

Os sensores foram estocados em geladeira a uma temperatura de 4 °C e sua estabilidade operacional foi avaliada em termos da atividade enzimática. Para esta, a atividade da enzima no sensor foi monitorada diariamente, através da adição de soluções de tampão fosfato seguido pela adição de dopamina 10 μ mol L⁻¹ e monitorando-se assim a mudanças em V_{GS} dos transistores. Desta maneira, verificou-se que após uma semana o sensor perdeu cerca de 50% de sua

estabilidade e manteve-se neste alcance por até 10 dias. Esta redução na estabilidade é principalmente atribuída à remoção da enzima durante os procedimentos de lavagem da superfície dos FETs. Este problema pode possivelmente ser reduzido através de um processo de imobilização covalente da enzima na superfície dos transistores.

Estes resultados demonstram que os sensores produzidos neste trabalho apresentam uma sensibilidade significativamente maior do que um único trabalho previamente descrito na literatura utilizando FETs para a detecção de dopamina, o qual obteve limites de detecção da ordem de 70 μ mol L⁻¹ e não demonstrou experimentos de seletividade.^[100] Adicionalmente, considerando que durante os processos sinápticos de liberação de dopamina, a concentração desta última pode chegar a uma faixa de poucos μ mol L⁻¹ no meio extracelular,^[102] os resultados obtidos aqui indicam que os FETs são extremamente promissores para a análise *in vitro* deste tipo de molécula quando liberada por células.

3.8 Detecção de Serotonina através de Transistores à base de Nanopartículas de Au

Após o desenvolvimento de sensores FETs para a detecção de dopamina utilizando alumina na superfície dos transistores, uma segunda estratégia foi empregada no desenvolvimento de sensores FETs para a detecção de serotonina. Para esta, ao contrário do sensor anterior que possuía apenas alumina porosa na porta dos transistores, foram utilizados os FETs contendo nanopartículas de Au crescidas diretamente dentro dos poros da alumina (configuração SiO₂/Al₂O₃/AuNPs). Todavia, a utilização de enzimas imobilizadas nos FETs para detecção de serotonina é bastante limitada, já que a maioria das enzimas comercialmente disponíveis que são capazes de reconhecer serotonina interagem também de forma não seletiva com outros neurotransmissores que possuem aminas primárias em sua estrutura química, conferindo assim a estes dispositivos uma baixa seletividade. Portando novas metodologias precisam ser desenvolvidas para detecção de tecção de monocamadas auto-organizadas ou SAMs (do inglês *self-assembled monolayers*) de moléculas de captopril e tiofenol em eletrodos de Au, e o emprego destas na pré-concentração e detecção eletroquímica seletiva de serotonina.^[103] Com base nos resultados experimentais obtidos, Mozaffari *et al.* proporam que a SAM formada por estas

moléculas apresenta um arranjo conformacional capaz de formar cavidades moleculares com um tamanho específico para moléculas de serotonina. Desta forma, por meio deste arranjo molecular e também através da interação eletrostática entre o grupo amina protonado da serotonina e os grupos carboxílicos desprotonados do captopril, as moléculas de serotonina podem ficar "aprisionadas" e portanto pré-concentradas nestas cavidades moleculares.^[103] Este mesmo princípio foi utilizado na modificação dos FETs/Al₂O₃/AuNPs para detecção de serotonina, baseando-se na mudança de potencial eletrostático na superfície do sensor. A formação de nanopartículas de Au foi essencial para esta parte do trabalho, pois elas serviram como suportes para a imobilização das moléculas de captopril e tiofenol e também como nanoeletrodos, nos quais mudanças locais em seu potencial eletrostático podem afetar a corrente entre fonte e dreno e consequentemente deslocar os valores de V_{GS} nos transistores. A Figura 3.29A mostra as estruturas moleculares de captopril e tiofenol enquanto a Figura 3.29B demonstra como essas moléculas devem se arranjar na superfície das nanopartículas no topo dos FETs. A imobilização destas moléculas na superfície dos transistores contendo as nanopartículas de Au foi realizada conforme descrito na sub-seção 2.4.2, e após então se realizou a caracterização elétrica destes sensores em solução tampão fosfato 1 mmol L^{-1} contendo 10 mmol L^{-1} de NaCl pH = 8,4. A imobilização destas moléculas na superfície dos FETs tende a deslocar as curvas de I_{DS}-V_{GS} para a direita, proporcionando um aumento na corrente I_{DS} quando V_{GS} = -1 V, assim como demonstrado através da Figura 3.29C. Esse aumento em I_{DS} é atribuído ao aumento da presença de cargas negativas na superfície do sensor, as quais são provenientes dos grupos carboxílicos desprotonados de captopril em pH = 8.4.^[103]

A presença destas cargas negativas tende a aumentar a densidade de portadores de cargas positivas (lacunas) no canal entre fonte e dreno e portanto proporcionar um aumento em I_{DS}. O efeito do pK_a de superfície destas moléculas nas curvas de I_{DS}–V_{GS} foi também avaliado em soluções tampão fosfato (1 mmol L⁻¹ + 10 mmol L⁻¹ de NaCl) com diferentes valores de pH. A Figura 3.29D mostra que a variação de V_{GS} em função do pH apresenta um aumento sistemático a medida que soluções com pHs mais elevados foram utilizadas nas medidas. Esses dados são consistentes com as observações feitas por Mozaffari *et al.*, os quais determinaram que o pK_a de superfície para estas mesmas moléculas imobilizadas em Au foi de 7,5.^[103] Portanto, para soluções com pH maior ou igual a 7,5 é esperado que uma maior fração de grupos carboxílicos estejam desprotonados.



Figura 3.29 A) e B) Estruturas moleculares de tiofenol e captopril e as suas organizações moleculares quando imobilizadas sobre nanopartículas de Au dentro dos poros de alumina cobrindo a superfície de um FET, respectivamente. C) Curva de I_{DS} - V_{GS} (V_{DS} = -1 V) para um FET antes e após a imobilização da SAM em sua superfície.
D) Variação de V_{GS} em função do pH para um FET modificado com a SAM de captopril e tiofenol.

Com o intuito de otimizar a melhor condição de pH para a detecção de serotonina, medidas similares as realizadas anteriormente, mas agora adicionando-se serotonina (concentração final 0,5 μ mol L⁻¹) às soluções tampão, foram conduzidas. Durante esses experimentos, as curvas de I_{DS}–V_{GS} foram avaliadas em função do tempo após a adição de serotonina à solução, como exibido na Figura 3.30A. Através desta é possível observar que uma maior variação em V_{GS} ocorre em 5 min. após a adição de serotonina, e seu valor permanece praticamente constante após este período. A Figura 3.30B mostra as variações de V_{GS} em função do pH após 5 min. da adição de serotonina as soluções tampão. Assim como é demonstrado nesta figura, um aumento na variação de V_{GS} ocorre sistematicamente à medida que soluções mais alcalinas foram utilizadas, sendo que uma maior variação foi observada para pH 8,4. É importante notar que a adição de serotonina causa uma diminuição nas correntes de I_{DS}. Essa diminuição é esperada, pois as moléculas de serotonina possuem na faixa de pH analisada seus grupos funcionais de aminas primárias protonados.



Figura 3.30 A) Variação de V_{GS} em função do tempo durante a detecção de 0,5 μmol L⁻¹ de serotonina. B) Variação de V_{GS} em função do pH durante a detecção de serotonina.
C) Curva de I_{DS} versus V_{GS} para um FET representativo modificado com a SAM empregado na detecção de diferentes concentrações de serotonina (V_{DS} = -1 V). D) Variação em V_{GS} em função da concentração de serotonina derivada a partir da curva C (n=4).

Portanto a interação destas com as moléculas de captopril e tiofenol nas supostas cavidades formadas pode causar um aumento na densidade de cargas positivas na superfície do

sensor, provocando assim uma depleção na densidade de lacunas no canal entre fonte e dreno, gerando consequentemente menores correntes de I_{DS}.

Com base nestes resultados todas as medidas posteriores para a detecção de serotonina foram realizadas em soluções tampão fosfato 1 mmol L⁻¹ contendo 10 mmol L⁻¹ de KCl em pH 8,4, e as curvas de I_{DS} – V_{GS} foram medidas 5 min. após a adição de serotonina. Na etapa seguinte, a dependência da variação de V_{GS} para a adição de variadas concentrações de serotonina foi analisada, conforme demonstrado na Figura 3.30C. Através desta, verifica-se claramente que uma variação de V_{GS} acompanhada de uma diminuição sistemática na corrente I_{DS} ocorre mesmo para concentrações relativamente baixas de serotonina. Esses dados mostram também que para concentrações de serotonina maiores do que 2 µmol L⁻¹ as correntes de I_{DS} praticamente se tornam constantes, sugerindo um estado de saturação na superfície. A Figura 3.30D mostra que a variação de V_{GS} em função da concentração de serotonina derivada a partir dos dados da Figura 3.30C segue uma tendência linear para uma faixa de concentração entre 0,1 µmol L⁻¹ e 2 µmol L⁻¹. Experimentos controle com FETs não modificados com a SAM mostraram uma variação de V_{GS} muito inferior em relação a transistores modificados.

O efeito de possíveis moléculas interferentes tais como ácido ascórbico, noradrenalina e dopamina na detecção serotonina foi também avaliado através de curvas de I_{DS}-V_{GS} (Figura 3.31). Estas demonstraram que moléculas de ácido ascórbico e noradrenalina praticamente não causam variações no potencial de superfície dos FETs, mesmo estando carregadas negativamente e positivamente, respectivamente. No caso de dopamina, uma pequena variação em V_{GS} pode ser observada, porém somente quando concentrações relativamente altas desse neurotransmissor estão presentes. Quando serotonina é adicionada a solução, uma variação drástica em V_{GS} e nas correntes de I_{DS} foi observada. Estes resultados podem ser interpretados com base na conformação das moléculas imobilizadas na superfície das partículas, assim como em interações eletrostáticas e interações moleculares do tipo π - π .^[104] Estas últimas por exemplo representam um fator importante para o aprisionamento seletivo de serotonina entre essas moléculas. Interações dessa natureza são comuns em estruturas protéicas e também em interações envolvendo proteínas e ligantes. De modo que, em adição a interação eletrostática entre os grupos aminas protonados da serotonina e os grupos carboxílicos desprotonados de captopril, as interações π - π entre as partes aromáticas das moléculas de serotonina e tiofenol podem também contribuir para a forte e seletiva interação entre essas espécies.



Figura 3.31 A) Curvas representativas de I_{DS} versus V_{GS} para um FET de SiO₂/Al₂O₃/AuNPs modificado com a SAM de captopril e tiofenol. As curvas foram primeiramente medidas em tampão fosfato e depois sequencialmente após a adição de noraadrenalina, ácido ascórbico, dopamina e serotonina. As concentrações de cada uma das espécies estão inseridas na figura.

Esses experimentos, ainda que como uma prova de conceito demonstraram claramente que a imobilização de moléculas de captopril e tiofenol na superfície de nanopartículas presentes na porta dos FETs pode auxiliar na detecção de um importante neurotransmissor como a serotonina. Os resultados também sugerem que ensaios dessa natureza podem ser rearranjados para a detecção de outras moléculas, contanto que haja interações eletrostáticas ou π - π , simplesmente pela imobilização de moléculas que possam interagir seletivamente com um determinado analito. Todas estas caracterizações prévias e demonstrações de aplicações para os FETs nanoestruturados foram importantes para o seu uso como sensores para o monitoramento de eventos de exocitose de células PC12, pois como visto até agora, todas as superfícies analisadas apresentam comportamentos elétricos distintos. Assim, na próxima seção serão apresentados os resultados da aderência celular sobre a superfície destes transistores.

3.9 Adesão Celular e Medidas de Função de Transferência (Voltagem) utilizando Transistores

Até esta parte do trabalho foram apresentados e discutidos os resultados dos transistores como biossensores para a detecção de moléculas que atuam como neurotransmissores. A partir desta seção serão apresentados os dados com os experimentos relacionados às células PC12. Desta maneira, um primeiro aspecto importante a se considerar é a capacidade de crescimento das células PC12 sobre a superfície dos transistores produzidos. Nas Figuras 3.32A, B e C são mostradas imagens de microscopia óptica de células PC12 após três dias de crescimento (in vitro) sobre os transistores com superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. Em todos os três casos as células foram cultivadas empregando-se um número relativamente pequeno de células por área, que neste caso foi de 200 células/mm². Desta forma, evitou-se a formação de camadas densas ou confluentes de células cobrindo os transistores, permitindo assim a análise óptica qualitativa do crescimento de células individuais sobre a porta de cada tipo de FET. Para as três superfícies mostradas nas Figuras 3.32A, B e C percebe-se claramente que as células cresceram e aderiram sobre as superfícies exibindo tamanhos e morfologias típicas de formas "saudáveis" com as extremidades alongadas e a parte central do corpo celular mais arrendondado. Este tipo de morfologia sugere que as células aderiram de forma coesiva sobre os substratos formando o que é conhecido na biologia celular como junções comunicantes (gap junctions) com a porta dos FETs. Esta observação é importante, pois ela indica que as células são capazes de estabelecer através destas junções comunicantes uma interface elétrica selada do resto da solução contendo os eletrólitos do meio de cultura.

Todavia, para análises reais dos eventos de exocitose promovidos por estas células é necessário que estas formem camadas confluentes sobre os transistores. Neste caso, sabendo-se que as células individuais aderiram de forma coesiva sobre as superfícies, é mais conveniente analisar a adesão destas quando camadas confluentes são estabelecidas sobre os FETs. Nas Figuras 3.32D, E e F são exibidas imagens de microscopia óptica de células PC12 cobrindo toda a superfície de transistores formados por Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. Conforme visto, para os três casos as células formam como um filme ou tecido



Figura 3.32 A), B) e C) - Imagens de microscopia óptica por contraste de interferência diferencial (DIC) de células PC12 após três dias de crescimento sobre transistores com superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. D), E) e F) – Imagens de DIC após três dias de crescimento de camadas confluentes de células PC12 sobre os FETs de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. A setas indicam a região de porta dos transistores.

estabelecendo não só forças coesivas com as superfícies, mas também umas com as outras. A quantidade de células mortas nestes casos foi insignificante.

Para uma análise mais quantitativa do processo de adesão celular sobre os transistores, foram realizadas medidas de função de transferência conforme descrito na sub-seção 2.5.2. Desta maneira, previamente a apresentação e discussão destes resultados é importante considerar que a interface célula-transistor tem uma função fundamental na leitura de sinais elétricos provenientes das células, de modo que a razão sinal-ruído medida por um transistor é fortemente afetada pela selagem desta interface. Assim, uma maneira conveniente para se interpretar esta junção é descrevê-la utilizando o modelo do ponto de contato, o qual já foi previamente introduzido na sub-seção 1.3.1. Nesta, a Figura 1.18 apresentou de forma genérica os parâmetros físicos mais relevantes deste modelo. No entanto, para uma descrição mais realística deste acoplamento célula/transistor, levando-se em consideração a estrutura física dos transistores e o sistema elétrico utilizado nas medidas, outros parâmetros devem ser adicionados a esta figura, a qual é então descrita, como pode ser visto na Figura 3.33.^[60]



Figura 3.33 Ilustração do circuito elétrico equivalente para o acoplamento de uma célula sobre um transistor.

Nesta, foram incluídos em adição aos termos já descritos anteriormente, a resistência da solução (R_{el}) , a capacitância das linhas de contato (C_{LC}) e a resistência do resistor elétrico de saída do amplificador (R_{FB}) . O termo R_J corresponde a resistência da solução na área de junção e é equivalente ao inverso de G_J (condutância da solução na junção).

Uma expressão analítica para a função de transferência considerando todos estes termos pode agora ser derivada levando em consideração alguns seguintes pontos. Por exemplo, como a resistência da membrana celular apresenta um valor relativamente alto, os termos R_{JM} e R_{ML} podem ser excluídos. A resistência do meio intracelular (R_{in}) é relativamente muito pequena e pode também ser excluída. As capacitâncias da membrana celular livre exposta a solução (C_{ML}) e da membrana celular acoplada ao transistor (C_{JM}) tem uma influência direta no espectro de função de transferência, porém são difíceis de serem separadas pois estão acopladas paralelamente e assim são somadas na capacitância total da membrana celular. Esta capacitância (C_{TM}) total e efetiva da membrana é então descrita conforme a seguinte equação

$$C_{TM} = \frac{C_{JM}C_{ML}}{C_{JM} + C_{ML}}$$
 (Eq. 3.22)

Usando esta simplificação, o sinal detectável na porta do transistor é dependente da capacitância da porta (C_{ox}), da resistência R_J de selagem na junção e da capacitância C_{TM} . Este modelo de circuito elétrico equivalente para o acoplamento de células e transistores foi já descrito na literatura por outros autores, embora seja um modelo simplificado, ele ainda consiste de uma série de parâmetros.^[105] Desta maneira, para derivar uma expressão para a função de transferência e calcular todos estes parâmetros é necessário organizá-los numa sequência de magnitudes como mostrado a seguir:

$$R_{J}(\Omega) \sim 10^{6} >> R_{el}(\Omega) \sim 10^{3} >> g_{m}(S) \sim 10^{-4} >> C_{CL}(F) \sim 10^{-10} >> C_{ox}, C_{TM}(F) \sim 10^{-12} a \ 10^{-13}$$

A função de transferência *H* resultante desta sequência para um dado número de constantes de tempo (τ) pode ser escrita como^[106]

$$H(j\omega) = R_{FB}g_m \frac{1+j\omega_2\beta_{\tau_3} - \omega^2 \tau_3^2}{(1+j\omega_{\tau_1}) \cdot (1+j\omega_{\tau_2})}$$
(Eq. 3.23)

onde

$$\beta = \frac{g_m c_{TM} R_J + c_{CL}}{2\sqrt{g_m c_{CL} R_J + (c_{TM} + c_{ox})}}$$
(Eq. 3.24)

$$\tau_1 = R_J (C_{TM} + C_{ox})$$
 (Eq. 3.25)

$$\tau_2 = 2R_{el}C_{CL} \tag{Eq. 3.26}$$

$$\tau_3 = \sqrt{\frac{1}{g_m} C_{CL} R_J (C_{TM} + C_{ox})}$$
(Eq. 3.27)

Utilizando a Equação 3.23, a influência da variação de alguns destes parâmetros no sinal da função de transferência pode ser analisado teoricamente. Mantendo-se alguns parâmetros com valores constantes (Tabela 3.5) avaliou-se primeiramente como a variação da resistência da

região de junção (R_J) afeta o sinal medido da função de transferência e consequentemente a constante de tempo τ_1 (Figura 3.34).

Tabela 3.5 Parâmetros mantidos constante durante a simulação da influência da variação de R_J no sinal da função de transferência.

R_{el} / $k\Omega$	C _{CL} / pF	g _m / S	C _{ox} / pF	C _{TM} / pF
2	140	0,0002	0,5	0,2



Figura 3.34 Curvas de função de transferência versus frequência simuladas para os diferentes valores de R_J indicados na legenda da figura.

Observando-se a Figura 3.34, verifica-se claramente que variando-se o valor da resistência da área de junção R_J de 0,1 M Ω para 100 M Ω conduz a uma queda da função de transferência para frequências menores (frequência de corte é menor) e consequentemente causa um aumento em τ_1 . O comportamento destas curvas para valores relativamente altos de R_J são consistentes com uma adesão coesiva de células sobre os transistores formando uma pequena junção comunicante. Para o caso de valores de R_J relativamente baixos, o sinal da função de transferência é transmitido quase totalmente durante todo o espectro de frequência, indicando

assim de forma qualitativa que as células não aderiram a superfície e desta maneira não formaram junções comunicantes.

Na Figura 3.35 é mostrada o comportamento das curvas de função de transferência versus frequência para variações nos valores da resistência da solução de eletrólitos enquanto os demais parâmetros foram mantidos constante conforme indicado na Tabela 3.5. Neste caso, o valor de R_J foi fixado em 10 M Ω .



Figura 3.35 Curvas de função de transferência versus frequência simuladas para os diferentes valores de R_{el} indicados na legenda da figura.

Como verifica-se através da figura, a resistência da solução pouco influencia a frequência com que a função de transferência passa a ser atenuada a partir de uma determinada condição de adesão celular. Este comportamento ocorre basicamente devido aos valores da resistência da solução serem muito inferiores ao valor de R_J. Desta forma, a atenuação do sinal é assim dominada pela resistência da área de junção.

Um outro parâmetro analisado e que é exclusivo das células, foi a influência da variação da capacitância total da membrana celular (C_{TM}). Neste caso, todos os demais parâmetros foram mantidos conforme indicado na Tabela 3.5 e R_J foi de 10 M Ω . A dependência da atenuação da

função de transferência para diferentes valores de C_{TM} é mostrada na Figura 3.36. Como visto nos gráficos desta figura e também pelas Equações 3.24, 3.25 e 3.27 a capacitância total da membrana celular tem influência direta nas constantes de tempo e portanto na frequência de atenuação do sinal da função de transferência. Um aumento em C_{TM} resulta diretamente em frequências de atenuação menores, sugerindo que uma resistência de selagem relativamente alta foi estabelecida na junção célula/transistor. Para valores pequenos de C_{TM} a frequência de corte da função de transferência é deslocada para frequências relativamente altas. Em todos os casos mostrados na Figura 3.36, as constantes de tempo τ_1 e τ_3 são claramente visíveis e distinguíveis umas das outras, isto é, enquanto τ_1 é associada a frequência de corte, τ_3 aparece na base das curvas de função de transferência em altas frequências.



Figura 3.36 Curvas de função de transferência simuladas para diferentes valores de C_{TM} indicados na legenda da figura.

A influência de um elemento passivo no circuito descrevendo o acoplamento das células também foi avaliado. Deste modo, considerando que neste trabalho foram produzidos transistores com diferentes superfícies, analisou-se o efeito da capacitância de superfície (C_{ox}) dos transistores conforme mostrado na Figura 3.37. Para a simulação destas curvas todos os demais parâmetros foram fixados em valores mostrados na Tabela 3.5 e R_J foi de 10 MΩ. Como

já visto através das curvas da Figura 3.36, C_{ox} tem um efeito similar na atenuação da função de transferência, ou seja, para valores de capacitância de superfície relativamente altos a frequência de atenuação tende a ser menor. É interessante notar que a variação de C_{ox} promove variações mais significativas nas curvas de função de transferência do que as variações nos valores de C_{TM} . Percebe-se ainda que para a faixa de frequência analisada, a constante de tempo τ_3 somente é visível para valores de C_{ox} relativamente altos.



Figure 3.37 Influência de diferentes valores de C_{ox} (indicados na legenda da figura) nas curvas de função de transferência simuladas.

Para estes dois últimos casos envolvendo as variações de C_{TM} e C_{ox} , nota-se que a atenuação da função de transferência não é só dominada por R_J , sugerindo desta forma que a integridade da membrana celular e a capacitância da superfície dos transistores desempenham um papel importante na adesão da células e no sinal medido. Este é um ponto importante, pois as células podem se aderir a uma superfície, porém na região de junção a membrana celular pode ser danificada pela superfície do FET e a célula continuar aderida e consequentemente influenciar o sinal medido pela função de transferência sem mesmo estar elétricamente ativa e ou viva.

Este efeito é mostrado nas Figuras 3.38A, B e C, as quais exibem curvas experimentais de função de transferência para transistores cobertos com uma camada confluente de células PC12 sobre suas superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. Para cada superfície, as medidas foram realizadas num tempo determinado como t=0, onde a solução eletrolítica era composta somente pelo meio de cultura. Após então, adicionou-se a esta solução o reagente anfotericina B, o qual é um antifúngico e que atua ligando-se a esteróis da membrana celular e consequentemente conduz a decomposição das células. A concentração final de anfotericina B na solução foi de 0,1 mg mL⁻¹ e as curvas de função de transferência foram após a adição desta, medidas em diferentes tempos para cada superfície. Como já visto em outro trabalho na literatura e também observado aqui para as Figuras 3.38A e C, a adição de anfotericina B ao meio de cultura induz a um deslocamento das curvas.^[60] No caso da Figura 3.38A, este deslocamento afetou apenas a inclinação da região de atenuação do sinal da função de transferência, enquanto para a Figura 3.38C este deslocamento afetou principalmente a frequência de atenuação da função de transferência, a qual foi deslocada para valores menores. Nestes dois casos, o deslocamento da função de transferência pode ser facilmente associado a decomposição da células, que acabam bloqueando a superfície dos FETs e consequentemente atenuam o sinal de H. Para o caso da Figura 3.38B (superfície de Si/SiO₂/Al₂O₃), percebe-se que a função de transferência não apresenta variações significativas após a adição de anfotericina B mesmo após 8 min. Este comportamento é diferente do observado para os outros dois casos discutidos anteriormente e pode ser compreendido com base no sinal original de H antes da adição de anfotericina B. Neste, como verifica-se a atenuação do sinal ocorreu em frequências relativamente baixas e o sinal de H tornou-se constante somente em torno de 0,2, o que é muito inferior em comparação as curvas mostradas em A e C. Este portanto, sugere que a adesão inicial da célula ao FET causou uma atenuação no sinal da função de transferência suficientemente alta que mesmo após a adição de um agente de decomposição celular o sinal não foi mais afetado de forma significativa. Neste momento, é importante mencionar que estas curvas são apenas uns poucos exemplos mostrando o efeito da atenuação de H em função de um agente de decomposição celular e que o mesmo comportamento das curvas mostradas para as superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs (Figuras 3.38A e C) foram também observados para outros FETs com superfície de Si/SiO₂/Al₂O₃. Da mesma forma, o comportamento das curvas em B



foram também observados para outros transistores com superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs.

Figura 3.38 A), B) e C) Curvas experimentais da função de transferência em diferentes tempos após a adição de anfotericina B sobre transistores possuindo suas superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs cobertas com células PC12, respectivamente. As funções de transferências para estas curvas foram normalizadas divindo-se os valores das curvas contendo células sobre os FETs por curvas de amostras sem células.

Em relação ao efeito do tipo de superfície nestes sinais, verificou-se que para superfícies de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs que frequentemente a atenuação da função de transferência foi deslocada para valores de menores frequências assim como demonstrado na Figura 3.38C. Este efeito pode ser principalmente atribuído a grande área superficial destes transistores que consequentemente podem adsorver uma maior quantidade de material celular decomposto. Estas medidas mostram claramente que a função de transferência pode auxiliar na análise de adesão celular, porém ela não permite avaliar se as células estão elétricamente ativas.

Para uma análise dos processos interfaciais de adesão celular e avaliação dos valores de alguns dos parâmetros descritos nas Equações 3.23 a 3.27 que afetam a junção de acoplamento célula/transistor, medidas de função de transferência sem adição de anfotericina B para transistores com as mesmas superfícies analisadas anteriormente e cobertas com camadas confluentes de células PC12 foram realizadas. As Figuras 3.39A, B, e C demonstram exemplos de curvas típicas de função de transferência observadas para alguns transistores com superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. As funções de transferências para estas curvas foram normalizadas divindo-se as curvas originais contendo células sobre os FETs por curvas de amostras sem células. Conforme visto, para os três casos as curvas de diferentes FETs mas com a mesma superfície apresentam um comportamento bastante variado. Estas diferenças para o comportamento das curvas de transistores diferentes mas de mesma superfície está diretamente relacionada as diferentes formas de adesão das células e suas diferentes forças de coesão com as superfícies. Comparando-se a estrutura das diferentes superfícies contendo somente SiO₂, Al₂O₃ e Al₂O₃/AuNPs e baseando-se em demais curvas não mostradas aqui, verifica-se que para os casos de SiO₂ e Al₂O₃/AuNPs (Figuras 3.39A e C, respectivamente) a maioria dos FETs medidos apresentam atenuações em frequências menores do que 100 Hz e a função de transferência para frequências infinitas fica em torno de 0,65 a 0,70. Para o caso de Al₂O₃ (Figura 3.39B) em algumas poucas curvas a função de transferência na frequência infinita pode chegar em até 0,2, embora em muitas outras para este tipo de superfície ela seja da ordem de 0,8. Como uma observação geral da técnica de função de transferência para todas estas superfícies, quanto menor for a frequência de atenuação e menor for a função de transferência na frequência infinita, melhor será a adesão celular.



Figura 3.39 A), B) e C) Curvas experimentais da função de transferência para diferentes possuindo suas superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ transistores e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs cobertas com células PC12, respectivamente. Para cada tipo de superfície são mostradas curvas de cinco transistores. As funções de transferências para estas curvas foram normalizadas divindo-se os valores das curvas contendo células sobre os FETs por curvas de amostras sem células. D) Curvas (pontos) da função de transferência do FET 2 da Figura A, do FET 8 da Figura B e do FET 13 da Figura C. As linhas continuas representam os ajustes feitos utilizando-se a Equação 3.23.

Baseando-se nesta observação buscou-se determinar os valores dos parâmetros que compõem o circuito elétrico equivalente para descrever esta adesão celular sobre os FETs. Desta maneira, por conveniência tomou-se como exemplo a curva do FET 2 da Figura 3.39A, a curva do FET 8 da Figura 3.39B e a curva do FET 13 da Figura 3.39C e graficou-se todas estas juntas

conforme mostrado na Figura 3.39D. Os pontos destes gráficos foram então ajustados utilizandose a Equação 3.23 e partir desta então pode-se determinar a magnitude de alguns dos parâmetros mais importantes do circuito elétrico que descreve o acoplamento de células sobre os FETs. Alguns parâmetros como R_{el}, C_{CL}, g_m e R_{FB} foram mantidos constante em 45 k Ω , 140 pF, 200 μ S e 5 k Ω , respectivamente. Os valores dos demais parâmetros utilizados para o ajuste das curvas experimentais para cada uma das superfícies analisadas são exibidos na Tabela 3.6.

		-		
Superfície	FET	$R_J/G\Omega$	C_{TM} / μ F cm ⁻²	C_{ox} / μ F cm ⁻²
Si/SiO ₂	2	0,5	51,3	12
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃	8	3,5	40,1	8
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃ /AuNPs	13	5	54,2	8

Tabela 3.6Parâmetros utilizados para o ajuste das curvas experimentais da função de
transferência mostrados na Figura 3.39D.

Como visto através desta, embora os valores dos parâmetros ajustem as curvas experimentais, suas magnitudes não condizem com valores reais esperados e normalmente encontrados, especialmente para R_J, pois estes são muito superiores. Um dos problemas com estes valores é o modelo analítico utilizado para derivar a expressão da função de transferência. Este faz uma combinação dos componentes passivos das células com os dos transistores dentro de diferentes constantes de tempo. Assim, a influência de cada um destes parâmetros individualmente não pode ser separada e reflete direto nas constantes de tempo combinadas. Resultando assim em valores de ajustes teóricos não condizentes com valores reais obtidos experimentalmente.

Uma outra maneira para se estimar os valores destes parâmetros, é fazendo uso da Equações genéricas mostradas na seção 1.3.2. Assim, dois parâmetros importantes que podem ser extraídos direto das curvas experimentais são a função de transferência numa frequência infinita h_{∞} e a constante de tempo τ_{J} . Os valores destas para cada uma das curvas mostradas na Figura 3.39D são apresentados na Tabela 3.7. Considerando-se os valores de capacitância das superfícies dos FETs determinados a partir da Figura 3.11 e assumindo-se uma fração α de acoplamento de 0,33 (Equação 1.19), determinou-se assim utilizando as Equações 1.21 e 1.22 os

valores da capacitância de membrana (C_M) e da condutividade específica da junção (g_J). Os valores destes para cada superfície são apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 Parâmetros determinados a partir da Figura 3.39D e utilizados para o cálculo daresistência específica da área de junção.

Superfície	FET	h_∞	$ au_{\mathrm{J}}/\mu\mathrm{s}$	C_{OX} / μ F cm ⁻²	$C_{\rm M}$ / μF cm ⁻²	$g_J/mS cm^{-2}$
Si/SiO ₂	2	0,70	28	0,255	0,96	30,6
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃	8	0,27	20	0,177	0,34	20,3
Si/SiO ₂ /Al ₂ O ₃ /AuNPs	13	0,65	18	0,765	1,38	94,6

Nota-se que os valores encontrados são mais próximos de valores normalmente esperados para este tipo de acoplamento e que uma maior condutividade para a junção é observada para a superfície de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs. Embora esta forma de avaliar estes parâmetros seja mais genérica, ela no entanto fornece valores mais realísticos do que o modelo aplicado previamente. Com bases nas informações listadas na Tabela 3.7, uma boa aproximação para uma análise mais efetiva da junção célula-transistor e portanto da adesão celular, é a caracterização da resistência de folha (R_J) entre a pequena região que separa a superfície dos transistores da membrana celular. Esta resistência é equivalente ao inverso da condutividade específica da região de junção e é associada à esta através da seguinte relação

$$g_J = \frac{5}{R_J a_J^2}$$
 (Eq. 3.28)

onde o termo a_J corresponde ao raio de uma área circular que cobre o transistor e é associada neste caso com o corpo de uma célula. Esta pequena região, a qual é preenchida por uma fina camada de eletrólito possui uma espessura d_J e uma resistência específica ρ_J , de modo que a resistência de folha pode ainda ser expressada através da equação

$$R_J = \frac{\rho_J}{d_J} \tag{Eq. 3.29}$$

Aplicando-se os valores de g_J da Tabela 3.7 na Equação 3.28 e sabendo-se que $a_J = 3,5 \mu m$, determinou-se os valores de r_I para as três superfícies analisadas. Estes foram de 133,6 MΩ, 201,6 M Ω e 43,4 M Ω para as superfícies de Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. Considerando-se agora que os valores de d_J normalmente são da ordem de poucas dezenas de nanometros e aproximando-se este então para $d_I = 30$ nm, calculou utilizandose a Equação 3.29 para as três superfícies os valores de ρ_1 como 4 k Ω cm⁻¹, 6 k Ω cm⁻¹ e 1,3 k Ω cm⁻¹ para Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente. Sabendo-se que a resistência da solução utilizada nas análises era de 58 Ω cm⁻¹, estes valores encontrados para a resistência específica demonstram claramente que a condutividade do eletrólito na área de junção difere significativamente do resto da solução. A razão para este aumento substâncial de resistência nesta região não é totalmente clara mas certamente pode ser atribuída a efeitos como uma redução da densidade de íons livres e móveis da solução na junção célula-transistor, uma vez que a superfície dos FETs foi coberta com poli-lisina a qual apresenta uma alta densidade cargas positivas e ao mesmo tempo a membrana celular apresenta uma alta densidade de cargas negativas. Desta forma, considerando-se que as interações eletrostáticas nesta junção podem fortemente afetar a mobilidade dos íons nela, poderia se esperar um maior aumento da resistência da solução nesta região.

Este aumento de resistência nesta área é também uma indicação de uma melhor adesão das células sobre os FETs. Embora os valores calculados acima demonstram que a superfície de Al₂O₃ apresentou um maior valor de ρ_I , estes apenas exemplificam de forma qualitativa como a resistência específica da área de junção pode ser associada a adesão celular. É importante considerar, conforme já mostrado através dos gráficos de simulação da função de transferência, que a capacitância da superfície tem uma relação direta com a condutividade específica (Equação 1.22) da solução. Assim, como as superfícies de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs apresentam uma maior capacitância, é esperado que a resistência da solução seja menor em comparação as outras superfícies analisadas. Este efeito é também claramente visível comparando-se as curvas das Figuras 3.39A e C, as quais demonstram que as frequências de atenuação e as funções de transferência na frequência infinita para os dois casos são bastante similares, porém como as capacitâncias das superfícies são diferentes estas refletiram nos valores de ρ_J . Como um resumo destas análises e de uma maneira mais quantitativa, isto é, baseando-se no comportamento da maioria das curvas de função de transferência e não somente nos casos discutidos aqui, nos três

tipos de superfícies analisadas as adesões das células PC12 apresentam comportamentos similares, os maiores efeitos nos resultados da resistência específica da área de junção são decorrentes da capacitância de cada superfície. A maneira com que estes resultados podem influenciar na aplicação direta destes dispositivos será discutida na próxima seção, na qual serão apresentados os resultados para a detecção de processos de exocitose para a liberação de vesículas.

3.10 Detecção da Liberação de Vesículas de Células PC12

A etapa final deste trabalho envolveu a detecção das vesículas liberadas pelas células PC12 utilizando-se os transistores com os três tipos de superfícies produzidas neste projeto. Para estas análises, as células PC12 foram crescidas até formarem uma camada confluente sobre a superfície dos FETs, assim como mostrado nas Figuras 3.32D, E e F. Nas Figuras 3.40A, B e C são mostradas curvas de correntes I_{DS} em função do tempo para transistores com os três tipos de superfície, Si/SiO₂, Si/SiO₂/Al₂O₃ e Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs, respectivamente, antes (curvas i) e após o crescimento de células PC12 sobre suas superfícies (curvas ii). Conforme visto, observase claramente que para todos os três casos, antes do crescimento de células (curvas i) sobre os FETs o traço de corrente I_{DS} ao longo do tempo é praticamente constante e exibe um nível de ruído (pico a pico) entre 5 a 10 µA. Este nível de ruído é relativamente alto e representa até um certo ponto uma limitação para a detecção de alguns processos celulares como potenciais de ação. Embora não empregado neste trabalho, é possível reduzir o ruído destes sinais utilizandose uma combinação de filtros passa alto e passa baixo no sistema de amplificação. As curvas ii das Figuras 3.40A, B e C mostram os traços de corrente para os respectivos FETs após a adição de alíquotas de 30 µL de solução de KCl 3 mol L⁻¹ ao meio contendo as células sobre os transistores. Nas três curvas é possível de se visualizar uma sequência de picos, que para o caso da superfície de Si/SiO₂/Al₂O₃/AuNPs (Figura 3.40C, curva ii) é mais intensa e que apresentou



dentro de 90 s cerca de 50 picos com amplitudes em alguns casos de até 250 μ A. Para o caso das superfícies de Si/SiO₂ e Si/SiO₂/Al₂O₃, embora o nível de ruído seja alto, percebe-se que a densidade de picos detectáveis ao longo do tempo foi muito inferior em relação aquela observada para a superfície contendo as nanopartículas. Todas estas curvas ii são exemplos representativos dos traços de corrente I_{DS} medidos. Em termos de reprodutibilidade, para cada superfície, cinco chips contendo 16 transistores cada foram avaliados e sinais como os demonstrados nas Figuras 3.40 foram detectáveis em cerca de 30% dos transistores, nos demais os sinais não foram mensuráveis e/ou apresentaram amplitude muito baixa e não puderam ser distinguidos do nível de ruído.

O formato de um destes picos detectados é mostrado na Figura 3.41A. Conforme esta, a corrente I_{DS} apresenta inicialmente um rápido decaimento e após então retorna relativamente lenta com um tempo de cerca 48 ms ao seu nível de base. A duração total destes picos de corrente foi da ordem de 50 ms, Figura 3.41B. Estes tempo de duração e decaimento de corrente são muito similares aos valores encontrados em outro trabalho utilizando FETs com superfície de SiO₂ para a detecção de vesículas liberadas por células cromafinas.^[19]



Figura 3.41 A) Traço de corrente I_{DS} ao longo do tempo mostrando o formato de um dos picos detectados na curva ii da Figura 3.40C. B) Histograma do tempo de duração de picos de corrente detectados nas curvas ii das Figuras 3.40A, B e C.

A origem destes picos de corrente é atribuída a natureza ácida das vesículas liberadas pelas células PC12, Figura 3.42. Isto é, as mesmas vesículas das células PC12 que contém as

moléculas de neurotransmissores, possuem em sua superfície grupos de proteínas conhecidas como bombas de prótons que ao converterem ATP em ADP conduzem a um aumento na concentração de íons H⁺ dentro das vesículas, fazendo com que seu pH seja em torno de 5.5.^[19,107,108] A liberação destas vesículas para o meio extracelular pode ocorrer espontaneamente ou através da estimulação química aumentando-se a concentração de íons K⁺ no meio extracelular, assim como foi demonstrado nas curvas ii das Figuras 3.40A, B e C. O aumento na concentração extracelular de íons K⁺ conduz a uma despolarização da membrana celular, que consequentemente faz com que as vesículas sofram difusão através desta e criem assim poros de fusão que permitem com que as espécias intravesiculares sejam liberadas no meio extracelular. No caso de uma célula aderida sobre a porta de um transistor, a liberação destas espécies intravesiculares ocorrerá também na região de junção que separa a superfície do FET da membrana celular, assim como ilustrado através da Figura 3.42. Devido a liberação dos íons H⁺ nesta junção, o pH local desta área sofre uma redução e consequentemente causa uma mudança de voltagem na dupla camada elétrica da superfície, alterando assim o seu potencial elétrico de superfície e também a corrente I_{DS} entre fonte e dreno. Como os transistores são do tipo pFETs, a corrente IDS tende a decair quando soluções com pHs mais baixos estão sobre sua superfície.



Figura 3.42 Ilustração mostrando uma célula PC12 aderida sobre um FET com a consequente fusão de vesículas na membrana celular e a liberação de íons H⁺ e dopamina na região de junção célula/transistor.

Após a queda inicial de IDS a corrente volta ao seu estado inicial devido a neutralização do excesso de íons H+ na região de junção célula/transistor. O período de retorno da corrente I_{DS} ao seu estado inicial é conhecido como período refratário e durante este momento nenhum pico de corrente adicional pode ser observado até I_{DS} atingir seu estado inicial. Para uma análise mais profunda da dinâmica de formação dos picos de corrente observados nas curvas ii das Figuras 3.40A, B e C é necessário uma modelagem mais específica envolvendo por exemplo a extrusão das vesículas. Todavia, modelagens como esta não foram realizadas pois estão um pouco além do escolpo deste trabalho.

Um ponto importante a se discutir destas análises, é o efeito das superfícies dos FETs. Como demonstrado nas caracterizações de função de transferência, a presença das nanopartículas na superfície dos FETs tem uma forte influência na capacitância dos transistores e também na condutância da região de junção. Devido a resistência relativamente alta da área de junção, podese esperar que a espessura da dupla camada elétrica formada na superfície dos FETs seja de dimensões comparáveis ao tamanho das nanopartículas de Au. Desta maneira, mudanças na densidade de dipolos elétricos formados devido a adsorção de íons na superfície destas partículas, pode como no caso da variação local de pH, resultar numa queda de voltagem dentro da dupla camada elétrica e consequentemente mudar o potencial de superfície. Conforme observado através das curvas ii das Figuras 3.40, os FETs apresentando nanopartículas em sua superfícies exibiram uma densidade muito maior de picos de corrente ao longo do tempo e uma razão de sinal-ruído para cada pico muito maior do que as superfície com somente SiO₂ e SiO₂/Al₂O₃. Estes resultados experimentais podem ser explicados baseando-se nas observações feitas anteriormente para mudanças de potencial na dupla camada elétrica das nanopartículas. Estas medidas e análises, ainda que de forma bastante simples sugerem que a presença de nanoestruturas metálicas na superfície de transistores conduzem a efeitos bastante diferenciados em comparação a superfícies com somente óxidos. Estas últimas medidas demonstraram ainda que as nanopartículas são capazes de causar uma maior sensibilidade elétrica na superfície dos FETs. Estes resultados sugerem que o efeito da dupla camada elétrica nestas nanopartículas pode ser o grande responsável pela sensibilidade elétrica destes nanomateriais e que estes dados e hipóteses abrem um caminho e uma perspectiva para serem melhor avaliados e discutidos para trabalhos futuros envolvendo os efeitos de dipolos elétricos nas características de capacitância e resistência elétrica de nanopartículas de Au aplicadas na análise de eventos biológicos.

Capítulo 4

Conclusões e Perspectivas Futuras

O emprego de transistores de efeito de campo para análise da atividade elétrica de células neurais e outras células eletrogênicas é extremamente promissor e avanços nesta área vem sendo realizados desde a década de 70. Devido a possibilidade de fabricação e controle elétrico de dezenas a milhares destes dispositivos simultâneamente, é possível de se monitorar ao mesmo tempo a atividade elétrica de diversas células, gerando assim uma quantidade de dados com relevância estatística em um período de tempo relativamente curto. Apesar dos esforços para a integração destes dois tipos de materiais, células e transistores, e criação de dispositivos híbridos, diversos problemas e desafios continuam em aberto. Baseado nestes, o objetivo desta tese foi melhorar o conhecimento e introduzir o conceito da aplicação de transistores possuindo nanoestruturas metálicas em sua superfície para a integração com células modelos de neurônios e monitoramento dos processos de exocitose destas células. Desta maneira, destaca-se na sequência os principais pontos desenvolvidos nesta tese, assim como os aspectos originais dos resultados experimentais.

Os FETs com superfície de SiO₂ produzidos neste trabalho já são utilizados desde o início de 2000, durante a parte experimental demonstrou-se como a área superficial destes dispositivos pode substancialmente ser aumentada fabricando-se filmes ultrafinos de alumina porosa sobre a sua superfície. Os filmes de alumina possuem uma espessura de aproximadamente 50 nm e seus poros apresentam diâmetros de cerca de 30 nm. Embora a formação de filmes finos de alumina sobre substratos de silício já seja conhecido a mais de uma década, esta foi a primeira demonstração que estes mesmos filmes podem ser produzidos sobre transistores sem afetar de forma significativa as propriedades elétricas destes últimos. A produção destes filmes ultraporosos sobre os FETs permitiu assim estes serem utilizados como moldes para o crescimento *in situ* de nanopartículas de Au na porta dos dispositivos, o qual foi um outro aspecto demonstrado pela primeira vez através deste trabalho. A presença destas nanopartículas na superfície dos FETs causou um aumento de quase quatro vezes na capacitância de superfície

para medidas em solução em comparação aos transistores com somente SiO_2 . Estes efeitos de aumento de capacitância foram atribuídos a densidade de dipolos elétricos criados na superfície das partículas e consequentemente ao aumento da capacitância da dupla camada elétrica.

A partir de medidas de impedância, adaptou-se um modelo para descrever os estados de protonação e desprotonação das superfícies dos óxidos que cobriram a superfície dos FETs. Estes estados de protonação e desprotonação foram associados aos sítios elétricamente ativos e que contribuem para a capacitância de superfície destes óxidos. O modelo demonstrou, ainda que como uma prova de conceito, que é possível de extrair a partir das medidas de impedância a capacitância de superfície causada pela densidade de grupos protonados e ou desprotonados, assim como as constantes cinéticas para estes processos de formação de grupos elétricamente ativos. Esta parte foi apresentada de uma forma qualitativa, mas demonstra-se promissora e abre perspectivas para aplicação em diversos outros tipos de óxidos ou polímeros.

As aplicações dos FETs como biosensores para a detecção de dopamina e serotonina utilizando transistores com configurações diferentes, demonstrou como uma superfície altamente porosa pode ser explorada de forma simples para a imobilização de uma enzima que é capaz de interagir de forma seletiva com dopamina e causar assim mudanças no potencial de superfície dos transistores. As concentrações de dopamina detectáveis foram muito inferiores a de outro trabalho demonstrando a detecção de dopamina com FETs e foram correspondentes a concentrações encontradas durante os processos sinápticos de liberação de dopamina. Este mesmo princípio para imobilização de enzimas nos poros de alumina pode ser extendido para a detecção de diversos outros tipos de moléculas. No caso dos sensores para serotonina, as nanopartículas de Au demonstraram-se como suportes para a formação de monocamadas autoorganizadas que são capazes de interagir seletivamente com determinadas espécies e gerar assim variações no potencial da superfície destas partículas. As concentrações de serotonina detectáveis foram muito próximas dos valores normalmente encontrados para este neurotransmissor no cérebro e ou na corrente sanguínea. O uso desta configuração de transistores para a detecção de neurotransmissores foi também demonstrada pela primeira vez e pode ser expandida para muitos outros analítos que inclusive não são eletroquimicamente ativos.

Na última parte deste trabalho, os experimentos envolvendo a adesão celular demonstraram que as propriedades capacitivas e sensibilidade elétrica das superfícies desempenha um papel importante na resistência específica da junção célula-transistor. Estes

144

efeitos foram depois associados aos experimentos envolvendo a detecção de vesículas liberadas pelas células PC12, os quais demonstraram que uma maior densidade de picos de corrente foi observada para superfícies de SiO₂/Al₂O₃/AuNPs. Os resultados destes dados indicam que as variações de potencial elétrico na dupla camada elétrica formada nas nanopartículas são muito mais sensíveis a adsorção de íons do que as demais superfícies comparadas. Como etapas futuras, estes resultados abrem perspectivas para análises mais específicas visando a compreensão dos efeitos de potencial elétrico em estruturas com dimensões em escalas comparáveis a da dupla camada elétrica.

Por fim, as configurações de transistores nanoestruturados desenvolvidos nesta tese podem ser usadas para uma série de outras aplicações além das mostradas aqui. Os resultados dos experimentos deste trabalho e o aprendizado deixado por estes representam apenas uma pequena parcela dos processos e fenômenos envolvidos nestas superfícies. Trabalhos futuros com estas configurações de transistores certamente poderão explorar melhor como os efeitos interfaciais podem ser utilizados para monitorar eventos da atividade elétrica de células eletrogênicas.

Anexo A

Neste anexo serão descritos algumas das técnicas utilizadas para a fabricação dos transistores de efeito de campo.

A.1 Oxidação

A oxidação térmica consiste no crescimento de uma camada de óxido de silício (SiO_2) sobre o próprio substrato de silício. A formação deste é realizada usualmente em fornos convencionais de oxidação. Basicamente, o SiO₂ térmico é crescido através da reação entre o silício do substrato e uma espécie oxidante, tal como O₂ ou vapor da água. A reação destes com o silício é mostrada abaixo:

$$Si_{(s)} + O_{2(g)} \rightarrow SiO_{2(s)}$$

$$Si_{(s)} + 2H_2O_{(v)} \rightarrow SiO_{2(s)} + 2H_{2(g)}$$

Na Figura A.1 é mostrada uma representação esquemática do processo de oxidação em um forno convencional. Neste, as amostras são conduzidas através de um tubo cilíndrico de quartzo fundido. Dentro deste então, as lâminas de Si são dispostas verticalmente sobre um substrato (barca) feito de quartzo, sendo que em uma das extremidades do tubo uma espécie oxidante é introduzida junto a este. Posteriormente, através dos mecanismos de aquecimento térmico como convecção e condução, a espécie oxidante é aquecida pela energia térmica dissipada de uma resistência e transfere parte de seu calor para as lâminas de Si. O fluxo desta é indicado na Figura A.1.1. Na outra extremidade, um fluxo de ar filtrado e altamente puro é mantido na direção perpendicular ao fluxo do gás contendo a espécie oxidante. O uso deste reduz a quantidade de material particulado no forno e como consequência minimiza contaminações no óxido. A temperatura de oxidação está geralmente entre 900 °C e 1200 °C, e o fluxo de gás é cerca de 1 L min⁻¹. Adicionalmente, os fornos de oxidação possuem sistemas que regulam o fluxo e a sequência de entrada dos gases, assim como, uma rampa de aquecimento, o que evita



Figura A.1.1 Ilustração de um forno térmico convencional.

desta maneira que as lâminas e o óxido sofram algum processo de estresse devido a mudança repentina de temperatura.

Uma característica importante da oxidação térmica é que o óxido formado apresenta uma estrutura amorfa, e portanto, não apresenta periodicidade através de sua rede de átomos. Além disso, as distâncias intermoleculares se apresentam de forma relativamente grandes, de modo que somente cerca de 43% do espaço é ocupado pelas moléculas de SiO₂. Isto significa que uma variedade de impurezas como Na⁺ podem penetrar e difundir-se através desta. Uma outra consideração importante é quanto ao tipo de espécie oxidante utilizada. A oxidação realizada somente com O₂ é conhecida como oxidação seca, enquanto que aquela que utiliza vapor de água é chamada de oxidação úmida. A diferença fundamental entre estas está relacionada com a espessura do óxido formado, isto é, enquanto a oxidação seca é utilizada no crescimento de filmes finos (< 100 nm), a oxidação úmida no mesmo intervalo de tempo da seca proporciona a formação de filmes relativamente mais espessos (> 100 nm). Ao final dos processos de oxidação, as espessuras dos óxidos formados foram medidas utilizando-se um interferômetro Rudolph/FTM (quando a espessura foi > 100 nm) e um elipsômetro Auto EL (quando a espessura foi < 100 nm) com laser (λ =632,8nm) de He-Ne e ângulo de incidência de 70°, ambos da Empresa Rudolph Technologies, Inc.

A.2 Litografia

A litografia é um processo de transferência de padrões com formas geométricas iguais e/ou diferentes desenhadas em uma máscara, para uma fina camada de um polímero fotosensível que recobre uma superfície onde os padrões serão gravados. São estes padrões que definem as várias regiões de um transistor, isto é, as regiões de dopagem, porta, trilhas de contato elétrico, e até mesmo a formação de canais microfluídicos. Entre as várias técnicas de litografia existentes atualmente, a mais comum nos laboratórios de microfabricação é a litografia óptica. Esta, utiliza luz ultra-violeta (UV) normalmente com comprimentos de onda entre 200 nm e 400 nm. Para a sua realização, utiliza-se fotoalinhadoras equipadas com lâmpadas de Hg ou Xe de alta potência. Em adição, é a resolução destas que define as dimensões mínimas dos padrões que podem ser transferidos para um substrato. Os padrões a serem transferidos utilizando esta, são projetados normalmente em programas CAD e posteriormente transferidos para um substrato que atuará como máscara litográfica.

Tipos de máscaras e fotoresinas

Usualmente as máscaras utilizadas são formadas por materiais a base de quartzo, sendo um dos seus lados recobertos com uma camada de cromo. Adicionalmente, as máscaras de litografia podem ser classificadas em máscaras de campo escuro ou campo claro. Máscaras de campo escuro apresentam seus padrões não preenchidos pela camada de cromo, e logo o desenho na máscara está em uma região transparente desta. Ao passo que máscaras de campo claro possuem apenas seus padrões recobertos com a camada de cromo, estando o restante da máscara transparente. A diferença entre elas está diretamente ligada às fotoresinas utilizadas durante os processos de litografia. Estas, também são divididas em dois tipos: Resinas positivas e resinas negativas. A diferença básica entre elas é a sua natureza química e consequentemente sua reatividade após exposição a luz ultra-violeta.

Genericamente, fotoresinas positivas tornam-se solúveis em solventes específicos após a sua exposição à luz UV, isto pois, a energia dos fótons proveniente desta última é capaz de romper ligações na cadeia polimérica tornando-a assim menor e consequentemente aumentando sua solubilidade. Já as fotoresinas negativas, quando expostas a luz UV tornam-se insolúveis
devido as reações químicas produzidas pela interação da luz com as cadeias poliméricas. Comumente, a insolubilidade destas aumenta pois a interação das moléculas do polímero com os fotons da luz UV resulta na formação de ligações cruzadas (cross-linking) entre as cadeias poliméricas. Na Figura 2.4 é mostrado um esquema do processo de litografia utilizando fotoresinas positivas e negativas.

Convencionalmente, o processo de fotogravação inicia-se com a aplicação de forma homogênea da fotoresina desejada sobre o substrato no qual se pretende transferir os padrões da máscara. Esta etapa normalmente é realizada com ajuda de um spinner. Após um processo de pré-cura, o substrato é então levado à fotoalinhadora para a realização do processo de fotogravação. Nesta, a máscara contendo os padrões pode ser disposta de duas formas sobre o substrato, isto é, ela pode ficar em contato direto com o material ou em modo de proximidade, no



Figura A.1.2 Ilustração do processo de litografia óptica empregando-se resinas positivas e negativas.

qual a mesma é disposta apenas alguns micrômetros da superfície deste. Ambos possuem vantagens e desvantagens, porém tão importante quanto estas, é a classificação da sala na qual o processo é realizado. De modo a minimizar contaminações por pequenas partículas nas estruturas a serem fotolitografadas, é recomendável que a sala seja no mínimo de classe 100, ou seja, possua 100 partículas por pé cúbico. Ainda, devido a sensibilidade da fotoresina à luz UV, todo o processo desde a aplicação do polímero sobre o substrato até a fotogravação, deve ser feita em

sala com luz amarela. Após a fotogravação, as regiões da fotoresina não sensibilizadas são então removidas com um solvente específico através de um processo conhecido como revelação.

A.3 Dopagem

A dopagem de um semicondutor, consiste na inserção de impurezas dentro da rede cristalina deste. O principal objetivo desta é mudar e modular as propriedades elétricas do material. O método mais utilizado atualmente para dopagem é a implantação iônica. Esta, consiste na introdução de íons altamente energéticos dentro da rede cristalina do semicondutor. Normalmente, a energia destes íons varia entre 1 keV e 1 MeV, resultando numa distribuição de íons com uma profundidade no substrato variando desde 10 nm até cerca de 10 μ m. As doses de íons também variam desde 10¹² íons cm⁻² para ajuste da tensão limiar até 10¹⁸ íons cm⁻² para a formação das regiões de fonte e dreno. A principal vantagem desta técnica em relação ao processos de difusão, é o seu maior controle na quantidade de dopantes dentro do substrato, o que para um processo MOS é de extrema importância, tendo em vista que é através desta implantação que serão formadas as regiões de fonte e dreno no dispositivo. Além disso, o maior controle de dopantes permite também um melhor ajuste da tensão limiar de condução do respectivo transistor. Entre outras vantagens da técnica de implantação de íons, está também o seu relativo curto tempo de processo, o qual embora dependa da dose de íons a serem implantados, dura apenas poucos minutos, ao contrário do processo de difusão o qual pode durar até dias. Através deste, é possível também realizar-se o processo de dopagem de forma mais homogênea, assim como, alcançar um bom grau de reprodutibilidade. Além destes, a implantação de íons é ainda realizada em temperaturas relativamente baixas, com diferentes materiais como óxidos, nitretos, metais e fotoresinas, podendo atuar como máscaras. Uma outra vantagem importante desta técnica é a baixa profundidade de penetração dos íons no substrato, permitindo assim modificações apenas próximas da superfície. Por fim, a sequência das etapas de implantação, isto é, as diferentes energias e doses aplicadas, permitem também uma otimização dos perfis de dopagem no substrato. A desvantagem deste processo é que como os íons são implantados na lâmina através de impacto, este processo causa danos na rede cristalina do semicondutor. Portanto, é necessário fazer uma etapa posterior de recozimento da lâmina para a reconstrução da rede cristalina.

Processo de Implantação Iônica

O processo de implantação de íons tem como ponto inicial a ionização de um gás, o qual contém o elemento químico a ser implantado. No caso da dopagem de boro, o gás é o trifluoreto de boro (BF₃). A ionização deste ocorre em função do aquecimento de um filamento de tungstênio, o qual está dentro de uma câmara de ionização contendo o respectivo gás. A ionização leva a geração dos íons B⁺ e F⁻. Em seguida, uma voltagem de extração em torno de 40 kV faz com que os íons gerados no processo anterior sejam conduzidos para fora da câmara de ionização e direcionados para um sistema de filtro por massa atômica, também conhecido como "mass analyzer". Este sistema por sua vez, tem a finalidade de deixar apenas os íons desejados, neste caso B⁺, passarem através dele. Esta seleção é realizada por um campo magnético imposto no caminho dos íons, tal que, somente os íons com a relação carga/massa desejada possam passar. Os íons selecionados entram então num tubo acelerador, onde estes serão conduzidos com uma energia de implantação específica para a dosagem sobre o substrato. Dentro deste tubo acelerador existem diversas aberturas que garantem que o feixe está bem colimado. A pressão neste é mantida também abaixo de 10^{-4} Pa para fins de evitar espalhamento dos íons por moléculas de gás. Ao atingirem a amostra, os íons são varridos sobre a superfície da lâmina utilizando pratos de deflexão eletrostática. Para se evitar a canalização de íons dentro do substrato, a lâmina é disposta no porta amostra com uma angulação de 7º em relação ao feixe. Esta inclinação evita o efeito de canalização que ocorre na rede cristalina do Si.

As interações dos íons dopantes com os átomos da superfície da amostra são dos tipos atômicas e eletrônicas, fazendo com que os íons percam sua energia e fiquem localizados apenas em uma pequena profundidade da superfície do substrato. Esta última pode ser controlada ajustando a energia de aceleração dos íons. A dose de dopantes pode também ser controlada monitorando-se a corrente de íons durante a implantação. Este monitoramento dos íons implantados pode ser efetuado em tempo real observando-se no monitor as curvas gaussianas do perfil de implantação.

A.4 Metalização

A metalização é a última etapa na fabricação de um transistor. A finalidade desta é a formação de regiões de contato elétrico para os terminais de fonte e dreno, assim como para o eletrodo de porta. Usualmente, o metal mais empregado nesta é o alumínio, o qual possui em relação aos demais bons condutores como Cu, Ag e Au, um baixo ponto de fusão (660 °C), além ainda de apresentar uma baixa resistividade (cerca de 2,7 $\mu\Omega$.cm) e boa aderência sobre o SiO₂.

Tipos de Metalização

A deposição de alumínio sobre um substrato pode ser realizada tanto por métodos físicos como PVD (Physical-Vapor Deposition), assim como por químicos através de CVD (Chemical-Vapor Deposition). Este último, consiste em uma reação em fase gasosa entre duas ou mais substâncias das quais o metal a ser depositado sofre redução e consequentemente é depositado sobre o substrato. Entre as vantagens deste método, estão o seu bom grau de cobertura, assim como a possibilidade de metalização de diversas lâminas simultaneamente. Já na metalização por PVD, o metal a ser depositado é aquecido até sua fusão e consequente evaporação por algum método físico como um feixe de elétrons, aquecimento de uma resistência ou mesmo por rádio-frequência (RF). Todo este processo é realizado dentro de uma câmara fechada, onde o metal evaporado irá ser depositado por todas as partes, inclusive sobre o substrato. No processo por PVD as duas formas disponíveis para evaporação de alumínio são, a evaporação térmica e a por feixe de elétrons.

Metalização por Feixe de Elétrons

Para a metalização por feixe de elétrons, utiliza-se um planetário onde as lâminas de Si são dispostas. Com as lâminas presas neste e com um cadinho contendo barras de alumínio altamente puro (99,999%), incide-se através de um canhão de elétrons um feixe destes sobre as barras de alumínio, com o aquecimento o metal funde e evapora por toda a câmara (planetário) sendo assim depositado sobre todas as lâminas. Durante a evaporação, o planetário é mantido em rotação com o intuito de obter-se uma camadade alumínio de melhor uniformidade sobre as

lâminas. Os inconvenientes deste processo estão relacionados ao seu mais alto custo em comparação com a evaporadora térmica. O feixe de elétrons utilizado neste processo causa a quebra de ligações no alumínio e gera uma radiação ionizante, a qual pode causar a ionização do SiO₂, gerando portanto cargas móveis dentro deste. Todavia, a vantagem deste processo é que ele fornece um material de altíssima pureza (99,999%), pois não causa o aquecimento da câmara, e portanto, impurezas que podem estar no ambiente não são depositadas juntamente com o alumínio.

Evaporação Térmica

Para a evaporação térmica, as lâminas também são dispostas dentro uma câmara, a qual possui um filamento de tungstênio juntamente com um cadinho contendo barras de alumínio para serem evaporadas. Para a evaporação ocorrer, o filamento de tungstênio é aquecido a altas temperaturas (cerca de 660 °C). Promovendo assim a evaporação do alumínio e sua consequente deposição sobre as lâminas e as paredes da câmara. As desvantagens relacionadas a esse tipo de evaporação estão ligadas a utilização do filamento de tungstênio se oxida com o tempo, após seu aquecimento a altas temperaturas, este óxido contamina o ambiente da câmara, sendo depositado junto com o alumínio. Isto gera um material depositado de pureza inferior ao método citado anteriormente. Para o segundo caso, como a lâmina permanece estática dentro da câmara, o material é depositado com uma uniformidade também inferior ao material conseguido através do planetário. A vantagem deste método está em sua simplicidade e baixo custo.

Anexo B

Tabela B.1. Tabela de problemas na fabricação e caracterização dos dispositivos elétricos (Capítulo 2) e possíveis alternativas para solucioná-los.

Item	Problema	Solução
2.1.2 e 2.3.3	O filme de alumínio não tem boa adesão sobre a superfície de SiO ₂	Antes da deposição de alumínio, limpe a superfície do substrato com um jato de N_2 extremamente puro ou faça um tratamento da superfície com plasma de O_2 para remover possíveis impurezas adsorvidas. A deposição de alumínio deve ser realizada com baixas taxas de deposição por minuto.
2.1.3 e 2.3.4	Não é possível observar utilizando o MEV que as nanopartículas de Au cresceram até o topo dos poros de alumina	Após a síntese, caso as nanopartículas cresceram até o topo dos poros, a superfície da alumina apresentará uma coloração verde-escuro. Caso ela não apresente esta coloração, emergir a superfície por 1 min. novamente na solução de Au e hidroquinona utilizada previamente.
2.3.7	Após a anodização os FETs não apresentam comportamento elétrico como demonstravam antes desta etapa.	Devido ao alto campo elétrico gerado durante a anodização, este pode afetar as propriedades elétricas dos FETs. Realizando-se um processo de sinterização dos chips a 400 °C em uma atmosfera de N ₂ por 30 min. faz com que os dispositivos voltem a funcionar apropriadamente.
2.5.1	Durante o período de crescimento das células sobre os chips haviam estruturas esponjosas flutuando no meio de cultura.	Problemas de contaminação por fungos e/ou bactérias são comuns e neste caso as células no chip devem ser descartadas lavando-se o chip primeiramente com solução de etanol 70% e posteriormente com solução de tripsina 10% e água deionizada. Para evitar contaminação das células, trocar o meio de cultura a cada 24h.

Bibliografia

- [1] R. W. Williams and K. Herrup. Ann. Rev. Neurosci., 11, 423, 1988.
- [2] J. Malmivuo and R. Plonsey. "Introduction." In "Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields," p. 11. Oxford University Press, 1995.
- [3] M. Piccolino. Brain Res. Bull. 46, 381, 1998.
- [4] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley, J. Phys., 116, 473, 1952.
- [5] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley. J. Phys., 117, 500, 1952.
- [6] E. Neher and B. Sakmann. *Nature*, 260, 799, 1976.
- [7] R. E. Kandel, J. H. Schwartz, and T. M. Jessel. Nerve Cells and Behavior. In Principles of Neural Science," 2, pp. 24–25. McGraw-Hill Companies, 4th edn., 2000.
- [8] N. A. Campbell and J. B. Reece. "Nervous System." In "Biology," pp. 1012–1043. Pearson Education Inc, 2005.
- [9] C. A. Thomas, P. A. Springer, L. M. Okun, Y. Berwaldn, and G. E. Loeb. Exp. Cell Research, 74, 61, 1972.
- [10] J. Pine. J. Neurosci. Methods, 2, 19, 1980.
- [11] G. W. Gross, W. Y. Wen, and J. W. Lin. J. Neurosci. Methods, 15, 243, 1985.
- [12] P. Bergveld. IEEE Trans. Biomed. Eng. BME-17, 70, 1970.
- [13] G. Krause, S. Lehmann, M. Lehmann, I. Freund, E. Schreiber, and W. Baumann. Biosens. & Bioelectron. 21, 1272, 2006.
- [14] A. Offenhaeusser, C. Sproessler, M. Matsuzawa, and W. Knoll. *Biosens. & Bioelectron.* 12, 819, 1997.
- [15] M. Krause, S. Ingebrandt, D. Richter, M. Denyer, M. Scholl, C. Sproessler, and A. Offenhaeusser. Sens. Actuators B. 70, 101, 2000.
- [16] J. -K. Shin, D.-S. Kim, H.-J. Park, G. Lim. Electroanalysis. 16, 1912, 2004.
- [17] M. Zayats, O. A. Raitman, V. I. Chegel, A. B. Kharitonov, I. Willner. Anal. Chem. 74, 4763, 2002.
- [18] A. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault. Biosens. Bioelectron. 19, 131, 2003.
- [19] J. Lichtenberger, P. Fromherz. Biophys. J. 92, 2262, 2007.

- [20] S. Ayers, B. Khajak, K. D. Gillis, M. Lindau, B. A Minch. *IEEE Trans. Biomed. Circ. Syst.* 4, 86, 2010.
- [21] J. Huguenard, D. A. McCormick, Electrophysiology of the neuron An interactive tutorial. Oxford University Press, Inc., New York, 1994.
- [22] http://pt.wikipedia.org/wiki/Potencial_de_a%C3%A7%C3%A3o, consultado em 20-01-2012.
- [23] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gap_cell_junction_en.svg. 15, consultado em 21-01-2012.
- [24] Squire L.R.; McConnell S.K.; and Zigmond M.J. Fundamental neuroscience. Academic Press, 2, illustrated edition, 2003.
- [25] C. Amatore, S. Arbault, M. Guille, and F. Lemaitre. Chem. Rev. 108, 2585, 2008.
- [26] G. Dernick, L.-W. Gong, L. Tabares, G. A. Toledo, M. Lindau. Nat. Methods. 2, 699, 2005.
- [27] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Patch_clamp.svg, consultado em 21-01-2012.
- [28] M. R. Wightman, Science. 311, 1570, 2006.
- [29] D. M. Cannon, Jr., N. Winograd, A.G. Ewing, Ann. Rev. Biophy. Biomol. Struct., 29, 239, 2000.
- [30] M. F. Bader, R. W. Holz, K. Kumakura, N. Vitale. Ann. N.Y. Acad. Sci. 971, 178, 2002.
- [31] L. A. Greene, A. S. Tischler. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2424, 1976.
- [32] G. Dernick, G. A. Toledo, M. Lindau. Nat. Cell Biol. 5, 358, 2003.
- [33] G. A. Toledo, R. F. Chacon, J. M. Fernandez. Nature. 363, 554, 1993.
- [34] M. Sze, Semiconductor devices: Physics and technology. 2^a ed. John Willey- New York 2002.
- [35] Muller R. S. and T. I. Kamins. Device electronics for integrated circuits (John Wiley & Sons), 2002.
- [36] A. S. Sedra, K. C. Smith, Microeletrônica, 4^a edição. Tradução: A. C. Seabra, M. L. Netto, S. G. S. Filho, W. A. M. Van Noije, Pearson Makron Books, São Paulo, 2000.
- [37] P. Bergveld, IEEE Trans. BME 19, 342, 1972.
- [38] P. Bergveld, Sens. Act. B 88, 1, 2003.
- [39] I. Lundström, A. S. Shivaraman, C. M. Svensson, L. Lundkvist, *Appl. Phys. Lett.* 26, 3876, 1975.
- [40] I. Lundström, A. S. Shivaraman, C. M. Svensson, L. Lundkvist, *Appl. Phys. Lett.* 26, 55, 1975.

- [41] G. Cao, Nanostructures and nanomaterials: Synthesis, properties and applications, Imperial College Press, Londres, 2004.
- [42] G. F. Blackburn, M. Levy, J. Janata. Appl. Phys. Lett. 43, 700, 1983.
- [43] J. Zhang, T. Atay, A. V. Nurmikko. Nano Lett. 9, 519, 2009.
- [44] Y. Huang, M. C. Pitter, M. G. Somekh. Langmuir 27, 13950, 2011.
- [45] P. C. Rusu, G. Brocks. Phys. Rev. B 74, 073414, 2006.
- [46] A. Ulman, Chem. Rev. 96, 1533, 1996.
- [47] A. Huczko, Appl. Phys. A 70, 365, 2000.
- [48] J. W. Diggle, T. C. Downie, C. W. Goulding, Chem. Rev. 69, 365, 1969.
- [49] H. Masuda, K. Fukuda, Science 268, 1466, 1995.
- [50] K. Nielsch, J. Choi, K. Schwirn, R. B. Wehrspohn, U. Gösele, Nano Lett. 2, 677, 2002.
- [51] Y. Kobayashi, C. R. Martin. Anal. Chem. 71, 3665, 1999.
- [52] A. J. Bard, L. R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2a edition, John Wiley and Sons, New York, 2001.
- [53] J. O. Bockris, M. A. Devanathan, and K. Müller, Proc. R. Soc. 55, A274, 1963.
- [54] J.O. Bockris, A. K. N. Reddy, Modern electrochemistry, Plenum Press, New York, 1970.
- [55] F. Tessier, G. W. Slater, *Electrophoresis* 27, 686, 2006.
- [56] R. Weis, B. Müller, P. Fromherz. Phys. Rev. Lett. 76, 327, 1996.
- [57] Regehr, W.G., Pine, J., Cohan, C.S., Mischke, M.D., Tank, D.W., J. Neurosci. Methods 30, 91, 1989.
- [58] Ingebrandt S., Yeung C., Krause M., Offenhauesser A. Eur Biophys J, 34, 144, 2005.
- [59] R. Weis, P. Fromherz. Phys. Rev. E 55, 877, 1997.
- [60] S. Schäfer, S. Eick, B. Hofmann, T. Dufaux, R. Stockmann, G.Wrobel, A. Offenhäusser, S. Ingebrandt, *Biosens. Bioelec.* 24, 1201, 2009.
- [61] V. Kiessling, B. Müller, and P. Fromherz, Langmuir 16, 3517, 2000.
- [62] M. Kokonou, A. G. Nassiopoulou, K. P. Giannakopoulos. Nanotech. 16, 103, 2005.
- [63] M. Kokonou, A. G. Nassiopoulou, A. Travlos. Mater. Sci. Eng. B 103, 65, 2003.
- [64] Y. F. Mei, X. L. Wu, X. F. Shao, G. S. Huang, G. G. Siu. Phys. Rev. B 309, 109, 2003.
- [65] D. H. Kuo, B. Y. Chung, R. J. Wu. Thin Solid Films, 398, 35, 2001.
- [66] M. S. Sander, L. –S. Tan. Adv. Funct. Mat. 13, 393, 2003.
- [67] Wu, M., Wen, L., Lei, Y., Ostendorp, S., Chen, K., Wilde, G. Small. 6, 695, 2010.

- [68] Shingubara, S., Morimoto, K., Sakaue, H., Takahagi, T. *Electrochem. Solid-State Lett.* 7, E15, 2004.
- [69] Nielsch, K., Choi, J., Schwirn, K., Wehrspohn, R. B., Goesele, U. Nano Lett. 2, 677, 2002.
- [70] Thompson, G. E., Wood, G. C. Anodic Films on Aluminum, In *Treatise on Materials Science and Technology*; Scully, J. C., Ed.; Academic Press: New York, **1983**; Vol. 23, Chapter 5, p 205.
- [71] Lee, W., Ji, R., Goesele, U., Nielsch, K. Nat. Mat. 5, 741, 2006.
- [72] JCPDS Au, 04-0784. (www.icdd.com)- consultado em 20 de Agosto de 2010.
- [73] B. Das, C. Garman, Microelectron. J. 37, 695, 2006.
- [74] J.H. Kim, K.H. Baek, C.K. Kim, Y.B. Kim, C.S. Yoon, Appl. Phys. Lett. 90, 123118, 2007.
- [75] B. Park, K. Cho, H. Kim, S. Kim, Semicond. Sci. Technol. 21, 975, 2006.
- [76] J. Lambert, C. Guthmann, C. Ortega, M. Saint-Jean, J. Appl. Phys. 91, 9161, 2002.
- [77] I. Vrublevsky, A. Jagminas, J. Schreckenbach, W.A. Goedel, *Appl. Surf. Sci.* 253, 4680, 2007.
- [78] I. Vrublevsky, V. Parkoun, J. Schreckenbach, W.A. Goedel, *Appl.Surf. Sci.* 252, 5100, 2006.
- [79] J.K. Kim, H.J. Cheong, Y. Kim, J.Y. Yi, H.J. Park, Appl. Phys. Lett. 82, 2527, 2003.
- [80] S.B. Cronin, Y. Lin, O. Rabin, M.R. Black, J.Y. Ying, M.S. Dresselhaus, P.L. Gai, J. Minet, J. Issi, *Nanotechnology* 13, 653, 2002.
- [81] F. Schröper, D. Brüggemann, Y. Mourzina, B. Wolfrum, A. Offenhauesser, D. Mayer. *Electrochimica Acta 53*, 6265, 2008.
- [82] Chou A. I., K. Lai, K. Kumar, P. Chowdhury and J. C. Lee. Appl. Phys. Lett. 70, 3407, 1997.
- [83] Smith, C. P., White, H. S. Langmuir 9, 1, 1993.
- [84] G. Shalev, A. Cohen, A. Doron, A. Machauf, M. Horesh, U. Virobnik, D. Ullien and Ilan Levy, Sensors 9, 4366, 2009.
- [85] Y. Wang, C. Bryan, H. Xu, P. Pohl, Y. Yang, C. J. Brinker, J. Coll. Inter. Sci. 254, 23, 2002.
- [86] R. Andreu, W.R. Fawcett, J. Phys. Chem. 98, 12753, 1994.
- [87] W.R. Fawcett, M. Fedurco, Z. Kovacova, Langmuir 10, 2403, 1994.
- [88] R. Schweiss, C. Werner, W. Knoll, J. Electroanal. Chem. 540, 145, 2003.

- [89] G. Oskam, P. M. Hoffmann, J. C. Schmidt, and P. C. Searson. J. Phys. Chem. 100, 1801, 1996.
- [90] W. P. Gomes and F. Cardon, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 74, 431, 1970.
- [91] M. Tomkiewicz, *Electrochim. Acta 35*, 1631, **1990**.
- [92] G. Oskam, D. Vanmaekelbergh, and J. J. Kelly, *Electrochim. Acta 38*, 301, 1993.
- [93] Uslu, F., Ingebrandt, S., Mayer, D., Böcker-Meffert, S., Odenthal, M., Offenhäusser, A., Biosens. Bioelectron. 19, 1723, 2004.
- [94] Van Hal, R. E. G., Eijkel, J. C. T., Bergveld, P., Adv. Colloid Interface Sci. 69, 31, 1996.
- [95] G. D. Parfitt. Surface Chemistry of Oxides. Pure & Appl. Chem. 48, 415, 1976.
- [96] Faria, R. O., Moure, V. R., Amazonas, M. A. L. A., Krieger, N., Mitchell, D. A., Food Technol. Biotechnol. 45, 287, 2007.
- [97] S.Y. Seo, V.K. Sharma, N. Sharma, J. Agricult. Food Chem. 51, 2837, 2003.
- [98] Heien, M. L., Ewing, A. G., Quantitative Chemical Analysis of Single Cells, in: Lee, J.W., Foote, R.S. (Eds.), Methods in molecular Biology. Humana Press, pp. 153, 2009.
- [99] Rodriguez-Lopez, J. N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmona, F., Garcia-Canovas, F., J. Biol. Chem. 267, 3801, 1992.
- [100] Freeman, R., Elbaz, J., Gill, R., Zayats, M., Willner, I., Chem. Eur. J. 13, 7288, 2007.
- [101] T. Haeften, F. G. Wouterlood, B. Jorritsma-Byham, M. P. Witter. J. Neurosci. 17, 862, 1997.
- [102] M. R. Wightman, C. Amatore, C. Engstrom, P. D. Hale, E. W. Kristensen, W. G. Kuhr, L. J. May. *Neuroscience*. 25, 513, **1988**.
- [103] S. A. Mozaffari, T. Changa, S.-M. Parkb, Biosens. & Bioelectron. 26, 74, 2010.
- [104] L. Bendova, P. Jurecka, P. Hobza, J. Vondrasek. J. Phys. Chem. B 111, 9975, 2007.
- [105] Morgan, H., Sun, T., Holmes, D., Gawad, S., Green, N.G., J. Phys. D Appl. Phys. 40, 61, 2007.
- [106] Dufaux, T., 2008. Design and development of amplifier electronics for silicon nanowire biosensors, Diploma Thesis. RWTH Aachen University, Germany, Bulletins of the Research Center Juelich, 4269, disponível online: <u>http://www.fzjuelich.de/zb/juwel</u>.
- [107] G. Rudnick, Proc. Nat. Acad. Sci. 105, 5949, 2008.
- [108] Pothos, E. N., E. Mosharov, K. P. Liu, W. Setlik, M. Haburcak, G. Baldini, M. D. Gershon, H. Tamir, and D. Sulzer. J. Physiol. 542, 453, 2002.