

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Física
Programa de Pós-Graduação em Física

Pedro Rodrigues de Almeida III

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES COM BASE EM
GRAFENO**

Belo Horizonte

2024

Pedro Rodrigues de Almeida III

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES COM BASE EM
GRAFENO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências, área de concentração: Física.

Orientador: Elmo Salomão Alves

Belo Horizonte

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A447d Almeida III, Pedro Rodrigues de.
Desenvolvimento de biossensores com base em grafeno / Pedro Rodrigues
de Almeida III. – 2024.
79 f. : il.

Orientador: Elmo Salomão Alves.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.
Bibliografia: f. 69-79.

1. Grafeno. 2. Biossensores. 3. Proteínas recombinantes. 4. HIV (Vírus).
I. Título. II. Alves, Elmo Salomão. III. Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Física.

CDU – 621.382 (043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA SESSÃO DE ARGUIÇÃO DA 425ª TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA, DEFENDIDA POR PEDRO RODRIGUES DE ALMEIDA III orientado pelo professor Elmo Salomão Alves, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração física**. Às 14:00 horas de oito de março de dois mil e vinte e quatro, na Sala de Seminários do Departamento de Física – 4117, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores **Elmo Salomão Alves** (Orientador - Departamento de Física/UFMG), **Rodrigo Gribel Lacerda** (Departamento de Física/UFMG), **Wagner Nunes Rodrigues** (Departamento de Física/UFMG), **Eduardo Nery Duarte de Araújo** (Departamento de Física/UFV) e **Alex Aparecido Ferreira** (Departamento de Física/UFPR) para dar cumprimento ao Artigo 37 do Regimento Geral da UFMG, submetendo o mestre **PEDRO RODRIGUES DE ALMEIDA III** à arguição de seu trabalho de Tese de Doutorado, que recebeu o título de "**Desenvolvimento de biossensores com base em grafeno**". O candidato fez uma exposição oral de seu trabalho durante aproximadamente 50 minutos. Após esta, os membros da comissão prosseguiram com a sua arguição, e apresentaram seus pareceres individuais sobre o trabalho, concluindo pela aprovação do candidato.

Belo Horizonte, 08 de março de 2024.

Prof. Elmo Salomão Alves
Orientador do estudante
Departamento de Física/UFMG

Prof. Alex Aparecido Ferreira
Departamento de Física/ UFPR

Prof. Rodrigo Gribel Lacerda
Departamento de Física/UFMG

Prof. Eduardo Nery Duarte de Araújo
Departamento de Física/UFV

Prof. Wagner Nunes Rodrigues
Departamento de Física/UFMG

Candidato: Pedro Rodrigues de Almeida III



Documento assinado eletronicamente por **Alex Aparecido Ferreira, Usuário Externo**, em 11/03/2024, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Gribel Lacerda, Coordenador(a)**, em 11/03/2024, às 12:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Rodrigues de Almeida III, Usuário Externo**, em 11/03/2024, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Nunes Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 11/03/2024, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elmo Salomão Alves, Coordenador(a)**, em 11/03/2024, às 17:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Nery Duarte de Araújo, Usuário Externo**, em 14/03/2024, às 05:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3097754** e o código CRC **76F2485A**.

Agradecimentos

Agradeço primordialmente à minha mãe, Dona Lorena, e ao meu pai, Sr. Doca, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. E, deixo novamente explícito, que serei eternamente grato, a ambos, pelo suor dispensado no intuito de educar e dar o melhor aos seus filhos.

Aos meus irmãos Wagner e Rafael e à minha irmã Adriana, pelos conselhos nos momentos de incertezas.

Ao Elmo Salomão Alves pela paciente orientação, pela amizade e pelo grande respeito durante todos os momentos em que trabalhamos em conjunto.

Aos colegas do Laboratório de Semicondutores da UFMG que me auxiliaram e motivaram durante o mestrado e doutorado.

Aos amigos das Repúblicas Piôka e Viçosa-BH, a todos eles, eu agradeço pelo companheirismo, pelo apoio e pelos ensinamentos que me deram durante os anos convívio.

Aos colegas do CEFET-MG Campus Curvelo pelo companheirismo e incentivo durante todos esses anos.

Agradeço aos parceiros Doutor Elíbio Rech, Luciano Paulino Silva e André Melro Murad, com extensão aos membros e parceiros do grupo do Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa, em Brasília, pelo fornecimento do material biológico utilizado nesse estudo, e pela paciência nos esclarecimentos sobre as informações biológicas necessárias.

Agradeço aos funcionários, pesquisadores e parceiros do Centro de Microscopia da UFMG, do CTNano, do LCPNano e dos Laboratórios de Física Biológica e de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG.

Por fim, agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPEMIG e INCT Nanocarbono pelo apoio financeiro e estrutural à Ciência, Tecnologia e Inovação no Brasil.

Resumo

Os estados membros das Nações Unidas adotaram em 2021 a Declaração Política das Nações Unidas sobre o Fim da AIDS. A declaração especifica diversas ações para atingir a meta de, até o ano de 2030, retirar a AIDS da lista de ameaças à saúde pública. Entre essas ações podemos destacar o uso de medicamentos antirretrovirais como profilaxia pré-exposição e o progresso na pesquisa sobre antirretrovirais à base de microbicidas. Assim, é necessário o desenvolvimento de novos medicamentos anti-HIV e tecnologias que permitam o controle da qualidade destes medicamentos, implicando a sua utilização segura pelos seres humanos. Recentemente, vários estudos relataram as propriedades antivirais das proteínas recombinantes Cianovirina-N (rCV-N), Sictovirina (rSVN) e Grifitissina (rGRFT), que são microbicidas contra o HIV.

Visando auxiliar na produção e no controle de qualidade desses microbicidas, desenvolvemos dispositivos com base em grafeno, estruturado como um transistor de efeito de campo sensível a íons. A funcionalização destes dispositivos com anticorpos apropriados tornou-os seletivos para as proteínas citadas acima. A caracterização dos imunossensores foi realizada a partir de medidas elétricas dos dispositivos, quando em contato com soluções em diferentes concentrações do material biológico estudado.

Medimos mudanças na condução elétrica do grafeno devido à formação de um complexo imune entre os anticorpos imobilizados sobre o material e as proteínas alvo das soluções com material biológico. Estas medições confirmaram a seletividade dos imunossensores desenvolvidos para as proteínas alvo, demonstrando o sucesso do processo de funcionalização do dispositivo.

Desenvolvemos um modelo para explicar o funcionamento do imunossensor produzido nesse estudo, no qual é proposto que efeitos capacitivos são responsáveis pela geração de sinais, de forma que a formação do complexo imune altera a distribuição das cargas elétricas na proximidade do grafeno. A partir de medidas sob ação de campo magnético demonstramos a validade do modelo proposto. Fomos capazes de estabelecer curvas de calibração para imunossensores de rCV-N e rSVN e determinar a concentração limite para detecção dos imunossensores na ordem de pg/mL.

Demonstramos que os imunossensores desenvolvidos são capazes de detectar as proteínas-alvo mesmo em soluções complexas. Isso foi demonstrado utilizando soluções, brutas e semi-purificadas, provenientes de sementes de soja geneticamente modificadas para expressar a proteína rCV-N. Por fim, destacamos a possibilidade do uso desses dispositivos em análises qualitativas e quantitativas de sistemas de expressão de proteínas em plantas e como um potencial auxiliador na produção de inibidores da transmissão do HIV.

Palavras-chave: Grafeno, Imunossensor, Proteínas Recombinantes, HIV.

Abstract

United Nations member states adopted in 2021 the United Nations Political Declaration on Ending AIDS. The declaration specifies various actions to achieve the goal to get the world on track to end AIDS as a public health threat by 2030. Among these actions, we highlight the use of antiretroviral medicines as pre-exposure prophylaxis and progress in research on antiretroviral-based microbicides. Thus, it appears necessary to develop new anti-HIV drugs and technologies that allow for quality control of these drugs, ensuring their safe use by humans. Recently, several studies have reported the antiviral properties of the recombinant proteins Cyanovirin-N (rCV-N), Sictovirin (rSVN) and Grifitisin (rGRFT), which act as microbicides against HIV.

To aid in the production and quality control of these microbicides, we developed devices based on graphene structured as ion-sensitive field-effect transistors. Functionalizing these devices with appropriate antibodies made them selective to the target biological material. The characterization of the immunosensors was carried out based on electrical measurements of the devices, when in contact with solutions at different concentrations of the target biological material.

We measured changes in the electrical conduction of graphene caused by the immune complex formed between antibodies immobilized on graphene and target proteins. These measurements confirmed the developed immunosensors selectivity to target proteins, demonstrating the success of the device functionalization process.

We developed a model to explain the functioning of the immunosensor developed in this study, in which it is proposed that capacitive effects are responsible for the generation of signals, so that the formation of the immune complex alters the distribution of electrical charges in the vicinity of graphene. From measurements under the action of a magnetic field, we demonstrate the validity of the proposed model. We were able to obtain calibration curves for rCV-N and rSVN immunosensors and determine the limit of detection of the immunosensors on the order of pg/mL.

We demonstrated that the developed immunosensors can detect target proteins even in complex solutions. This was demonstrated using crude and semi-purified solutions from soybean seeds genetically modified to express rCV-N protein. Finally, we emphasize the possibility of using these devices in qualitative and quantitative analysis of protein expression systems in plants and as a potential aid in the production of HIV transmission inhibitors.

Keywords: Graphene, Immunosensor, Recombinant Proteins, HIV.

Sumário

1.	Biossensores e Grafeno	9
1.1	Motivação	9
1.2	Biossensores	9
	Anticorpos	11
	Transdutor Eletroquímico.....	12
1.3	Propriedades Eletrônicas do Grafeno	14
	O Grafeno e sua Alta Mobilidade Eletrônica	14
	<i>Gap</i> Nulo	14
	Estrutura Bidimensional	15
	Grafeno como Transdutor para Biossensores	15
1.4	Imunossensor com base em Grafeno	16
	Controle da Condutividade do Grafeno.....	16
	Dupla Camada Elétrica.....	19
	Controle da Condutividade do Grafeno Via Tensão de Porta Superior	20
	ISFET como um Imunossensor	22
	Equilíbrio de Donnan	23
	Grafeno como um Transdutor de um Imunossensor	23
2.	Fabricação de Imunossensores	25
2.1	Fabricação de Dispositivos.....	25
	Obtenção do Grafeno.....	25
	Litografia Óptica.....	26
2.2	Funcionalização dos Dispositivos	30
2.3	Proteínas-Alvo Utilizadas nesse Estudo	33
2.4	Soluções Biológicas Complexas Utilizadas neste Estudo	34
2.5	Lista de Dispositivos Utilizados neste Estudo.....	35
3.	Caracterização de Dispositivos Imunossensores	36
3.1	Montagem Experimental	36
3.2	Medidas da Resistência Elétrica em Função da Tensão de Porta Superior	37
3.3	Efeitos da Funcionalização sobre o Grafeno	38
3.4	Seletividade do Imunossensor de Grafeno	38
3.5	Influência das Dimensões do Dispositivo sobre a Sensibilidade do Imunossensor.....	40
4.	Funcionamento de um Imunossensor com base em Grafeno	43

4.1	Condutividade <i>versus</i> Tensão de Porta Superior.....	43
4.2	Medidas de Condutividade sob Campo Magnético.....	44
4.3	Medidas de Varredura de Porta Superior de um Dispositivo Imunossensor..	49
4.4	Análise de um Imunossensor V_{tg} fixo.....	54
4.5	Comparação Entre as Duas Metodologias de Medidas	57
5.	Imunossensor de rCV-N.....	60
5.1	Calibração do Imunossensor de rCV-N.....	60
5.2	Teste de Reprodutibilidade.....	63
5.3	Detecção de rCV-N em Soluções Biológicas Complexas	64
6.	Conclusão	67
7.	Bibliografia.....	69

1 Biossensores e Grafeno

Neste projeto, apresentaremos o desenvolvimento de um biossensor com base em grafeno capaz de detectar as proteínas recombinantes Cianovirina-N (rCV-N), Sictovirina (rSVN) e Grifitisina (rGRFT), que são microbicidas contra o Vírus da Imunodeficiência Humana. Para compreensão das discussões acerca dos resultados experimentais, apresentaremos, neste capítulo, os tipos de biossensores existentes e descreveremos as funcionalidades e propriedades das componentes que um biossensor deve ter. Apresentaremos, ainda, as principais características do grafeno que o qualificam a ser utilizado como base para um biossensor. Por fim, apresentaremos os princípios teóricos do funcionamento de um imunossensor com base em grafeno, que será fundamental para a compreensão dos resultados de caracterização e aplicação dos imunossensores desenvolvidos.

1.1 Motivação

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), apresenta caráter pandêmico há mais de 40 anos e desde então vem demandando empenho das agências e organizações de saúde no intuito de coibir a transmissão do HIV [1]. Relatório da UNAIDS, programa conjunto das Nações Unidas que tem como objetivo liderar e coordenar a resposta global à epidemia de HIV/AIDS, indica que nos últimos 40 anos cerca de 40 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à AIDS. A UNAIDS estima que em 2022, 39 milhões de pessoas viviam com HIV, sendo que 1,3 milhão de pessoas forem infectadas com HIV naquele ano [2].

Os alarmantes dados estatísticos sobre a transmissão do HIV levaram os estados membros das Nações Unidas a adotarem em 2021 a Declaração Política das Nações Unidas sobre o Fim da AIDS. A declaração especifica diversas ações para atingir a meta de, até o ano de 2030, retirar a AIDS da lista de ameaças à saúde pública. Entre essas ações podemos destacar o uso de medicamentos antirretrovirais como profilaxia pré-exposição e o progresso na pesquisa sobre antirretrovirais à base de microbicidas [3].

Para se alcançar tais objetivos, se mostra necessário o desenvolvimento de novos medicamentos anti-HIV e tecnologias que permitam o controle da qualidade destes medicamentos, implicando a sua utilização segura pelos seres humanos. Recentemente, vários estudos relataram as propriedades antivirais das proteínas recombinantes Cianovirina-N (rCV-N), Sictovirina (rSVN) e Grifitisina (rGRFT), que são microbicidas contra o HIV.

Neste contexto, propomos o desenvolvimento de biossensores capazes de auxiliar no controle da produção em larga escala desses antivirais e que também sejam aplicados à indústria farmacêutica baseada nessas proteínas.

1.2 Biossensores

A detecção de materiais biológicos tem um papel fundamental em uma gama de aplicações, tais como: análises clínicas, monitoramento ambiental, controle de processos industriais, avaliação da qualidade de alimentos etc. [4,5]. Essa demanda tem motivado o

desenvolvimento de novos biossensores capazes de realizar análises rápidas e confiáveis [6]. A figura 1.1 apresenta a evolução do número de publicações sobre biossensores nos últimos 20 anos, onde fica evidenciado o aumento na busca pelo desenvolvimento de novos biossensores. O esforço para atender essa demanda envolve a colaboração de várias áreas do conhecimento, como engenharia, microbiologia, física, química, biologia, biotecnologia, entre outras [7].

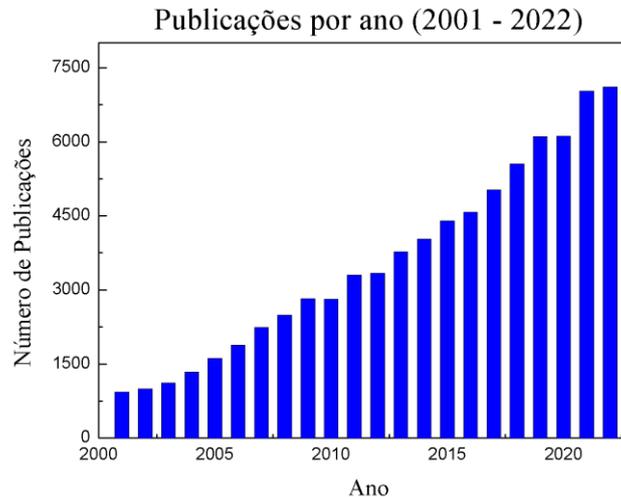


Figura 1.1: Evolução do quantitativo de publicações sobre biossensores entre os anos de 2001 e 2022. Números extraídos da base do *Web of Science*, em 14/06/2023, a partir da busca por “*biosensors*”.

Biossensores são dispositivos que traduzem um evento de biorreconhecimento - por exemplo uma interação anticorpo-antígeno - em um sinal mensurável; esse sinal pode ser de natureza elétrica, óptica, magnética, térmica ou mecânica [5,6,8]. Os biossensores aproveitam a sensibilidade e alta especificidade das interações biológicas em conjunto com transdutores físico-químicos para fornecer, de forma simples, resultados bioanalíticos complexos [9]. Em suma, um biossensor é composto de um sistema de reconhecimento biológico, um transdutor e uma unidade de processamento de sinais [7–9].

O sistema de reconhecimento é a parte responsável pela interação direta com o material biológico de interesse. Essa parte pode ser, por exemplo, uma enzima, um anticorpo, um aptâmero, um ácido nucleico etc. [6]. A interação entre o sistema de reconhecimento e o material biológico de interesse, resulta na produção de agentes físicos ou químicos, tais como calor, luz, som; então, o transdutor transforma esse resultado em valores mensuráveis. O transdutor pode ser um eletrodo, um semiconductor, um termostato, um detector de som. A unidade de processamento de sinais, filtra e analisa os valores obtidos pelo transdutor [4,6,7,10]. Essa estrutura de um biossensor está mostrada, esquematicamente, na figura 1.2.

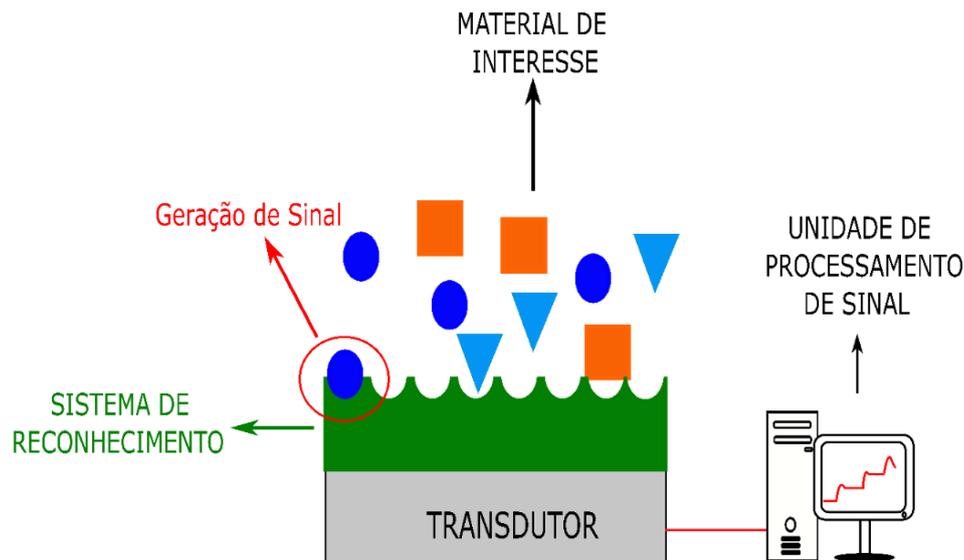


Figura 1.2: Esquema da estrutura de um biossensor. Um transdutor (cinza) emite um sinal à unidade processamento quando existe a interação entre o sistema de reconhecimento (verde) e o material biológico de interesse (círculo azul escuro), materiais biológicos de não interesse (quadrado laranja e triângulo azul claro) não interagem com o sistema de reconhecimento.

Como dito, várias substâncias podem ser utilizadas como elementos de reconhecimento de biossensores. Em nosso estudo, iremos demonstrar o desenvolvimento e o funcionamento de um biossensor eletroquímico que detecta a interação anticorpo-antígeno, sendo o grafeno a base utilizada como transdutor eletroquímico.

Anticorpos

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, são proteínas, produzidas pelos linfócitos B, com a função de reconhecer e se ligar a corpos estranhos ao organismo, chamados de antígenos [11].

Os anticorpos apresentam uma estrutura na forma de Y, como esquematizado na figura 1.3. Os “braços” do Y são formados por duas cadeias polipeptídicas, denominadas cadeia pesada e cadeia leve. Nas extremidades dessas regiões que ocorrem as ligações com os antígenos. Por isso, essas regiões são chamadas de *fragmentos de ligação do antígeno* (Fab). A “base” do Y é a continuação da cadeia pesada e não interage com os antígenos, entretanto são responsáveis por facilitar a eliminação dos antígenos pelo sistema imune [12].

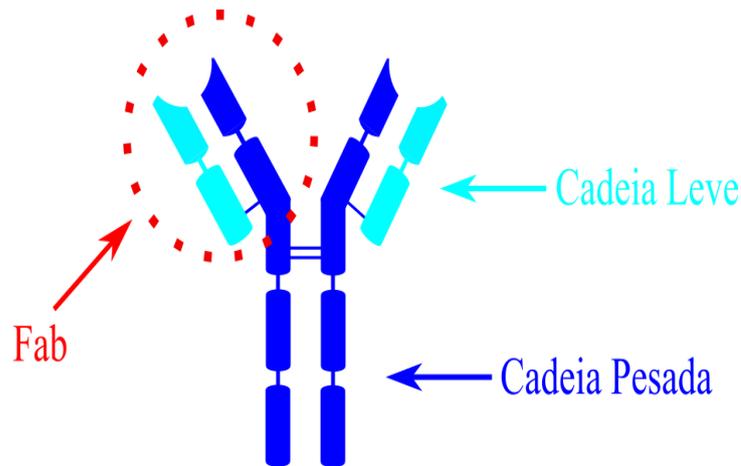


Figura 1.3: Representação esquemática da estrutura de um anticorpo.

O princípio de funcionamento de um biossensor com base em anticorpos é a formação do complexo imune, por isso esses biossensores são chamados de *imunossensores* [6]. A ligação entre o anticorpo e o antígeno, chamado de complexo imune [13], ocorre via ligações não-covalentes, tais como, ligações iônica, ponte de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals [14,15]. A contribuição de cada uma dessas forças depende do par anticorpo-antígeno interagentes, apesar de individualmente cada uma dessas interações ser relativamente fraca, o resultado coletivo dessas interações pode ser forte. Anticorpos e antígenos são moléculas grandes e fatores como o grande número de interações que podem ocorrer entre o anticorpo e o antígeno, a temperatura, o pH e a força iônica, do meio em que estão, tornam a ligação anticorpo-antígeno um processo complexo [16–18].

É importante citar que os anticorpos podem ser classificados em dois tipos: monoclonal ou policlonal. Os anticorpos monoclonais se originam a partir de uma única linhagem de linfócitos B, enquanto os anticorpos policlonais tem origem em uma mistura de diferentes linhagens de linfócitos B. Essa diferença na origem faz os anticorpos monoclonais mais específicos a determinado antígeno, que os anticorpos policlonais [11].

Sistemas de reconhecimento baseados em anticorpos fazem uso da sensibilidade e especificidade das interações anticorpo-antígeno. A maior vantagem da utilização desse tipo de sistema de reconhecimento é que a amostra a ser analisada não precisa estar purificada antes da detecção [19].

Transdutor Eletroquímico

Biossensores eletroquímicos se baseiam no consumo, geração ou redistribuição espacial de espécies eletroquímicas durante a interação entre a amostra analisada e o sistema de reconhecimento [6,10,20]. Transdutores eletroquímicos são ideais para aplicação em biossensores devido à sua alta sensibilidade e seletividade, tamanho portátil, resposta rápida e baixo custo de produção [10,20,21]. Os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em três tipos: condutimétricos, potenciométricos e amperométricos [10,20].

Condutimétricos: Biossensores condutimétricos medem as mudanças na condutância ou na resistência elétrica entre um par de eletrodos em uma solução, que ocorrem devido às interações entre o sistema de reconhecimento, do biossensor, e material a ser detectado,

presente na solução [6,10,20]. Os biossensores condutimétricos são atrativos por apresentarem uma estrutura simples e terem um baixo custo de produção [21]. Os problemas desse tipo de biossensor é que não são seletivos a um tipo específico de íon [20] e apresentam sensibilidade relativamente baixa [6].

Amperométricos: Biossensores amperométricos consistem em dois eletrodos submersos em uma solução adequada, o dispositivo mede a corrente elétrica através da solução [6,20,21]. O sentido e a intensidade da corrente dependem das espécies iônicas criadas ou consumidas na reação bioquímica, entre o analito e o sistema de reconhecimento [10]. Alguns biossensores amperométricos fazem uso de um terceiro eletrodo, que funciona como eletrodo de referência mantendo um potencial elétrico fixo [20].

Potenciométricos: Biossensores potenciométricos monitoram a diferença de potencial elétrico entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência. Esses biossensores detectam o acúmulo de cargas, no eletrodo de trabalho, provenientes das interações biológicas de interesse [10]. Existem três tipos básicos de biossensores potenciométricos: eletrodo de íon seletivo, eletrodo revestido e transistor de efeito de campo sensível a íon (ISFET – do acrônimo em inglês de *ion-sensitive field-effect transistor*) [21].

Os biossensores de eletrodo de íon seletivo são capazes de detectar uma determinada espécie iônica. Esses dispositivos são constituídos de dois eletrodos, um de trabalho e outro de referência (no qual o potencial é mantido constante) ambos mantidos no interior de uma solução. A diferença de potencial entre esses eletrodos está relacionada com a concentração de íons específicos dissolvidos na solução [21].

Os biossensores de eletrodo revestido são constituídos por um condutor revestido com uma membrana polimérica seletora de íons específicos presentes em uma solução. No que diz respeito à sensibilidade de detecção, esses biossensores são similares aos de íon seletivo, mas como não necessitam de um eletrodo de referência, a sua miniaturização é facilitada [21].

Um biossensor configurado como um ISFET é composto por um material semicondutor, coberto por uma membrana sensível a íons e um eletrodo de referência que são inseridos em uma solução. O funcionamento desse dispositivo baseia-se no fato de que a resistência do semicondutor varia com o campo elétrico produzido por cargas elétricas sobre a membrana sensível a íons [22]. Como esse tipo de biossensores utiliza os processos de fabricação de chips microeletrônico, uma de suas grandes vantagens é que é possível preparar sistemas com multi-sensores para a detecção, simultânea, de diferentes íons, enquanto o seu tamanho reduzido permite a determinação *in vitro* de analito [6,21,23].

O princípio básico para detecção de anticorpos por um ISFET é que o processo de ligação anticorpo/antígeno pode afetar a distribuição de carga elétrica sobre o dispositivo. Estudos apontam a utilização de ISFETs na detecção de anticorpos/antígenos como imunoglobulina E [133], IgG1 [11], citocinas [58] e tropopina I [66].

1.3 Propriedades Eletrônicas do Grafeno

Nesta seção, apresentaremos as razões que apontam o grafeno como um bom transdutor para biossensores. Apresentaremos, também, alguns estudos que indicam que o grafeno apresenta uma boa sensibilidade para detecção de moléculas. Discutiremos, ainda, a aplicabilidade do grafeno como o transdutor de um ISFET.

O Grafeno e sua Alta Mobilidade Eletrônica

O carbono possui seis elétrons: dois ocupam um estado 1s e quatro estão distribuídos nos orbitais 2s, 2p_x, 2p_y e 2p_z. Os elétrons no estado 1s influenciam pouco nas propriedades de materiais com base em carbono e, basicamente, atuam como uma blindagem entre o núcleo atômico e os elétrons de valência [24]. Na monocamada de grafeno, dos quatro elétrons de valência do átomo de carbono, três formam ligações no plano, chamadas de *ligações sigma* (σ), enquanto o quarto elétron ocupa o *orbital pi* (π) e é capaz de se ligar a outro orbital π , formando uma ligação denominada *ligação pi*. As três ligações sigma formam a estrutura planar e hexagonal do grafeno, como esquematizado na figura 1.4. Os orbitais π são responsáveis pelo fenômeno de transporte elétrico [24,25].

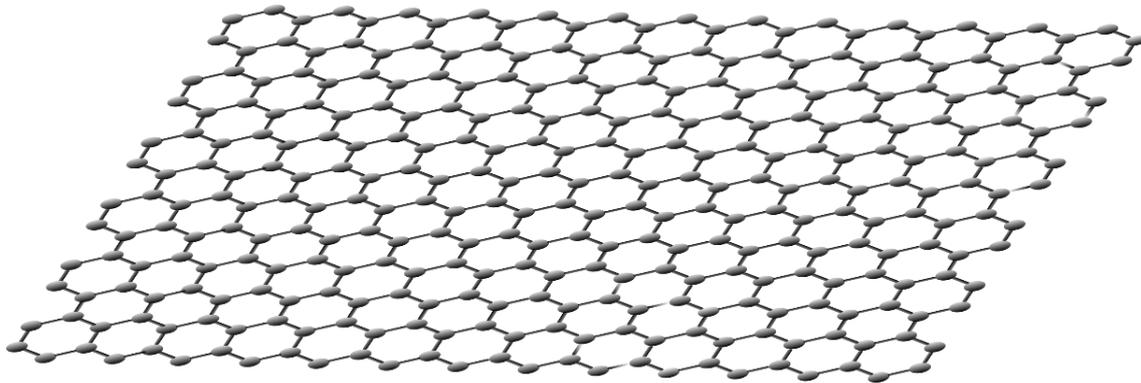


Figura 1.4: Estrutura hexagonal das ligações dos átomos de carbonos que constituem o grafeno.

Os elétrons nos orbitais π interagem fracamente com os elétrons dos orbitais no plano; essa fraca interação, possibilita a alta mobilidade eletrônica no grafeno [25], que para grafeno depositado sobre um substrato pode exceder $15.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [26]. Para grafeno suspenso foram obtidos valores de mobilidade eletrônica da ordem de $200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [25], que são significativamente maiores que os obtidos tipicamente com dispositivos de silício ($\sim 1.400 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [27].

Gap Nulo

No grafeno monocamada a relação entre o momento e a energia é linear e as bandas de condução e valência se tocam, em um ponto chamado de *ponto de Dirac*, sem um *gap* de energia, como esquematizado na figura 1.5a. Por isso, o grafeno é chamado de semicondutor de *gap* nulo [28].

O grafeno apresenta um comportamento ambipolar, que possibilita alterar continuamente, entre elétrons e buracos, o tipo de portadores de cargas responsáveis pelo transporte elétrico no grafeno. Essa alteração do tipo de portadores de carga pode ser realizada induzindo no grafeno cargas positivas ou negativas. Na figura 1.5b, esquematizamos a estrutura de bandas do grafeno, com o nível de Fermi (E_f) na banda de

valência; nesse caso, os buracos são os responsáveis pelo transporte elétrico. Na figura 1.5c, o nível de Fermi se encontra na banda de condução, assim, os elétrons são os responsáveis pelo transporte no grafeno [27].

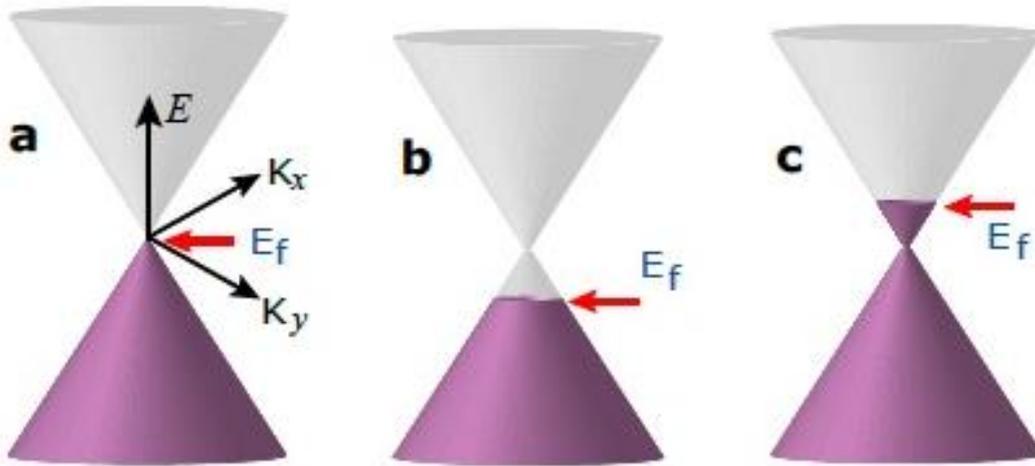


Figura 1.5: (a) Dispersão linear entre momento e energia, com as bandas de valência e condução se tocando em um único ponto. (b) Nível de Fermi (E_f) na banda de valência, caracterizando um transporte por buracos. (c) Nível de Fermi na banda de condução, caracterizando um transporte por elétrons. Figura extraída da referência [27].

Estrutura Bidimensional

Outra importante propriedade do grafeno é sua estrutura bidimensional. Como o grafeno é um material de espessura atômica, ele apresenta uma grande razão entre área superficial e volume, que possibilita a criação de sensores com alta sensibilidade. Isso se deve ao fato de que em materiais mais espessos a adsorção de moléculas pouco, ou nada, influenciam nas propriedades elétricas desse material. Já no grafeno, a adsorção de uma única molécula na sua superfície afeta as suas propriedades de transporte [25].

Grafeno como Transdutor para Biossensores

Desde a sua descoberta em 2004, o grafeno desponta como um bom transdutor para sensores químicos e biológicos [26]. Um dos primeiros sensores químicos com base em grafeno demonstrou ser capaz de detectar apenas uma molécula de dióxido de nitrogênio [29]. Esse resultado destacou o poder de sensibilidade do grafeno, vislumbrando, assim, o seu uso no desenvolvimento de sensores químicos e biológicos altamente sensíveis.

Na última década uma gama de biossensores com base em grafeno foi desenvolvida. Biossensores ópticos capazes de detectar DNA [30–32], aptâmeros [33,34], anticorpos [35]. A técnica de transferência ressonante de energia por fluorescência é a mais utilizada em biossensores ópticos com base em grafeno [36]. Na literatura são relatados biossensores eletroquímicos capazes de detectar colesterol [37], glicose [38–40], aptâmeros [41,42], DNA [43,44], proteína animal [45], bactérias [46]. Por exemplo, um biossensor foi sensível ao ponto de detectar uma única bactéria [47] e outro foi capaz de detectar atividade metabólica das bactérias [48].

Outro tipo de biossensor com base em grafeno bastante desenvolvido, nos últimos anos, são os imunossensores. A seguir descrevemos alguns imunossensores presentes na literatura: o transistor de efeito de campo desenvolvido por de Yantao Chen, *et al.* [49], foi capaz de detectar o antígeno da Ebola, com o limite de detecção da ordem de 1 ng/mL. Também com um transistor de efeito de campo, Lin Zhou *et al.* [50], detectaram o antígeno carcinoembrionário, um importante marcador de células cancerígenas, em concentrações abaixo de 100 pg/mL. Utilizando ISFET, um grupo norte americano conseguiu detectar antígenos do Zika vírus, em concentrações de até 0.45 nM [51]. Outro interessante imunossensor presente na literatura é o desenvolvido por Yaoguang Wang *et al.* [52], que é capaz de detectar a alfafetoproteína (AFP), uma proteína que serve como um indicador da presença de tumores, usando um imunossensor amperométrico e obtiveram como limite de detecção a concentração da ordem de 2,7 fg/mL de AFP. Deepshikha Shahdeo *et al.*, desenvolveram um imunossensor capaz de detectar o antígeno Spike S1 do SARS-CoV-2 em concentrações de 1 fM [53].

1.4 Imunossensor com base em Grafeno

Nesta seção, apresentamos a estrutura de um dispositivo que possibilita o controle das propriedades eletrônicas do grafeno e, em seguida, a base teórica de um imunossensor estruturado como um transistor de efeito de campo sensível a íon com base em grafeno.

Controle da Condutividade do Grafeno

Em geral, dispositivos de grafeno são feitos a partir da deposição de flocos de grafeno sobre um substrato de dióxido de silício (SiO₂) sobre silício (Si) altamente dopado, o SiO₂ sobre o Si tem espessura de 300 nm. Esse tipo de dispositivo é chamado de transistor de efeito de campo e está esquematizado na figura 1.6. Enquanto uma corrente I passa pelo grafeno, a diferença de potencial, V , entre dois terminais é medida.

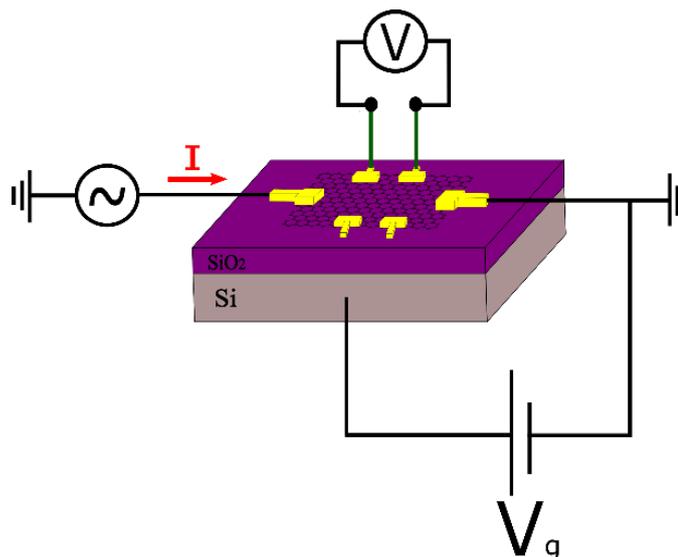


Figura 1.6: Disposição dos elementos em um dispositivo básico com base em grafeno. A tensão V entre dois terminais é medida enquanto uma corrente I passa pelo grafeno. A aplicação da tensão de porta V_g permite o controle de portadores de carga no grafeno.

A aplicação de uma tensão de porta (*gate*), V_g , entre o substrato de silício e o grafeno altera a concentração de portadores de cargas e, conseqüentemente, o nível de Fermi (E_F) do grafeno. A tensão V_g pode ser descrita como:

$$V_g = V_Q + V_D, \quad (1.1)$$

em que $V_Q = E_F / e$ é determinado pela capacitância quântica do grafeno, sendo e o módulo da carga eletrônica, e $V_D = n_g e / C_D$ é determinada pela capacitância geométrica por unidade de área $C_D = \epsilon_0 \epsilon_r / d$, em que ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo, ϵ_r é a constante dielétrica do SiO₂ e d é sua espessura. A energia de Fermi depende da densidade de portadores no grafeno e é dada por [54]:

$$E_F = \hbar |v_F| \sqrt{n_g \pi}. \quad (1.2)$$

em que \hbar é a constante de Planck dividida por 2π , v_F ($\sim 1 \times 10^6 \text{ ms}^{-1}$) é a velocidade de Fermi e n_g é densidade de portadores de carga induzida no grafeno pela aplicação da tensão de porta.

Substituindo V_D e a equação (1.2) na equação (1.1) obtêm-se:

$$V_g = \frac{\hbar |v_F| \sqrt{n_g \pi}}{e} + \frac{n_g e}{C_D}. \quad (1.3)$$

Em geral o grafeno apresenta alta densidade de portadores [ref] de cargas e para experimentos feitos à temperatura ambiente é razoável utilizar o modelo de Drude [55], o qual relaciona a dependência da condutividade σ com a densidade de portadores de carga n por:

$$\sigma = |ne\mu|, \quad (1.4)$$

em que μ é a mobilidade eletrônica dos portadores de carga.

A densidade de portadores de carga no dispositivo de grafeno é dada por [56]:

$$n = \sqrt{n_0^2 + n_g^2}, \quad (1.5)$$

em que n_0 é a densidade de portadores presentes no grafeno em equilíbrio, ou seja, para $V_g = 0$. Essa densidade de cargas residual é atribuída a impurezas carregadas localizadas entre o material dielétrico e o grafeno [57,58].

Na atuação de uma tensão na porta inferior, em contato com o substrato de silício, como esquematizado na figura 1.6, o primeiro termo da equação 1.3 pode ser desprezado, pois a capacitância geométrica, C_D , do dióxido de silício de 300 nm é, aproximadamente, 12 nFcm^{-2} , que para uma densidade de portadores da ordem de 10^{13} cm^{-2} , implicaria no segundo termo ser da ordem de 10^3 vezes maior que o primeiro termo. Dessa forma, a relação entre a condutividade e a tensão de porta é dada por:

$$\sigma = \left| e\mu \sqrt{n_0^2 + \left(\frac{C_D V_g}{e} \right)^2} \right|. \quad (1.6)$$

A figura 1.7 apresenta um típico resultado de medição da condutividade em função da tensão V_g entre o substrato de silício e o grafeno [59]. Nesse resultado, o mínimo na condutividade ocorre para uma tensão positiva, o que indica que nesse dispositivo há uma dopagem tipo p do grafeno. Assumindo que o mínimo ocorre em $V_g = V_g^*$, então para $V_g < V_g^*$ a condução através do grafeno é devida a buracos, enquanto para $V_g > V_g^*$ ela é devida a elétrons. O ponto $V_g = V_g^*$ é denominado ponto de neutralidade de carga. Portanto, a aplicação de uma tensão de porta possibilita mover o nível de Fermi entre as bandas de valência e de condução, passando pelo ponto de Dirac. Isso evidencia o caráter ambipolar do grafeno.

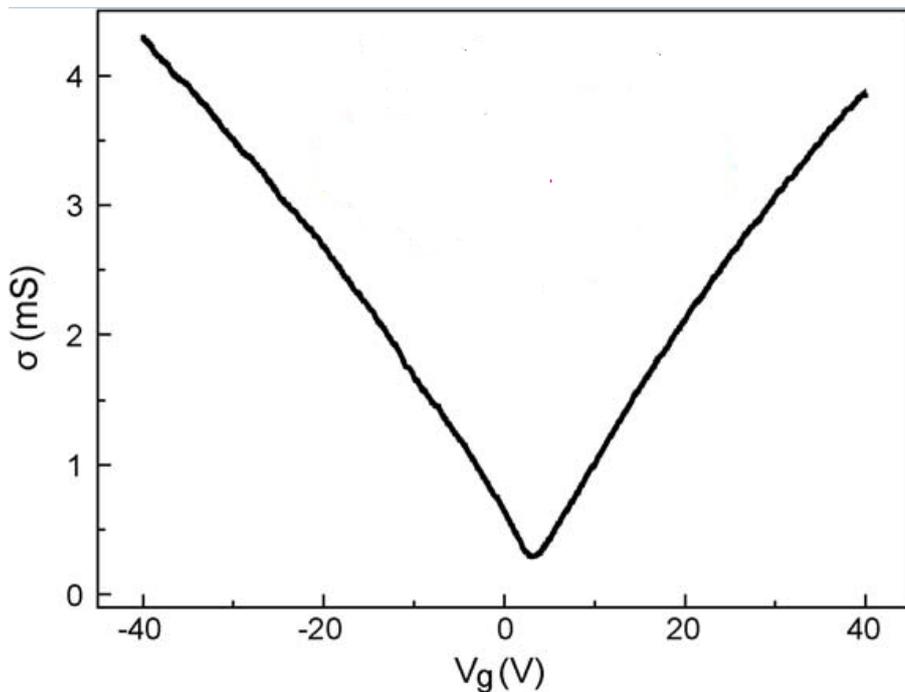


Figura 1.7: Medida da condutividade *versus* tensão de porta obtida para um dispositivo de grafeno. Figura adaptada da ref. [59].

Dupla Camada Elétrica

Quando uma superfície eletricamente carregada é imersa em um eletrólito, uma específica região iônica é estabelecida na interface superfície-eletrólito. No equilíbrio, essa região pode ser vista como um capacitor e é chamada de dupla camada elétrica (DCE) [60].

Na literatura, existem vários modelos para a DCE, mas não existe um modelo que se adeque a todas as situações experimentais, pois a estrutura da DCE depende de parâmetros, tais como, o tipo de superfície (metal, semicondutor, eletrodo poroso, etc.), do tipo e da concentração do eletrólito, da adsorção específica de íons pela superfície, da temperatura [60,61].

No nosso estudo, utilizaremos um modelo clássico simples, mas que leva em consideração a adsorção de moléculas na superfície, efeitos de temperatura e a concentrações iônica do eletrólito, conhecido como modelo de Gouy-Chapman-Stern [62], em que duas camadas de íons formam a DCE. A primeira, conhecida como “camada de Helmholtz” é constituída por íons adsorvidos na superfície do semicondutor e a sua espessura é de dimensão atômica, na figura 1.8 apresentamos uma representação para a configuração da DCE, em que esta camada é composta por ânions.

A segunda camada, chamada de “camada difusa”, contém ânions e cátions e essa camada se estende desde a camada de Helmholtz até uma distância λ_D , a partir de onde o eletrólito tem carga líquida igual a zero, conhecida como comprimento de Debye, dada por [63]:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{e^2 \sum_i z_i^2 c_i}}, \tag{1.7}$$

em que ϵ_r é constante dielétrica do solvente, ϵ_0 é a permissividade elétrica do vácuo, k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura, c_i é a concentração molar da espécie iônica i e z_i a sua valência. Note que o comprimento de Debye depende apenas de propriedades do eletrólito [62]. Após a camada difusa, o eletrólito é neutro.

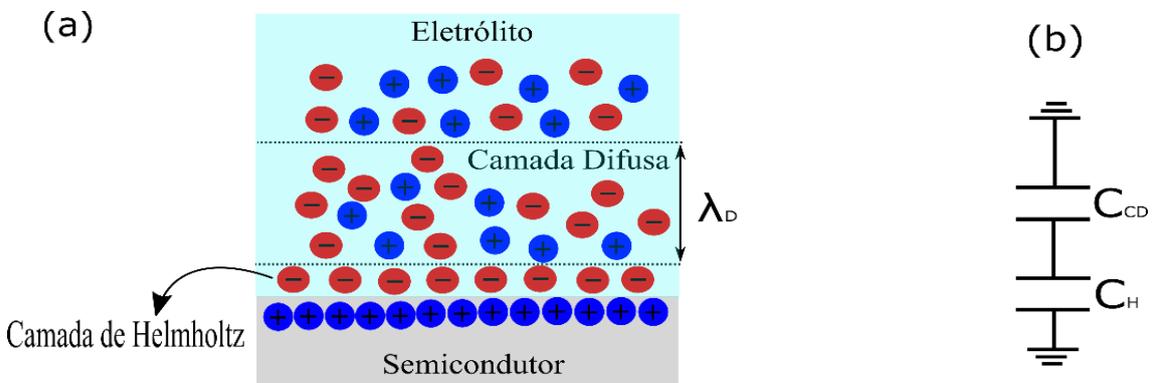


Figura 1.8: (a) Esquema para a dupla camada elétrica. (b) Circuito equivalente para a DCE.

Juntas, a camada de Helmholtz e a camada difusa, possuem uma densidade de carga σ_e não nula; essa densidade de carga induz na superfície uma densidade de cargas σ_s , de mesmo módulo, mas com sinal oposto, de modo que a carga induzida na superfície é totalmente contrabalaneada pela carga total na DCE.

A DCE pode ser vista como dois capacitores ligados em série, como esquematizado na figura 1.8b. O primeiro, com capacitância C_H referente à camada de Helmholtz, cujo valor não depende do potencial da superfície. O segundo capacitor, com capacitância C_{CD} , associado à camada difusa e cujo valor depende da diferença de potencial entre a camada de Helmholtz e a região eletricamente neutra do eletrólito. Desta forma, a capacitância total, C_T , da DCE é dada por [64,65]:

$$\frac{1}{C_T} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{CD}}. \quad (1.8)$$

A capacitância por unidade de área C_H da camada de Helmholtz é dada por [64,65]:

$$C_H = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{b} \quad (1.9)$$

em que b é a distância da superfície à camada de Helmholtz, superfície tem dimensão da ordem do diâmetro dos íons adsorvidos na superfície.

A capacitância por unidade de área da camada difusa depende de propriedades do eletrólito e do potencial da superfície e é dada por [64–66]:

$$C_{CD} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\lambda_D} \cosh\left(\frac{e\phi^0}{k_B T}\right), \quad (1.10)$$

em que ϕ^0 é o potencial na camada de Helmholtz.

Controle da Condutividade do Grafeno Via Tensão de Porta Superior

No transistor de efeito de campo apresentado anteriormente (figura 1.6), a condutividade elétrica do dispositivo pode ser alterada por meio de uma tensão de porta aplicada entre o grafeno e o substrato de silício. Essa condutividade também pode ser modificada com uma tensão aplicada entre o eletrólito, em contato com o grafeno, e o grafeno. A essa tensão dá-se o nome de tensão de porta superior.

Na figura 1.9, apresentamos um esquema de um dispositivo ISFET de grafeno com um eletrólito sobre ele. Nesse dispositivo, o grafeno está depositado sobre um substrato de silício altamente dopado, coberto com uma camada SiO₂, como descrito anteriormente. Sobre o grafeno é colocado um eletrólito que, no equilíbrio eletrostático, formará a DCE na interface grafeno-eletrólito. Um condutor inerte é imerso no eletrólito e ligado a uma fonte de tensão para gerar a tensão de porta superior, V_{tg} , aplicada na região eletricamente neutra do eletrólito.

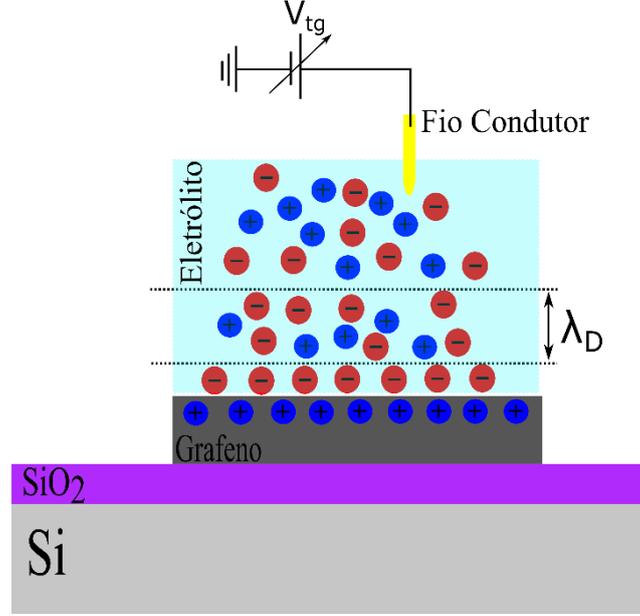


Figura 1.9: Esquema de um ISFET com base em grafeno.

Nessa configuração, a capacitância total, C_T , da dupla camada será a capacitância geométrica C_D da equação (1.3). Para soluções com constante dielétrica na ordem de dezenas e λ_D na ordem de nanômetros, a capacitância será da ordem de dezenas de μFcm^{-2} , que para uma densidade de portadores da ordem de 10^{13} cm^{-2} , nos termos da equação (1.3) serem da mesma ordem de grandeza e sendo, portanto, necessário levar em consideração o termo relacionado à capacitância quântica [54,67]. Desta forma, a equação (1.3) pode ser reescrita para a tensão de porta superior, V_{tg} , ou seja,

$$|V_{tg} - V_{tg}^*| = \frac{\hbar|v_F|\sqrt{n_{tg}\pi}}{e} + \frac{n_{tg}e}{C_D}, \quad (1.11)$$

em que n_{tg} é densidade de portadores de carga induzida no grafeno pela aplicação de V_{tg} e V_{tg}^* é a tensão de porta superior na situação de neutralidade de carga. Valores positivos (negativos) de $V_{tg} - V_{tg}^*$ aumentam a densidade de elétrons (buracos) no grafeno.

Substituindo a equação (1.5) na equação (1.4), obtemos a relação entre a condutividade σ e a densidade de portadores de carga induzidos, n_{tg} , pela aplicação de V_{tg} :

$$\sigma = \left| e\mu \sqrt{n_0^2 + n_{tg}^2} \right|. \quad (1.12)$$

Da equação (1.11), obtemos n_{tg} em função de V_{tg}

$$n_{tg} = AC_D^2 + \frac{C_D|V_{tg} - V_{tg}^*|}{e} - \sqrt{A^2 C_D^4 + \frac{2AC_D^3|V_{tg} - V_{tg}^*|}{e}} \quad (1.13)$$

em que

$$A = \frac{\pi}{2} \left(\frac{\hbar v_F}{e^2} \right)^2. \quad (1.14)$$

Substituindo a equação (1.13) na equação (1.12), obtemos a condutividade em função da tensão de porta superior:

$$\sigma = \left| e\mu \sqrt{n_0^2 + \left(AC_D^2 + \frac{C_D |V_{tg} - V_{tg}^*|}{e} - \sqrt{A^2 C_D^4 + \frac{2AC_D^3 |V_{tg} - V_{tg}^*|}{e}} \right)^2} \right|. \quad (1.15)$$

ISFET como um Imunossensor

Na seção anterior, discutimos como a mudança na densidade de cargas em um eletrólito sobre um ISFET altera a densidade de portadores de carga no grafeno. Além disso, sabemos que imunossensores tem como sistema de reconhecimento a interação anticorpo-antígeno e essas interações são não covalentes, de modo que a formação do complexo imune altera a distribuição de cargas do anticorpo [68,69] o que possibilita que os imunossensores sejam capazes de detectar a formação do complexo imune. No caso de um ISFET, o imunossensor detectará mudanças na densidade ou distribuição de cargas do transdutor.

Na figura 1.10a está esquematizado a estrutura de um ISFET que teve sua superfície modificada de modo a funcionar como um imunossensor capaz de detectar as proteínas alvo. Na seção 2.2 detalharemos um protocolo experimental que possibilite tal modificação. No esquema uma superfície semicondutora está funcionalizada com anticorpos, representados em verde, que são o sistema de reconhecimento do biossensor, capazes de interagir com a proteína alvo. Em geral, a parte ativa dos anticorpos, o fragmento de ligação do antígeno (Fab), estarão a uma distância da superfície do dispositivo que é maior que o comprimento de Debye λ_D , pois eles têm dimensões (10 nm a 12 nm) maiores que λ_D (~ 2.7 nm) [70,71]. Denominaremos a região onde estão os fragmentos de ligação do antígeno, de *camada alvo*.

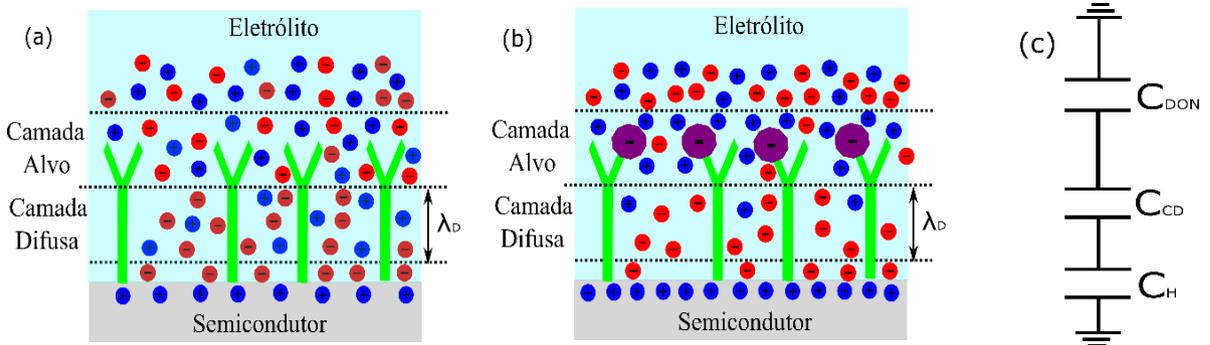


Figura 1.10: (a) Esquema para a estrutura de um imunossensor; os anticorpos (estruturas em verde) se situam em uma região (camada alvo) além do comprimento de Debye, em um instante antes da ligação proteína-anticorpo. (b) Após a ligação das proteínas eletricamente carregadas (aqui negativamente) com anticorpos, redistribuem as cargas nas camadas difusa e alvo de modo a induzir mais cargas (aqui positivas) no semicondutor. (c) Circuito equivalente para o imunossensor.

Como a DCE blindada eletrostaticamente o semicondutor, isso sugere que o semicondutor só será capaz de detectar alterações no eletrólito que ocorram dentro da camada difusa [71,72]. Entretanto, alguns estudos [63,66,73–75] têm demonstrado que as respostas dos imunossensores são capacitivas e independem da distância ao semicondutor onde ocorre a interação anticorpo-proteína.

Equilíbrio de Donnan

Uma explicação para a detecção da interação entre o anticorpo e proteína alvo em regiões além do comprimento de Debye baseia-se no efeito Donnan [66,76–81]. De acordo com esse modelo, as proteínas eletricamente carregadas, ao se ligarem com os anticorpos, formam uma membrana permeável a íons que tendem a equilibrar a carga elétrica intrínseca dessas proteínas [63,82,83].

Como representado na figura 1.10a, os anticorpos estão fixos com os fragmentos de ligação do antígeno localizados na camada alvo, estando essa camada eletricamente neutra. Quando o dispositivo é submetido à presença das proteínas alvo, eletricamente carregadas, ocorrerá a interação anticorpo-proteína, o que levará a camada alvo ter, momentaneamente, uma carga elétrica não nula. Essa carga elétrica líquida levará a um fluxo de íons da camada difusa e da região eletricamente neutra do eletrólito para a camada alvo. Como resultado desse fluxo, a região difusa sofre uma redistribuição de suas cargas elétricas [81], como indicado na figura 1.10b. Essa redistribuição de cargas na camada difusa, afeta a carga total da DCE e, conseqüentemente, a quantidade total de cargas induzidas no semicondutor.

O valor da carga elétrica de um anticorpo, em uma solução, depende do valor do pH da solução e do ponto isoelétrico do anticorpo. O ponto isoelétrico, pI , é uma propriedade intrínseca das proteínas e determina o valor do pH para o qual a carga líquida da proteína é zero [84]. Em um ambiente com pH menor que seu pI , uma proteína apresentará uma carga líquida positiva e em um pH maior que pI a carga líquida da proteína será negativa [85].

Em suma, o mecanismo de transdução de um imunossensor pode ser atribuído a um mecanismo análogo ao efeito de Donnan, de forma a resultar em mais uma capacitância em série com as capacitâncias da DCE [66,76,86]. Desta forma, um ISFET funcionando como imunossensor é um dispositivo basicamente capacitivo, o qual pode ser modelado por um circuito com três capacitores em série. Na figura 1.10c, é apresentado o circuito equivalente do imunossensor. A capacitância geométrica, C_D , do ISFET, é dada por três capacitâncias em série, referentes à camada de Helmholtz, C_H , à camada difusa, C_{CD} e ao equilíbrio de Donnan, C_{DON} .

Grafeno como um Transdutor de um Imunossensor

A equação (1.15) demonstra a relação entre a condutividade do grafeno, σ , e a tensão de porta superior, V_{tg} , aplicada através do eletrólito. Nota-se que essa relação

depende da capacitância geométrica, C_D , do eletrólito. Como a capacitância geométrica de um ISFET é dada pela capacitância equivalente de três capacitores em série, desta forma, com o grafeno servindo como transdutor de um imunossensor, a condutividade será dada pela equação (1.15), em que a capacitância geométrica, C_D , é dada por:

$$C_D = \left(\frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_{CD}} + \frac{1}{C_{DON}} \right)^{-1}. \quad (1.16)$$

Portanto, com a condutividade do grafeno dada pela equação (1.15), pode-se propor dois mecanismos para a aplicação de um imunossensor tendo o grafeno como transdutor:

- Fixando o valor da tensão de porta superior, V_{ig} , ao alterar a concentração de proteína em interação com o imunossensor, conseqüentemente, irá alterar a capacitância geométrica do dispositivo – via alteração da capacitância de Donnan. A variação na capacitância do sistema implicará na variação da carga induzida no grafeno e, conseqüentemente, na condutividade do dispositivo.
- Para uma determinada concentração de proteína em interação com o imunossensor, a capacitância geométrica do ISFET será constante. Desta forma, a variação da tensão de porta superior, V_{ig} , possibilitará o controle da condutividade do grafeno. Espera-se que a variação da concentração de proteínas implique na variação do ponto de neutralidade de carga, V_{ig}^* , do grafeno. Uma vez que, para um determinado valor de V_{ig} , a variação na capacitância do sistema implicará na variação da carga induzida no grafeno [87].

No capítulo 4, apresentaremos resultados experimentais de um imunossensor com base em grafeno onde será analisado o funcionamento do biossensor via as duas metodologias descritas acima.

2 Fabricação de Imunossensores

Nesse capítulo, apresentaremos as técnicas utilizadas na obtenção de grafenos e fabricação de dispositivos com base nesses grafenos. Apresentaremos, aqui, o protocolo de funcionalização utilizado. E discutiremos, também, o método de obtenção e as propriedades dos materiais biológicos utilizados neste estudo.

2.1 Fabricação de Dispositivos

Os dispositivos desse trabalho foram fabricados a partir de amostra de grafeno obtidos pela técnica de clivagem micromecânica e utilizando a técnica de litografia ótica foram feitos transistores de efeito de campo com base nessas amostras de grafeno. Nessa subseção descrevemos as etapas destas duas técnicas.

Obtenção do Grafeno

O grafeno utilizado na fabricação do biossensor foi obtido através da técnica de clivagem micromecânica do grafite, técnica também conhecida como micro-esfoliação, que está representado na figura 2.1. Nessa técnica, uma fita adesiva é utilizada para clivar uma amostra de grafite, dividindo-o em duas partes (figura 2.1a). Esse processo é repetido várias vezes para se obter amostras de grafite cada vez menos espessos, com poucas camadas sobre a fita. O resultado é uma fita contendo grafites de diferentes camadas. Em seguida, pressionamos, levemente, a fita sobre o substrato (figura 2.1b) e após alguns minutos a removemos lentamente (figura 2.1c). Após esse processo, eventualmente, tem-se algumas amostras de grafeno depositados sobre o substrato e que devem ser localizados posteriormente, por meio de microscopia óptica (figura 2.1d).

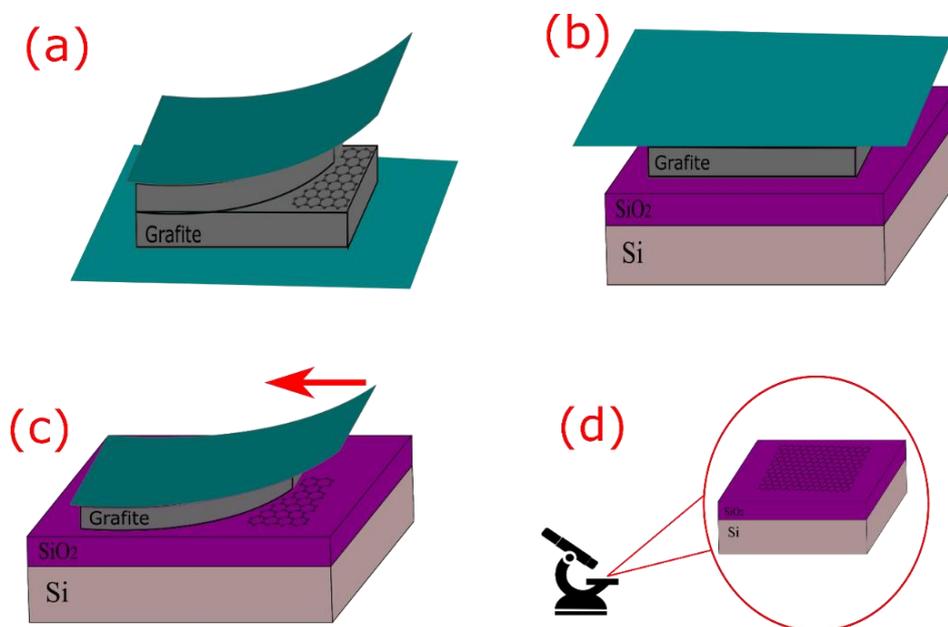


Figura 2.1: Processos de esfoliação do grafite. **a)** um floco de grafite é esfoliado com a ajuda de uma fita adesiva. **b)** fita contendo grafites é fixada sobre o substrato. **c)** última etapa de clivagem, dessa vez sobre o substrato. **d)** flocos de grafites com poucas camadas, eventualmente monocamadas são identificadas através de microscopia óptica.

O substrato utilizado é de silício altamente dopado coberto com uma camada de 300 nm de dióxido de silício (SiO_2/Si). O SiO_2/Si com essa espessura permite que as amostras de grafeno possam ser visualizados com um microscópio óptico [88]. Antes de o grafeno ser transferido para o substrato, este deve passar por um processo de limpeza com acetona, para remover materiais orgânicos (gorduras etc.) e, em seguida, com álcool isopropílico, para remover a acetona. Então, o substrato é secado com nitrogênio gasoso e a última etapa de limpeza é feita em um equipamento de RIE (*reactive-ion etching*), em que o substrato é exposto a um plasma de oxigênio de baixa pressão durante dez minutos.

A identificação do grafeno foi feita por meio de microscopia óptica sob iluminação com filtro de cor laranja, que melhora o contraste ótico entre o grafeno e o substrato. A análise desse contraste permite a determinação do número de monocamadas de grafeno no floco. Cada monocamada produz aumento de aproximadamente 5% no contraste ótico [89].

Na figura 2.2, é mostrado um floco que contém regiões de diferentes espessuras; na inserção dessa figura está mostrado como varia o contraste ótico ao longo da linha amarela, com a indicação do número de camadas em cada região do floco.

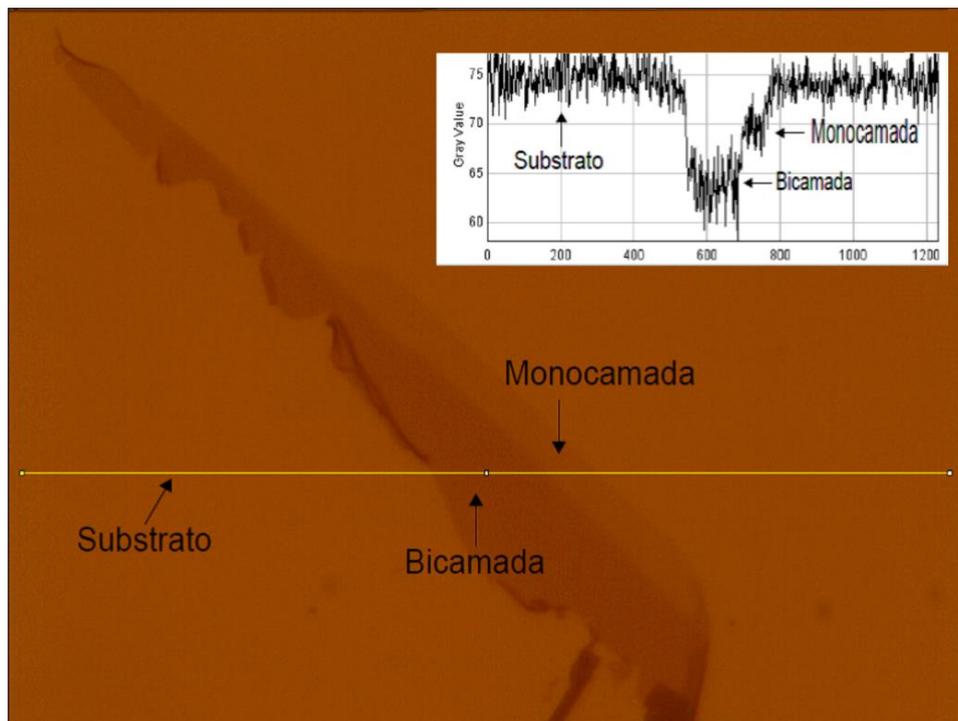


Figura 2.2: Imagem de microscopia óptica de grafenos mono e bicamadas. Na inserção, temos a análise do contraste ótico ao longo da linha amarela.

Litografia Óptica

Após a identificação de um grafeno, passamos à fabricação do dispositivo para funcionar como imunossensor. Para isso utilizamos a técnica de litografia óptica, representada na figura 2.3.

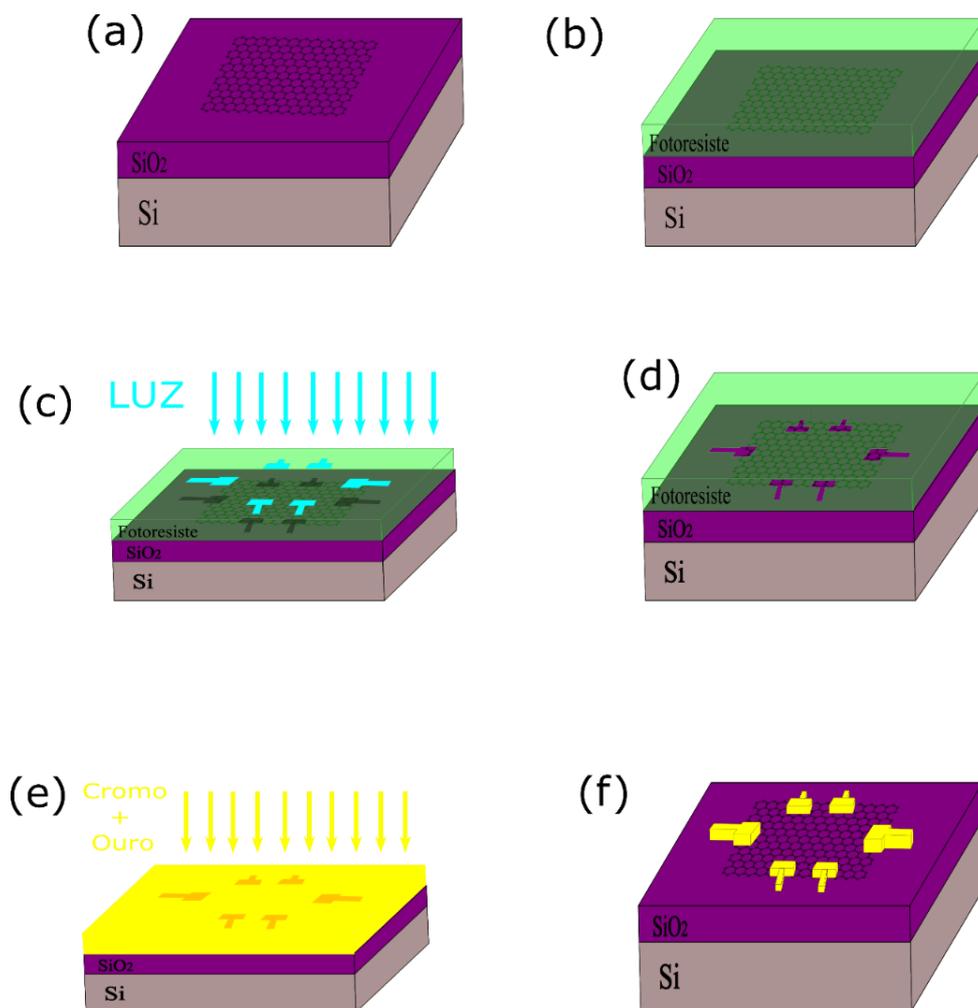


Figura 2.3: Processos de fabricação de um dispositivo. **a)** floco de grafeno sobre um substrato de SiO₂/Si. **b)** dispositivo coberto com fotoresiste. **c)** padrão dos contatos a partir da exposição à luz de determinadas regiões. **d)** após a revelação, regiões com e sem fotoresiste. **e)** deposição de metais sobre o substrato. **f)** retirada do fotoresiste restante da etapa (d), restando apenas as trilhas dos contatos elétricos.

Inicialmente, a superfície do substrato com o grafeno é coberta com um material polimérico, chamado fotoresiste (figura 2.3b). O fotoresiste é um material sensível à luz ultravioleta, ou seja, suas propriedades químicas se alteram quando este é exposto à luz, tornando-se mais (fotoresiste positivo) ou menos (fotoresiste negativo) solúvel quando imerso na solução de um ‘revelador’. Utilizamos o fotoresiste positivo S1805, que é sensibilizado por luz de comprimento de onda entre 350 nm e 450 nm [90]. O fotoresiste é espalhado sobre o substrato utilizando um equipamento chamado *spinner*. Esse processo é feito em duas etapas: a primeira, com rotação de 1000 rpm por 15 segundos e aceleração de 1200 rpm/s, com o intuito de espalhar o fotoresiste sobre todo substrato, e a segunda, com rotação de 8000 rpm por 40 segundos e aceleração de 1200 rpm/s, para garantir a homogeneidade da espessura do filme que, nesse caso, é de 500 nm, de acordo com o fabricante [90]. Imediatamente após esse processo o substrato é colocado sobre uma chapa quente à 100 °C por 90 segundos, para secar o fotoresiste.

Para o processo de litografia óptica, utilizamos um equipamento de escrita a *laser* (*Microtech Laser Writer LW405*). Nesse equipamento, determinadas regiões da amostra são iluminadas por um feixe de *laser* com comprimento de onda de 405 nm. Essas regiões definem um padrão para os contatos elétricos que serão feitos sobre o grafeno (figura 2.3c). Em seguida, a região que foi exposta à luz é removida pelo revelador do S1805, que é o MF321 (figura 2.3d). A figura 2.4 apresenta um dispositivo após completada esta etapa de litografia. Em seguida, por meio de evaporação térmica em alto vácuo, depositamos uma liga metálica constituída de 3 nm de cromo e 70 nm de ouro, sobre todo o substrato, etapa que denominamos de metalização (figura 2.3e). Nesta liga metálica, a função do cromo é garantir a aderência do ouro sobre o grafeno e o ouro formará os contatos elétricos.

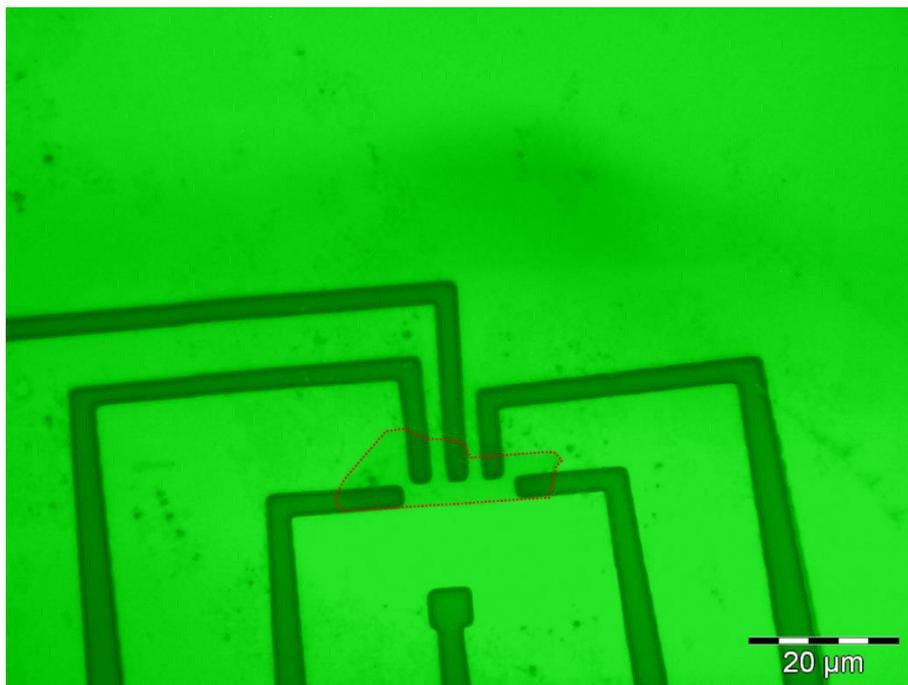


Figura 2.4: Dispositivo após a etapa de litografia. Nas regiões mais escuras o fotoresiste foi removido após ser exposto à luz. As regiões mais claras ainda contêm fotoresiste. O grafeno está destacado em vermelho.

Na próxima etapa, denominada *lift-off*, o fotoresiste restante é removido bem como o ouro depositado sobre ele, restando apenas os contatos elétricos para o grafeno (figura 2.3f). A figura 2.5 apresenta o dispositivo depois das etapas de metalização e de *lift-off*, nesta figura é possível ver um dos contatos elétricos situado distante do grafeno, este contato foi construído com o intuito de se aplicar uma tensão de porta lateral. Entretanto, neste estudo esse contato não foi utilizado e se aplicou apenas tensão de porta superior, que detalharemos mais adiante.

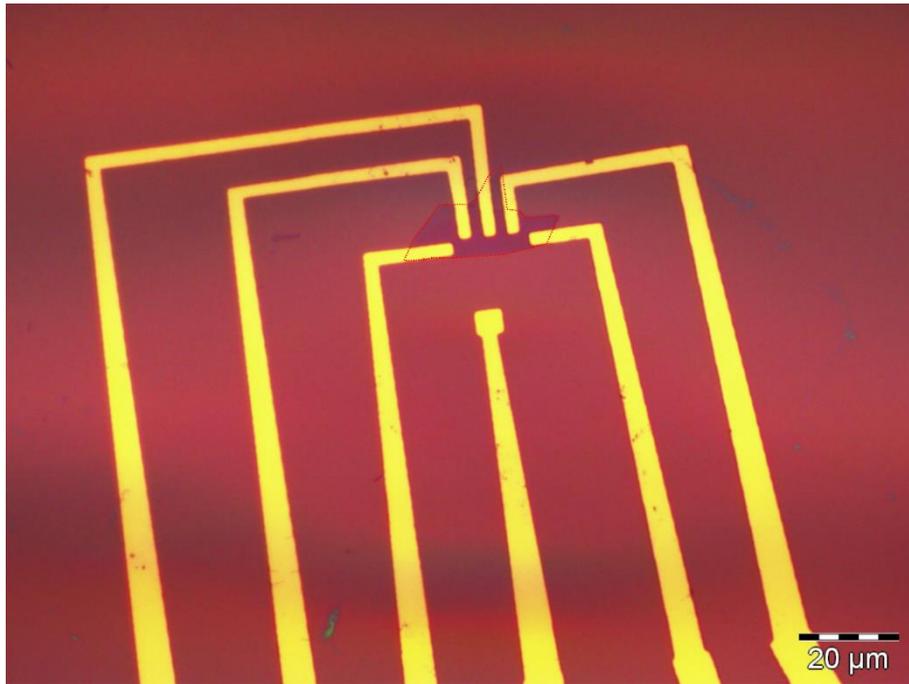


Figura 2.5: Dispositivo após as etapas de metalização e *lift-off*. As regiões amareladas são os contatos elétricos. A região em tom rosado é o SiO₂.

Por fim, os dispositivos foram submetidos a um processo de corrosão do grafeno, de tal maneira que, ao fim do processo, o grafeno apresente a geometria de ponte Hall. Esse processo tem como objetivo determinar por qual região se dá a condução elétrica no grafeno. A figura 2.6 apresenta o dispositivo de grafeno finalizado, após a etapa de corrosão.

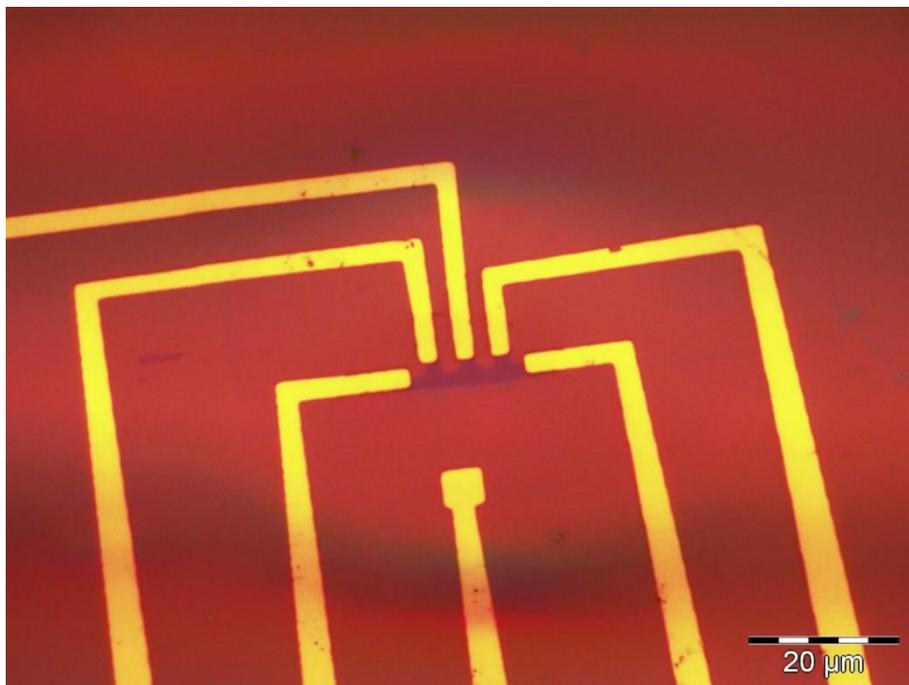


Figura 2.6: Dispositivo após a etapa de corrosão. O dispositivo apresenta a geometria de ponte Hall.

2.2 Funcionalização dos Dispositivos

A funcionalização é responsável por garantir que apenas o agente biológico de interesse seja detectado em uma amostra biológica. Essa etapa transformará o dispositivo eletrônico em um biossensor. Nesta subseção relatamos o protocolo de funcionalização dos dispositivos utilizados neste estudo.

Molécula ligante: Neste estudo, anticorpos serão utilizados como o sistema de reconhecimento dos biossensores. Entretanto, como demonstraremos um pouco adiante, os anticorpos não se ligam diretamente ao grafeno, sendo necessário que uma molécula faça essa intermediação. A molécula utilizada neste trabalho foi o éster succinimidílico do ácido 1-pireno butanoico (PBSE).

No processo de funcionalização [48], inicialmente os dispositivos foram incubados em uma solução de PBSE diluído em dimetilformamida (DMF), na concentração de 5 mM, por 2 horas, à temperatura ambiente, para possibilitar a imobilização posterior de anticorpos sobre o dispositivo. O PBSE possui um grupo *ester* que é altamente reativo com o núcleo de aminas primárias e secundárias existentes na superfície de muitas proteínas [91]. Por sua vez, o grupo pireno do PBSE fixa-se fortemente ao grafeno via interação π - π [92]. Na figura 2.7 está representada a molécula de PBSE.

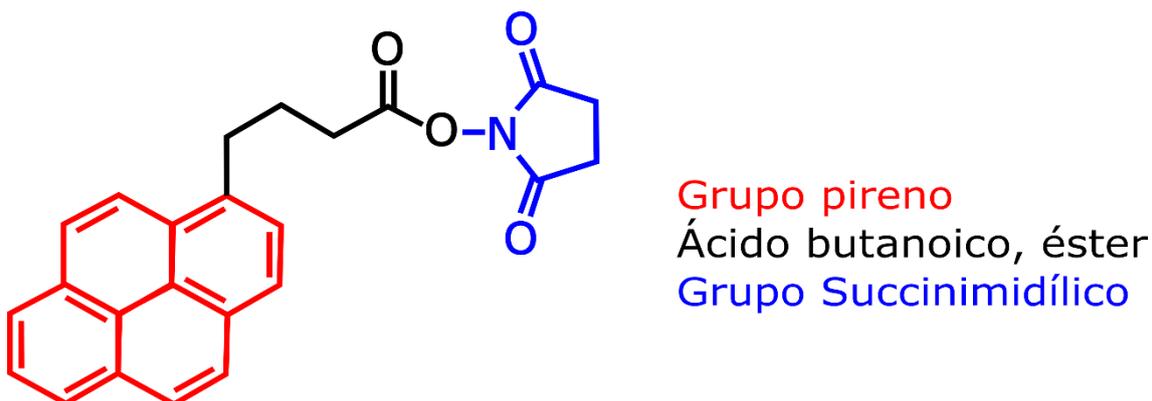


Figura 2.7: Fórmula estrutural do éster succinimidílico do ácido 1-pireno butanoico.

Realizando medidas de Raman, avaliamos se a interação com o PBSE alterou as propriedades estruturais do grafeno. Essas medidas foram realizadas excitando o grafeno com um laser de comprimento de onda de 532 nm. Na figura 2.8a, apresentamos o espectro Raman de uma monocamada de grafeno antes (curva preta) e depois (curva vermelha) da funcionalização, para facilitar a observação a curva preta foi deslocada verticalmente. No espectro Raman do grafeno feito antes da funcionalização observa-se a ausência da banda D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$), o que indica não haver desordem nas ligações de hibridizações sp^2 , e que o pico 2D ($\sim 2700\text{ cm}^{-1}$) pode ser ajustado com apenas uma curva lorentziana, o que caracteriza uma monocamada de grafeno [93]. Esses fatores indicam a boa qualidade da monocamada de grafeno obtido [94,95]. Após a funcionalização, observa-se que a interação grafeno/PBSE desloca o pico 2D para a direita ($\sim 15\text{ cm}^{-1}$); isso indica a fixação do PBSE sobre o grafeno e a consequente dopagem do tipo p pelo PBSE [87].

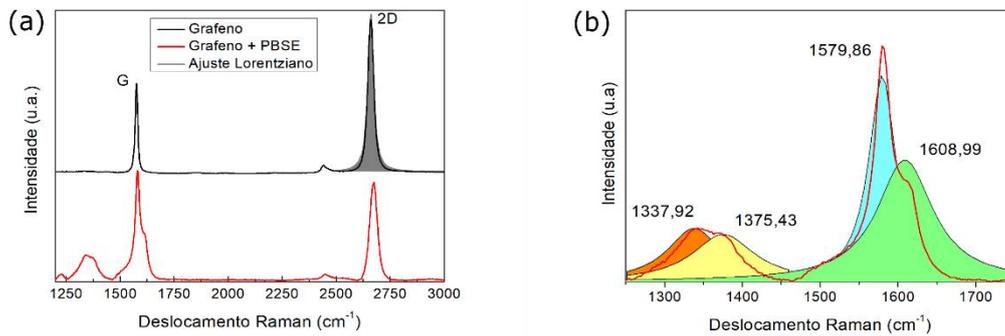


Figura 2.8: (a) Espectro Raman da monocamada de grafeno antes (curva preta) e depois (curva vermelha) da imobilização do PBSE, a curva preta foi deslocada verticalmente, de forma proposital. (b) Espectro Raman para frequências próximas à banda G. Destaque em cores para os picos: 1338 cm^{-1} (laranja), 1375 cm^{-1} (amarelo), 1580 cm^{-1} (azul) e 1609 cm^{-1} (verde).

No espectro Raman após a funcionalização, mostrado na figura 2.8b, é observado o surgimento de outros picos, próximos à banda G ($\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$), que estão relacionados ao PBSE. Nessa figura, o pico em 1338 cm^{-1} (laranja) indica a formação de uma ligação sp^3 [87]. O pico em 1375 cm^{-1} (amarelo) está relacionado à desordem introduzida devido à hibridização da molécula de PBSE com o grafeno [87]. O pico em 1609 cm^{-1} (verde) é atribuído ao grupo pireno do PBSE [87,96,97].

Uma vez que o pico em 1609 cm^{-1} é atribuído ao PBSE, fizemos um mapeamento da intensidade desse pico na região da amostra em torno do grafeno. Na figura 2.9a, apresentamos uma imagem de microscopia óptica do grafeno analisado e na figura 2.9b apresentamos o mapeamento Raman feito com um filtro para o número de onda de 1609 cm^{-1} . Nesse mapeamento, as regiões mais claras/escuras indicam uma maior/menor intensidade do sinal. Nessa figura, podemos observar que o PBSE se liga a amostras de grafeno mono e multicamadas (regiões claras), mas não ao substrato (região escura), como é desejável para um dispositivo imunossensor.

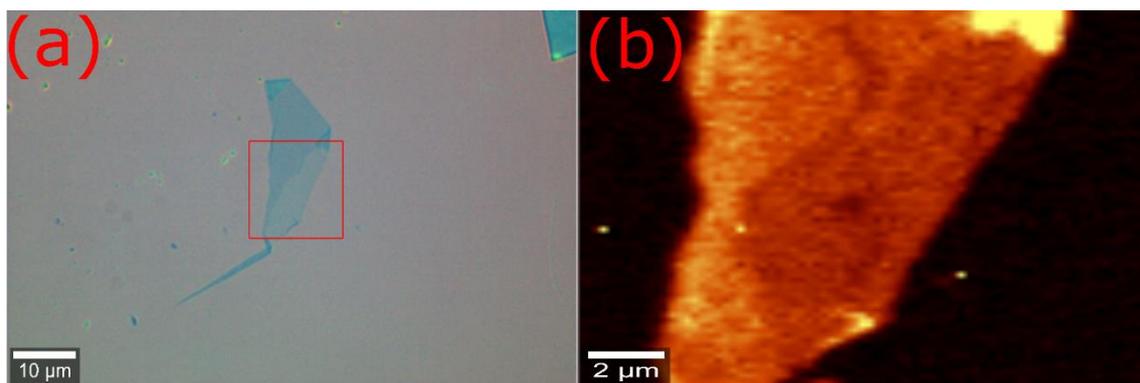


Figura 2.9: (a) Imagem de microscopia óptica da amostra na região do grafeno, após a funcionalização com PBSE. (b) Mapeamento Raman da amostra para a frequência de 1609 cm^{-1} .

Imobilização dos anticorpos: A conjugação entre os anticorpos e o PBSE foi feita incubando-se o dispositivo em uma solução de anticorpos em solução tampão fosfato-salina (PBS, do acrônimo em inglês phosphate buffered saline), com concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ e pH 7,4, por 20h a 4°C , em uma câmara úmida [98].

Realizamos, então, medidas de microscopia de fluorescência com o intuito de verificar a distribuição de anticorpos sobre o grafeno. Primeiro fizemos a marcação dos anticorpos utilizando o isotiocianato de fluoresceína (FITC, do acrônimo em inglês *fluorescein isothiocyanate*), que é uma molécula orgânica que se liga ao grupo amina dos anticorpos. A fluorescência do FITC apresenta comprimentos de onda de excitação e emissão de aproximadamente 495 nm e 520 nm, respectivamente [99]. A marcação dos anticorpos é feita com a mistura de três soluções: uma solução de anticorpos em um tampão de fosfato salino, com concentração de 2 mg/mL e pH = 7,4; uma solução tampão de borato-salino, com pH = 9; uma solução de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de FITC em dimetilsulfóxido. Essa mistura foi incubada, protegida da luz, à 37 °C, por 90 minutos; o excesso de FITC foi removido por filtração em gel [100].

Na figura 2.10, apresentamos os resultados das medidas de microscopia de fluorescência. Nas figuras 2.10a e 2.10b, são mostradas as imagens das amostras de grafeno antes da conjugação dos anticorpos, sendo que o PBSE foi imobilizado somente sobre o grafeno da figura 2.10b. Nas figuras 2.10c e 2.10d, estão as imagens do sinal da fluorescência do FITC. Observamos a ausência de fluorescência no grafeno sem PBSE (figura 2.10c), o que indica que sem o PBSE os anticorpos não são imobilizados sobre o grafeno. Na figura 2.10d, observamos o sinal de fluorescência do FITC sobre quase todo o grafeno, o que indica, em conjunto com o resultado apresentado na figura 2.9b, que não só o PBSE como os anticorpos apresentam uma razoável distribuição espacial sobre o grafeno.

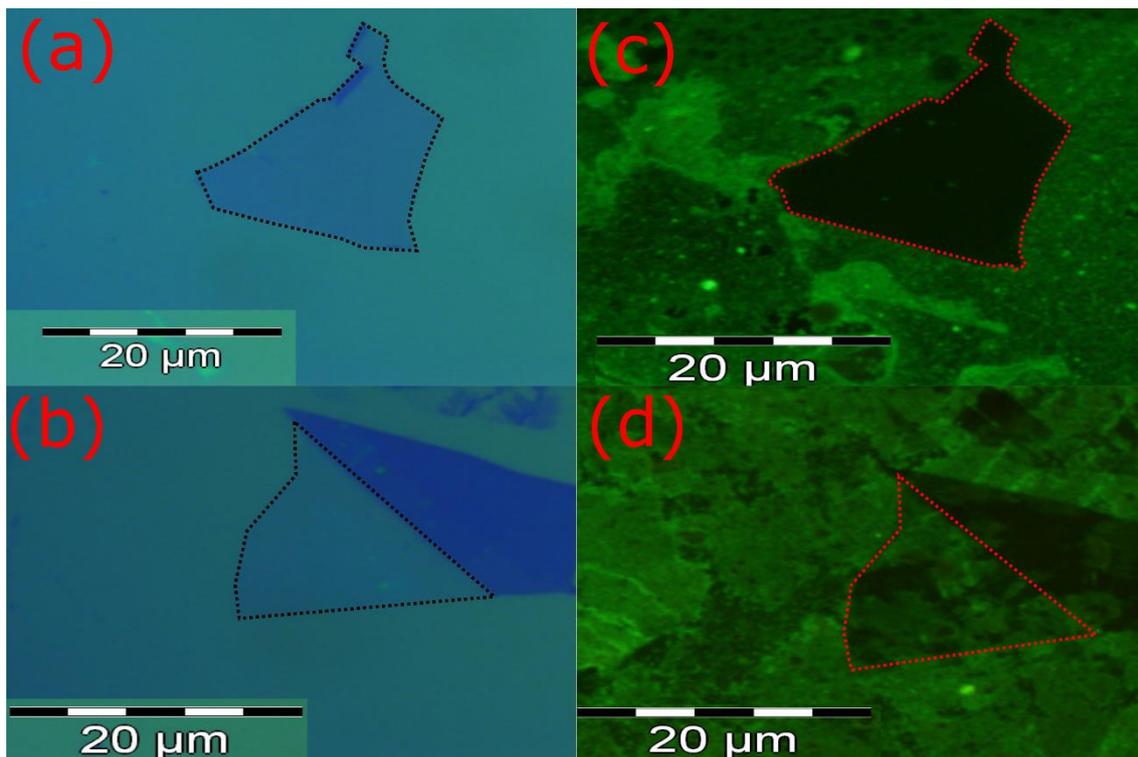


Figura 2.10: Imagens ópticas de grafenos, antes da incubação dos anticorpos marcados com FITC, (a) sem PBSE e (b) com PBSE sobre a superfície do grafeno. (a) Imagens microscópicas do grafeno, após a incubação com os anticorpos marcados com FITC, (c) sem PBSE e (d) com PBSE imobilizado sobre a superfície do grafeno.

Passivação: A passivação da superfície tem o objetivo de desativar os grupos éster do PBSE que não foram conjugados com anticorpos. Para isso, o dispositivo foi incubado em etalonamina (0,1 M, pH = 9,0), durante 1 hora, à temperatura ambiente. Depois, o

dispositivo foi incubado em solução de 0,1% de Tween 20, por 1h, à temperatura ambiente, para promover a passivação da superfície livre do grafeno [98].

Após esses processos o dispositivo de grafeno se torna um imunossensor em que apenas os anticorpos podem interagir com agentes externos específicos, garantindo dessa forma, um ambiente adequado para a detecção das proteínas de interesse. Na figura 2.11, representado o imunossensor desenvolvido, em que o grupo pireno do PBSE (em vermelho) se liga ao grafeno e aos anticorpos (em azul) se ligam ao grupo éster do PBSE, a etalonamina (em roxo) e o Tween 20 (em verde) passivam, respectivamente, os grupos éster do PBSE não conjugados com anticorpos e a superfície livre do grafeno.

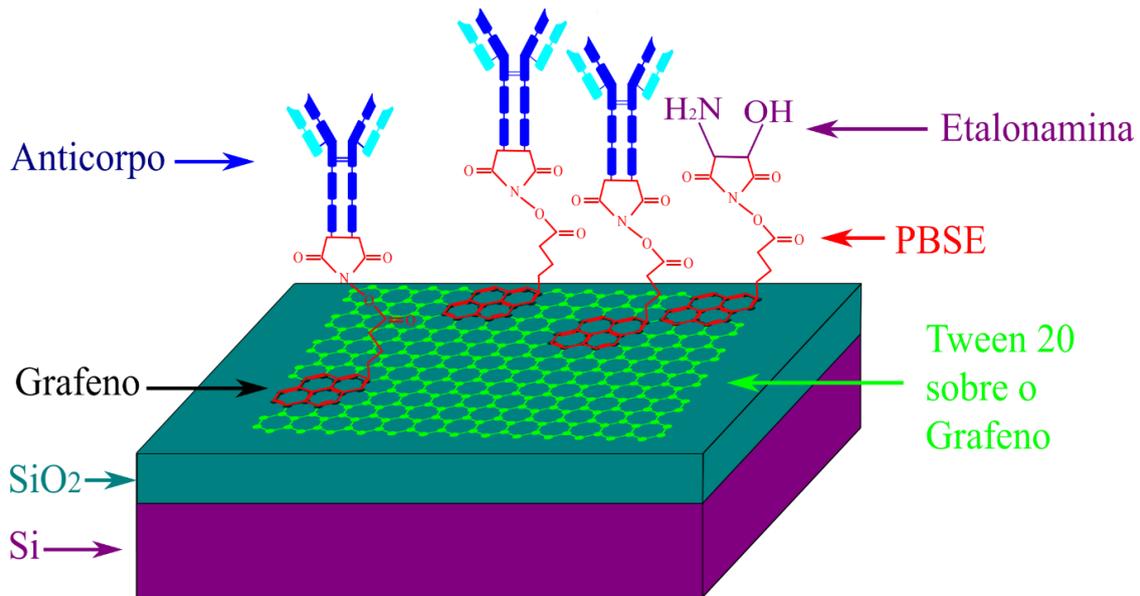


Figura 2.11: Esquemática do imunossensor com base em grafeno utilizado nesse estudo.

2.3 Proteínas-Alvo Utilizadas nesse Estudo

Os biossensores desse estudo buscam detectar as proteínas recombinante da Cianovirina-N (rCV-N) [101], Sictovirina (rSVN) [102] e Grifitisina (rGRFT) [103], que são lectinas capazes de inibir diferentes estirpes do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), vírus da imunodeficiência símia e outras doenças virais [104]. Estudos demonstraram que essas proteínas são candidatas para serem utilizadas como microbicidas do do HIV em macacos [105,106].

A Cianovirina-N é uma proteína composta por 101 aminoácidos e isolada a partir de culturas da cianobactéria *Nostoc ellipsosporum*, que tem demonstrado a capacidade de inibir a entrada em células de vários vírus como HIV [106,107], SARS-CoV-2 [108] e hepatite-C [109]. Cianovirina-N recombinantes (rCV-N) são produzidas em baixa escala por colônias de *Escherichia coli*. Um grupo de pesquisadores da EMBRAPA demonstraram a capacidade de produzir a rCV-N em larga escala em sementes de soja geneticamente modificadas. Isso representa um resultado notável, pois pode possibilitar o uso da rCV-N em escala farmacêutica [110].

A Sictovirina é uma proteína composta por 95 aminoácidos e isolada a partir de culturas da cianobactéria *Scytonema varium* [111]. A Grifitisina é obtida a partir da alga

vermelha *Griffithsia* e é composta por 121 aminoácidos [103,112]. Proteínas recombinantes de Sictovirina e Griftisina, também, são obtidas a partir da bactéria *Escherichia coli* [113].

As proteínas alvo deste trabalho (rCV-N, rSVN e rGRFT) são capazes de se ligar à glicoproteína GP120 do envelope do HIV. O GP120 desempenha o papel de se ligar aos linfócitos T CD4, que são as células responsáveis pela coordenação da defesa imunológica, e então possibilitam a penetração do HIV nessas células. Uma vez infectados, os linfócitos T CD4, ao se replicarem, produzem novos HIV [114]. Portanto, a ação da rCV-N, rSVN ou rGRFT é de inibir o ataque celular pelo HIV e a sua consequente multiplicação viral.

As proteínas rCV-N, rSVN e rGRFT e os anticorpos policlonais que utilizamos foram produzidos pela Molecular Targets Laboratory, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD, USA. A soja transgênica, contendo a rCV-N, foi produzida utilizando o método de biobalística [104,115]. Esse método consiste em bombardear células alvo com micropartículas de ouro ou tungstênio, cobertas com DNA a ser transferido ao núcleo da célula alvo. Se o DNA nas micropartículas atingir o núcleo das células, os transgenes podem ser incorporados pelos cromossomos hospedeiros e, então, serem incorporados pelo genoma da células alvo [116]. As proteínas solúveis total, utilizadas neste estudo, foram isoladas de sementes de sojas transgênicas, contendo rCV-N, e da soja não transgênica, que não expressam, a rCV-N [104].

Na literatura os valores indicados para os pontos isoelétricos da Cianovirina-N, Sictovirina e Griftisina são iguais, respectivamente, a 4,47 [117], 7,36 [118] e 5,39 [119]. Esses valores indicam que na solução de PBS usadas neste trabalho, com pH = 7,4, as três proteínas apresentam cargas negativas.

Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente. As soluções utilizadas nos experimentos foram:

- Solução tampão de fosfato salino (PBS, acrônimo do inglês. phosphate saline buffer), na concentração de 1M, com pH = 7,4.
- rCV-N: solução em PBS, em concentrações iguais a 10 pg/mL, 100 pg/mL, 400 pg/mL, 700 pg/mL, 1 ng/mL e 10 ng/mL.
- rSVN: solução em PBS, em concentrações iguais a, 10 pg/mL, 100 pg/mL, 400 pg/mL, 700 pg/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL.
- GRFT: solução em PBS, em concentrações iguais a 10 pg/mL, 100 pg/mL, 400 pg/mL, 700 pg/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL.
- Proteínas solúveis total, originárias de soja expressando rCV-N e de soja sem expressar rCV-N.
-

2.4 Soluções Biológicas Complexas Utilizadas neste Estudo

A partir das sementes de soja transgênicas desenvolvidas pelo grupo da EMBRAPA, foram obtidas soluções biológicas complexas contendo baixa concentração da rCV-N, entre uma gama de outras proteínas provenientes naturalmente da semente de soja [120]. Os Extratos Totais de Proteínas das sementes de soja foram obtidos por

processo mecânico que consistiu em macerar aproximadamente 1 grama de semente de soja, expressando rCV-N, em 5 mL de solução de PBS, por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, essa solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos e, então, o sobrenadante foi coletado. Essa solução coletada denominaremos *Extrato Total de Proteínas + rCV-N (ETP+)*. Uma solução controle foi obtida de forma análoga, mas a partir de sementes de soja que não expressam a rCV-N, aqui denominada *Extrato Total de Proteínas Controle (ETPC)*.

Além dos extratos totais de proteínas, foram produzidos extratos semi-purificados provenientes das sementes de soja expressando e não expressando a rCV-N. Esses extratos foram produzidos a partir de extratos totais de proteínas e foram semi-purificados pela técnica de cromatografia de filtração em gel [121], com a objetivo de remover a maior parte de outras proteínas. Essas soluções semi-purificadas foram denominadas *Extrato Semi-purificado de Proteínas + rCV-N (ESP+)* e *Extrato Semi-purificado de Proteínas Controle (ESPC)*, provenientes, respectivamente, dos extratos ETP+ e ETPC.

2.5 Lista de Dispositivos Utilizados neste Estudo

Na tabela 2.,1 listamos os dispositivos utilizados neste estudo. Todos os dispositivos foram desenvolvidos como apresentado na seção 2.1 e funcionalizados como descrito na seção 2.2, utilizando os anticorpos das proteínas alvo apresentadas na seção 2.3.

Nas colunas *Nome do Dispositivo*, é feita a nomenclatura dos dispositivos de acordo com a proteína-alvo presente na solução utilizada na medida em que o dispositivo foi utilizado. Sendo assim, os dispositivos P foram funcionalizados, mas durante as medições não foram colocados em contato com proteínas-alvo, apenas com a solução de PBS, os dispositivos C, S e G foram funcionalizados com anticorpos policlonais das proteínas rCV-N, rSVN e GRFT, respectivamente. Deste modo, os dispositivos C, S e G são imunossensores específicos, respectivamente, das proteínas rCV-N, rSVN e GRFT, como indicado nas colunas *Proteína-Alvo*.

Tabela 2.1: Lista de dispositivos utilizados nesse estudo.

Nome do Dispositivo	Proteína-Alvo	Nome do Dispositivo	Proteína-Alvo
Dispositivo P ₁	PBS	Dispositivo S ₅	rSV-N
Dispositivo P ₂	PBS	Dispositivo C ₃	rCV-N
Dispositivo C ₁	rCV-N	Dispositivo C ₄	rCV-N
Dispositivo C ₂	rCV-N	Dispositivo C ₅	rCV-N
Dispositivo S ₁	rSV-N	Dispositivo C ₆	rCV-N
Dispositivo G ₁	rGRFT	Dispositivo C ₇	rCV-N
Dispositivo G ₂	rGRFT	Dispositivo C ₈	rCV-N
Dispositivo P ₃	PBS	Dispositivo C ₉	rCV-N
Dispositivo S ₂	rSV-N	Dispositivo C ₁₀	rCV-N
Dispositivo S ₃	rSV-N	Dispositivo C ₁₁	rCV-N
Dispositivo S ₄	rSV-N		

3 Caracterização de Dispositivos Imunossensores

Neste capítulo, apresentaremos os métodos de medição utilizados para caracterizar e avaliar o funcionamento de um imunossensor com base em grafeno. Serão avaliados a existência de eventuais correntes paralelas ao canal de condução do grafeno, a seletividade do imunossensor para a proteína alvo e a influência ou não das dimensões do dispositivo.

3.1 Montagem Experimental

Temos o intuito de observar a mudança na resistência elétrica do grafeno quando este estiver em contato com soluções contendo diferentes concentrações das proteínas-alvo deste trabalho e, também, quando aplicarmos uma tensão elétrica entre o grafeno e um eletrodo em contato com a solução. Para isso, fizemos uma montagem experimental como esquematizada na figura 3.1, para determinar a resistência do dispositivo.

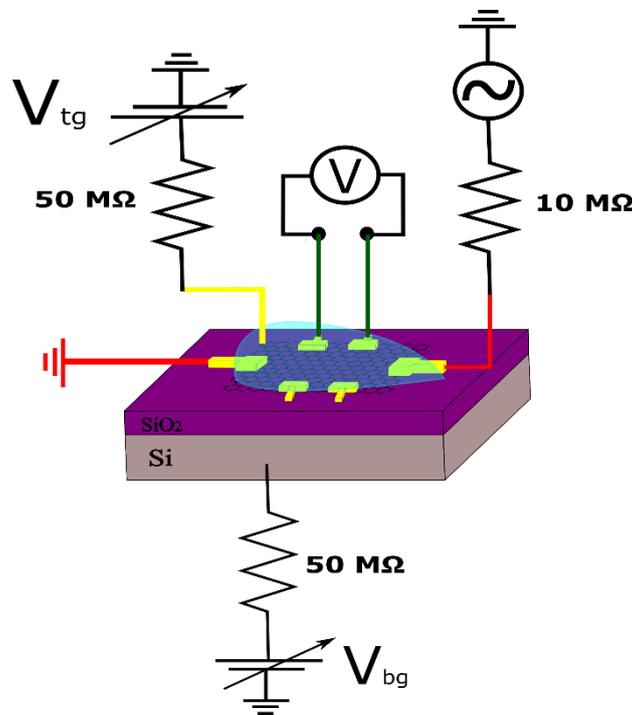


Figura 3.1: Esquemática da montagem experimental para as medidas realizadas neste estudo. Na figura, a rede hexagonal representa o grafeno sobre o Substrato de SiO₂/Si, em azul é representada a solução sobre o grafeno com os contatos de ouro (região amarela).

Nessas medições, utilizamos um amplificador *lock-in* para medidas AC, com frequência ajustada para 13,3 Hz e com amplitude de 1,0 V. Como a resistência do dispositivo de grafeno é da ordem de 1 kΩ, colocamos um resistor de 10 MΩ em série com ele para garantir uma corrente, I , constante de 100 nA. A diferença de potencial, V , entre dois pontos do dispositivo é medida com o amplificador *lock-in* no modo diferencial e a resistência do dispositivo é determinada por: $R = V/I$. Por intermédio de um fio de ouro, uma tensão de porta superior é aplicada por meio de uma fonte *Keithley 230*, e um resistor de 50 MΩ ligado em série, que serve como uma proteção do dispositivo, caso a rigidez dielétrica da solução seja rompida. Em todas as medidas, a constante de tempo do amplificador *lock-in* foi de 300 ms e o tempo de aquisição para cada ponto foi de 1s.

3.2 Medidas da Resistência Elétrica em Função da Tensão de Porta Superior

Para caracterizar dispositivos de grafeno como um transdutor, realizamos medidas de resistência elétrica em função da tensão de porta superior utilizando a solução de PBS como o eletrólito. Utilizando a montagem experimental mostrada na figura 3.1, foi variada a tensão de porta superior (V_{tg}) que, como descrito na subseção 1.3, controla a quantidade de portadores de carga no grafeno, implicando na mudança da resistência elétrica do dispositivo P_1 . Na figura 3.2, apresentamos o resultado de R versus V_{tg} , onde podemos observar que para $V_{tg} = 0$ V a condução no grafeno se dá por buracos, uma vez que o ponto de neutralidade de carga ocorre em $V_{tg}^* \sim 2,9$ V. Em $V_{tg} = 2,83$ V atinge-se o ponto de neutralidade de carga e com o aumento de V_{tg} a condução no grafeno passa a ser por elétrons. Esse resultado demonstra que mesmo após a funcionalização é possível controlar a quantidade de portadores de carga no grafeno. Desta forma, o grafeno se qualifica para ser utilizado como um transdutor.

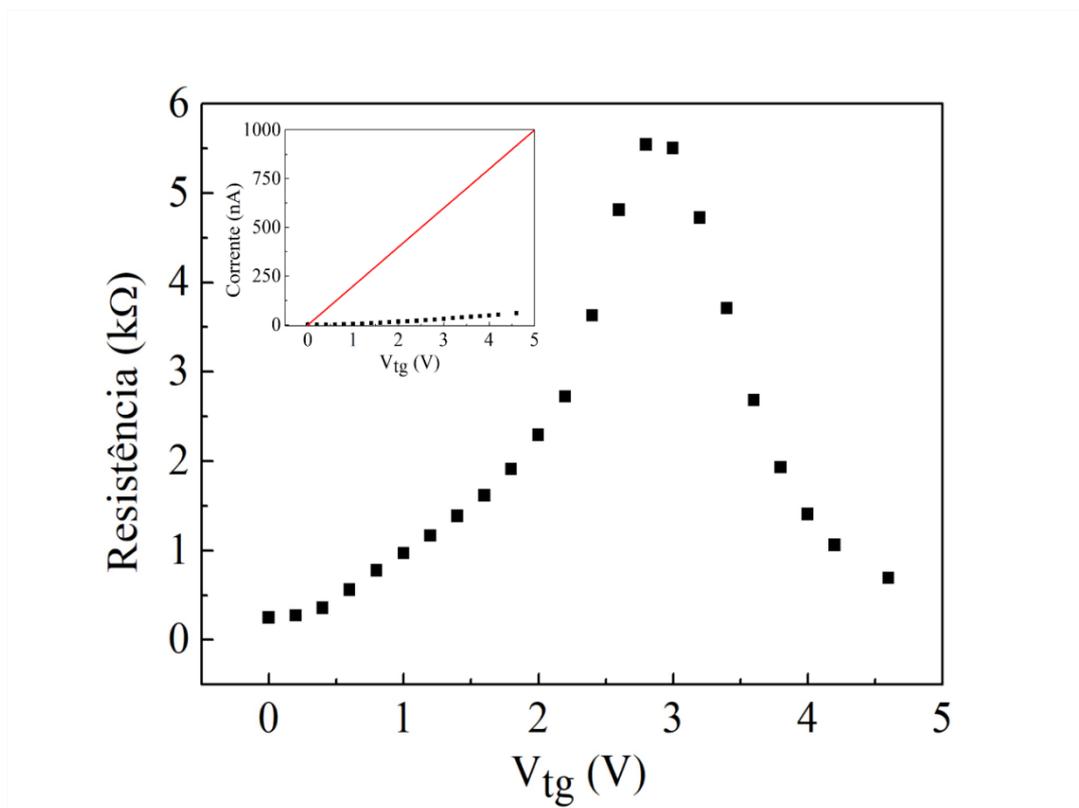


Figura 3.2: Caracterização de um dispositivo à base de grafeno, relação entre a resistência e a tensão de *gate* (V_{tg}). Na inserção, a relação entre a corrente de fuga e V_{tg} , a linha vermelha indica os valores para a fuga total da corrente.

Juntamente com medição da resistência, medimos também a corrente entre o grafeno e o terminal da porta superior, denominada corrente de fuga, o resultado obtido está mostrado na inserção da figura 3.2. Se a rigidez dielétrica da solução fosse rompida, a solução se tornaria condutora e a única resistência elétrica entre o grafeno e o terminal da porta superior seria a de $50 \text{ M}\Omega$, neste caso, e o valor da corrente de fuga seria o que

está indicado pela linha vermelha. Podemos observar que o valor da corrente de fuga é sempre muito menor que o valor para fuga total.

3.3 Efeitos da Funcionalização sobre o Grafeno

Com o intuito de avaliar o efeito dos componentes da funcionalização sobre as propriedades eletrônicas do grafeno, realizamos medidas da resistência em função da tensão de porta superior entre as etapas de funcionalização do dispositivo P2. O resultado obtido de R versus V_{tg} é apresentado na figura 3.3, onde observamos um deslocamento para maiores valores de V_{tg} da curva após a ligação do grafeno com o PBSE (curva vermelha), indicando uma dopagem tipo p pelo PBSE, corroborando com o resultado apresentado na seção 2.2. As etapas de incorporação dos anticorpos, negativamente carregados (curva) e a passivação do dispositivo com etalonamina, contendo o radical amino NH_2 , e Tween 20 (curva azul), também, induzem carga positivas no grafeno [122].

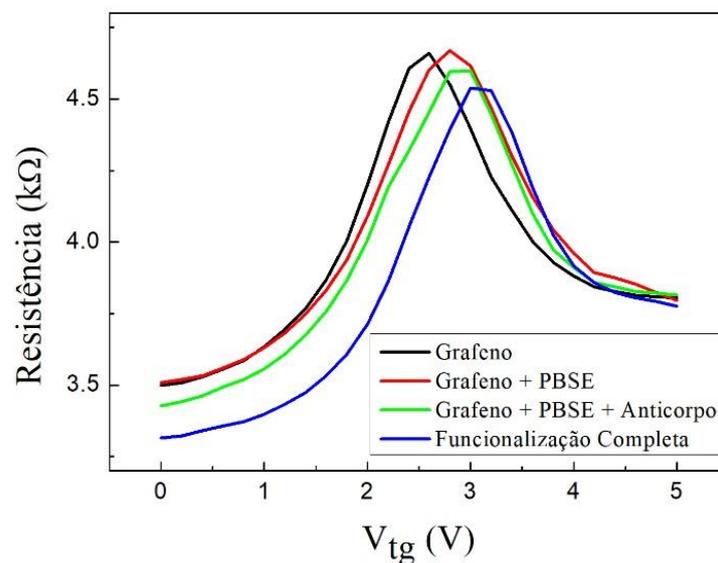


Figura 3.3: Resistência *versus* tensão de porta superior (V_{tg}) para o dispositivo antes do início da funcionalização (curva preta), após a incubação do dispositivo com PBSE (curva vermelha), após incorporação dos anticorpos (curva verde) e após a passivação do dispositivo (curva azul).

3.4 Seletividade do Imunossensor de Grafeno

Utilizando dispositivos previamente funcionalizados como descrito na seção 2.2, realizamos medidas da resistência elétrica do dispositivo em contato com soluções de diferentes concentrações da proteína alvo. Essas medidas objetivam avaliar se há variação na resistência elétrica do dispositivo funcionalizado quando em contato com essas soluções e se ele é seletivo à proteína alvo ao gerar tais variações.

Inicialmente, sobre um imunossensor, previamente funcionalizado para detectar rCV-N, foi injetada 2 μ L da solução de PBS, enquanto a resistência elétrica do dispositivo era medida como descrito na seção 3.1. Depois de a resistência elétrica se estabilizar, 2 μ L de uma solução de 10 ng/mL de rSVN, proteína não específica ao imunossensor, foi injetada sobre o dispositivo. Esse volume de solução foi suficiente para cobrir toda a região do grafeno e dos contatos elétricos. Como mostrado na figura 3.4a, não foram

observadas mudanças significativas na resistência elétrica do dispositivo C_1 , entre essas duas etapas, mesmo após 3 minutos.

Em seguida, foi adicionada 2 μL de uma solução de rCV-N de 0,01 ng/mL sobre o imunossensor, o que produziu uma redução abrupta na resistência elétrica do dispositivo. Essa variação é devida à conjugação da proteína rCV-N, negativamente carregada em solução de PBS, com os anticorpos imobilizados sobre a superfície do imunossensor, induzindo, assim, cargas positivas no grafeno, em um processo como descrito na seção 1.3.

Esses procedimentos e medidas foram repetidos para o dispositivo C_1 , no qual foi utilizada a proteína rGRFT no lugar da rSVN. O resultado está mostrado na figura 3.4b, em que observamos que a presença da rGRFT na solução sobre o imunossensor de rCV-N não gerou mudança significativa na resistência elétrica do dispositivo, enquanto a presença da proteína alvo resulta em significativa redução na resistência elétrica do dispositivo. Essa redução, também, é atribuída à uma indução de cargas positivas no grafeno devido à interação entre os anticorpos e a rCV-N, negativamente carregada.

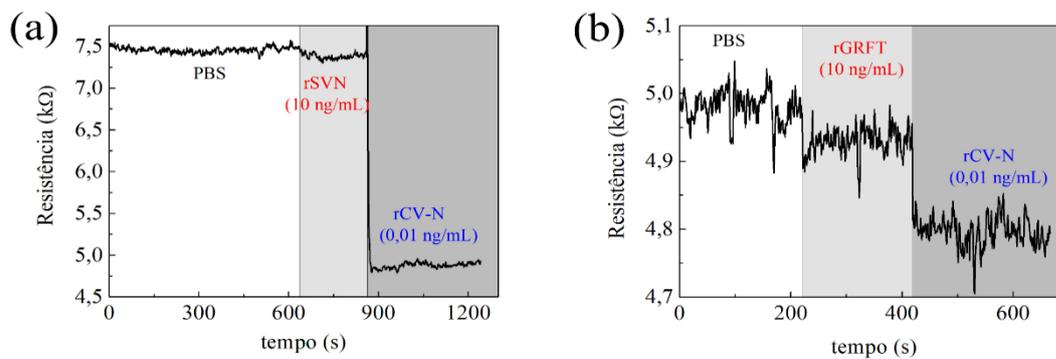


Figura 3.4: Resistência *versus* tempo para um imunossensor em contato com soluções de a) PBS, rSVN e rCV-N e b) PBS, rGRFT e rCV-N. As faixas em tons de cinza correspondem a cada solução em contato com o dispositivo.

Testes de seletividade também foram realizados para imunossensores de rSVN e rGRFT e os resultados estão mostrados nas figuras 3.5a e 3.5b, respectivamente, onde observamos que mudanças significativas na resistência elétrica dos dispositivos, S_1 e G_1 , acontecem somente na presença de soluções contendo as respectivas proteínas alvo do imunossensor. A interação entre os anticorpos imobilizados sobre o grafeno e as proteínas-alvo, de cada imunossensor, produziram mudanças nas resistências que são entre 4,5 e 30 vezes maiores que a mudança produzida por soluções que contêm proteínas diferentes da proteína-alvo. Esses resultados indicam que imunossensores com base em grafeno são muito seletivos à proteína alvo.

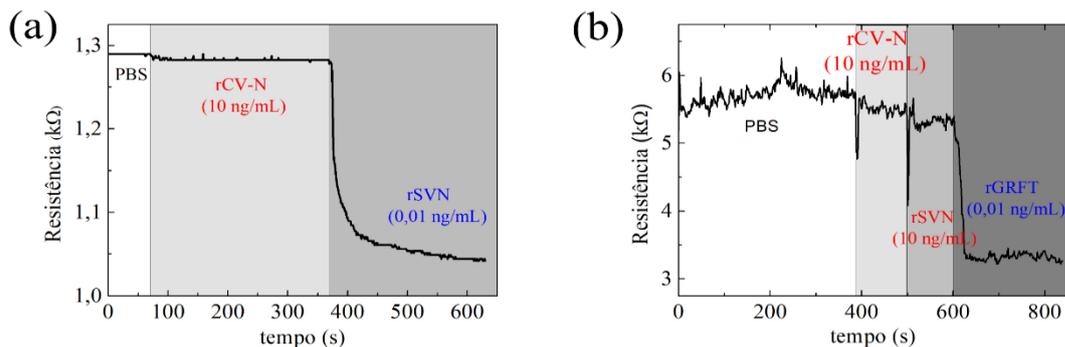


Figura 3.5: Resistência *versus* tempo para um a) imunossensor de rSVN em contato com soluções de PBS, rCV-N e rSVN e b) imunossensor de rGRFT em contato com soluções de PBS, rCV-N, rSVN e rGRFT. As faixas em tons de cinza correspondem a cada solução em contato com o dispositivo.

As mudanças na resistência observadas para proteínas não específicas são provavelmente devidas à existência de regiões do grafeno que não foram totalmente passivadas pela solução de Tween 20 e/ou à existência de moléculas de PBSE não desativadas pela etalonamina. Pequenos sinais devido às proteínas não específicas à imunossensores foram também observados em outros estudos [42,50,51].

3.5 Influência das Dimensões do Dispositivo sobre a Sensibilidade do Imunossensor

A técnica de clivagem micromecânica, utilizada para a obtenção das amostras de grafeno desse estudo e descrita na subseção 2.1, não permite ter controle sobre o formato dos flocos de grafeno obtidos. Para comparar os resultados de medições feitas em diferentes dispositivos, foi avaliada a dependência da variação da resistência elétrica com as dimensões da amostra de grafeno.

Utilizando o dispositivo G₂ configurado com geometria de ponte Hall, apresentado na figura 3.6, medimos a resistência do imunossensor, para duas regiões diferentes, enquanto variávamos a concentração da solução sobre o dispositivo. Nessa medição, a corrente elétrica fluiu entre os terminais D e E e resistência elétrica foi medida, simultaneamente entre os terminais A e B (região 1) e entre os terminais B e C (região 2). A região 1 (destacada em vermelho) é cerca de 1,3 vezes maior que a região 2 (destacada em preto).

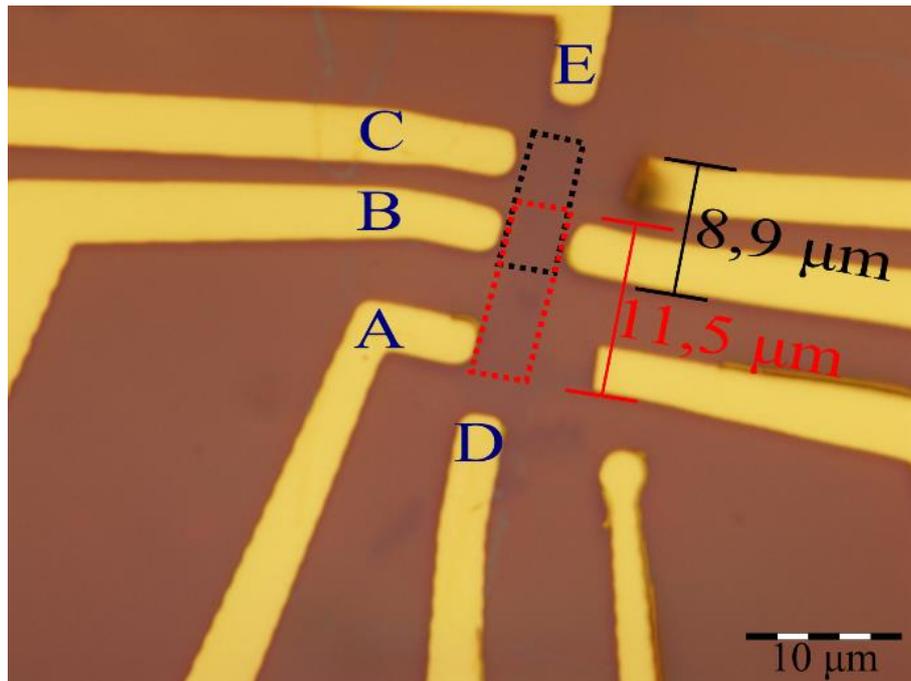


Figura 3.6: Dispositivo G_1 utilizado no estudo sobre a geometria do dispositivo. Destacado em vermelho a região 1, em que a resistência foi medida entre os terminais A e B. A região 2 está destacada em preto, sendo que a resistência foi medida entre os terminais B e C. Uma corrente de 100 nA passava entre os terminais D e E.

Nesse estudo utilizamos o imunossensor de rGRFT, com tensões de porta inferior e de porta superior fixas, respectivamente, em 0V e 1,2 V. Inicialmente sobre o dispositivo foi colocada uma solução de PBS, de forma a cobrir todos os terminais elétricos. Depois que a resistência se estabilizou, 2 μ L de uma solução de 0,01 ng/mL de rGRFT foi injetada sobre o imunossensor. Esse procedimento foi repetido para soluções com diferentes concentrações de rGRFT, ou seja, depois que a resistência se estabilizava, era adicionado sobre o dispositivo uma nova solução de rGRFT, com concentração crescente. O resultado obtido é apresentado na figura 3.7a. Nessa figura, observamos que o aumento da concentração de rGRFT em cada solução adicionada sobre o grafeno, produzia uma diminuição na resistência medida para cada região.

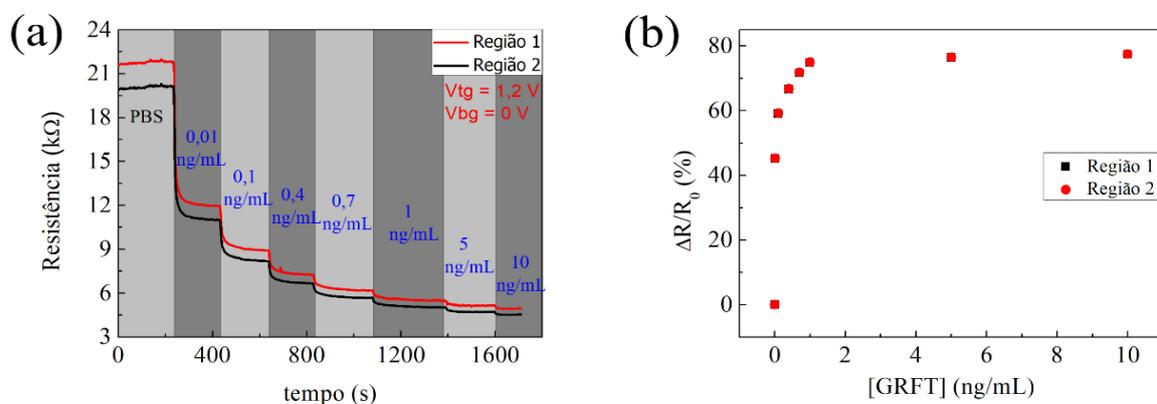


Figura 3.7: (a) Resistência *versus* tempo para duas regiões de um imunossensor de rGRFT. (b) Desvio percentual da resistência para cada concentração, ambas as regiões apresentam os mesmos valores.

Embora os dispositivos de grafeno que têm diferentes distâncias entre os contatos apresentem, como esperado, resistências diferentes, é importante analisar a variação relativa nos valores resistência para cada concentração de proteína alvo colocada sobre o dispositivo. Para isso calculamos o desvio percentual, $\Delta_R = 100 \frac{R_{PBS} - R_{GRFT}}{R_{PBS}}$, do valor da resistência em cada platô em relação ao valor medido com o dispositivo em contato com a solução de PBS. Os desvios para as duas regiões são apresentados na figura 3.7b. Esses resultados mostram que os desvios percentuais para cada concentração não dependem da dimensão do grafeno e que, portanto, esse valor que deve ser utilizado para um biossensor baseado em grafeno.

4 Funcionamento de um Imunossensor com base em Grafeno

Neste capítulo, avaliaremos o modelo teórico, proposto na seção 1.3, para o funcionamento de um imunossensor com base em grafeno. Esse modelo se baseia na mudança da distribuição de cargas elétricas na proximidade do transdutor que, conseqüentemente, altera a sua densidade de cargas. Esse é um efeito basicamente capacitivo. A partir da equação (1.15), obteremos os valores para a capacitância total do ISFET, a densidade de portadores de carga no grafeno e o valor de tensão referente ao ponto de neutralidade de carga no grafeno. Apresentaremos, também, medidas de efeito Hall que possibilitam validar o modelo proposto na seção 1.3. Por fim, compararemos as duas metodologias de medidas para um imunossensor, propostas na seção 1.4.

4.1 Condutividade *versus* Tensão de Porta Superior

Utilizando a montagem experimental descrita na seção 3.1, medimos a resistência elétrica $R = V/I$ dos dispositivos e determinamos a condutividade elétrica $\sigma = \frac{L}{W} \frac{1}{R}$ dos dispositivos, em que L é a distância entre os terminais em que foi medida a diferença de potencial V , e W é a largura do canal de condução do dispositivo.

Na figura 4.1, apresentamos os resultados obtidos (pontos), para a condutividade elétrica dos dispositivos de grafeno em função da tensão de porta superior V_{tg} , para o dispositivo P_3 em contato com uma solução de PBS. Notamos, nessa figura, que a condutividade diminui para $V_{tg} < 0,62$ V e aumenta para $V_{tg} > 0,62$ V. Nota-se que o ponto de neutralidade $V_{tg}^* \sim 0,62V > 0$, indicando que, na presença da solução de PBS, o grafeno possui uma dopagem tipo p.

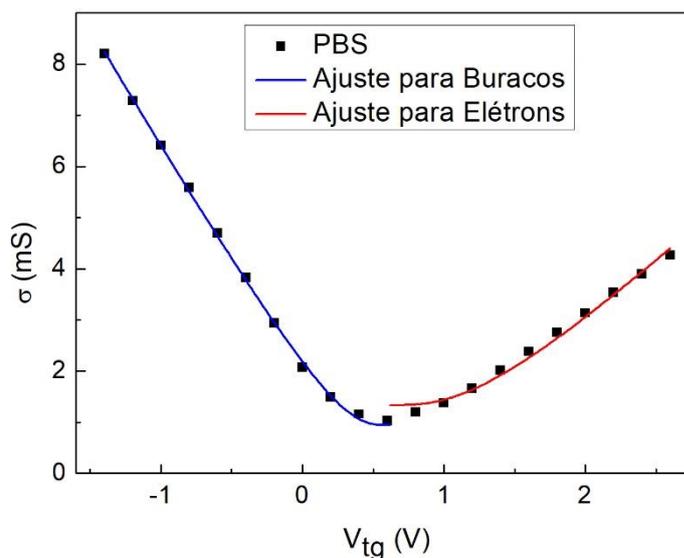


Figura 4.1: Condutividade *versus* tensão de porta superior para o dispositivo P3 com uma solução de PBS. As linhas contínuas são os ajustes da equação (1.15) no ramo dos buracos (curva azul) e no ramo dos elétrons (curva vermelha).

Com o intuito de se obter valores que possibilitem caracterizar o imunossensor, foi feito o ajuste por mínimos quadrados da equação (1.15) com os dados mostrados na figura 4.1. Nesse ajuste, os parâmetros ajustados foram: a mobilidade eletrônica μ , a densidade intrínseca de portadores n_0 , e a capacitância geométrica C_D do eletrólito. Como se pode observar na figura 4.1, existe uma assimetria entre a condutividade por buracos ($V_{tg} < 0,62V$) e a condutividade por elétrons ($V_{tg} > 0,62 V$), que também foi observada em outros estudos e é justificada pelo acúmulo de cargas sob os contatos elétricos [123–125]. Devido a essa assimetria a equação (1.15) foi ajustada separadamente para a condutividade por buracos e por elétrons. Na figura 4.1, as linhas são os ajustes da equação (1.15) para buracos (curva azul) e elétrons (curva vermelha). Os valores obtidos para μ , n_0 e C_D de cada ajuste estão mostrados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores dos parâmetros obtidos para o ajuste das curvas mostradas na Fig. 4.1.

	Buracos	Elétrons
μ (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	$(7,3 \pm 0,2) \times 10^2$	$(3,2 \pm 0,7) \times 10^2$
n_0 (cm ⁻²)	$(6,9 \pm 0,5) \times 10^{12}$	$(6,9 \pm 0,5) \times 10^{12}$
C_D (μF cm ⁻²)	$9,3 \pm 0,3$	$9,1 \pm 0,3$

4.2 Medidas de Condutividade sob Campo Magnético

Com o objetivo de validar o modelo proposto para a condutividade de um ISFET com base em grafeno, foram realizadas medidas do efeito Hall para determinar os valores de μ , n_0 e C_D . Essas medidas foram feitas com o dispositivo P₃ (figura 4.2a) a cerca de 1 cm de um ímã de neodímio, onde a intensidade do campo magnético medida foi $B = 0,76 T$. Com uma corrente elétrica I do contato 1 para o 2, medimos a tensão Hall entre os contatos 3 e 4. Na figura 4.2b, são apresentados os resultados da tensão Hall V_H em função da corrente elétrica I no canal de condução, para o dispositivo seco (quadrados pretos) e com PBS em contato com o grafeno (quadrados vermelhos).

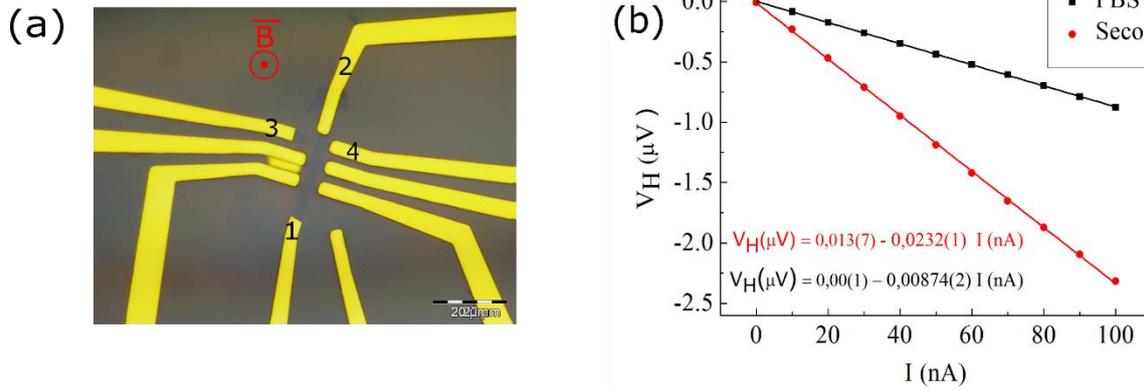


Figura 4.2: (a) Dispositivo P_3 utilizado nas medidas de Efeito Hall com a indicação do campo magnético B orientado para fora do plano da página. (b) Tensão Hall em função da corrente elétrica, no canal de condução, com o dispositivo seco (pontos vermelhos) e em contato com a solução de PBS (pontos pretos). As retas e as equações mostradas são resultados dos ajustes lineares dos valores experimentais.

Os ajustes lineares apresentados na figura 4.2b possibilitam determinar a densidade intrínseca de portadores de carga do grafeno, por meio da equação

$$V_H = -\frac{B}{ne} I \quad (1.17)$$

em que e é a carga elétrica elementar e B é a intensidade do campo magnético. A partir da inclinação das retas vermelha e preta foi possível determinar a densidade de portadores quando a tensão de porta superior é nula ($V_{tg} = 0$ V) para o dispositivo seco e para o dispositivo em contato com PBS, respectivamente. Os valores obtidos foram: $n(V_{tg} = 0 \text{ V}) = 2,047 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$, para o dispositivo seco e $n(V_{tg} = 0 \text{ V}) = 5,44 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$ para o dispositivo em contato com a solução de PBS.

Em seguida, com a solução de PBS sobre o dispositivo, a corrente elétrica entre os contatos 1 e 2 foi fixada em 100 nA e foram medidas, simultaneamente, a tensão Hall entre os terminais 3 e 4, e a tensão entre os terminais 5 e 6, enquanto variava-se a tensão de porta superior V_{tg} . Na figura 4.3a, apresentamos o coeficiente Hall, $R_H = V_H/IB$ em função de tensão V_{tg} . A relação entre R_H e n é dada por

$$R_H = -\frac{1}{ne}. \quad (1.18)$$

Com essa equação, calculamos a densidade de portadores de carga no grafeno em função da tensão de porta superior aplicada com o dispositivo coberto com a solução de PBS. O resultado é apresentado (pontos pretos) na figura 4.3b. Nessa figura, apresentamos, também, a condutividade (pontos azuis) do dispositivo. Como esperado, observa-se que quanto menor o módulo da densidade portadores de carga, menor é a condutividade do dispositivo. O alto valor para a densidade de portadores de cargas também foi observado em outros ISFET com base em grafeno [126,127].

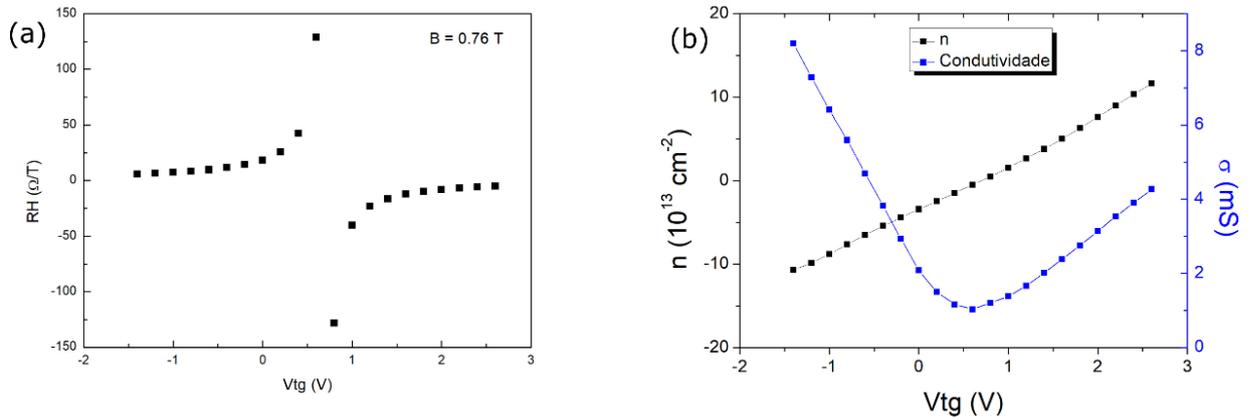


Figura 4.3: (a) Coeficiente Hall em função da tensão de *porta superior*. (b) Densidade de portadores de carga (pontos pretos) e condutividade em função da tensão de *porta superior* (pontos azuis).

Pelo modelo de Drude, a condutividade é dada por $\sigma = |ne\mu|$; portanto, a partir dos resultados da figura 4.3b podemos determinar o valor da mobilidade eletrônica de buracos e elétrons no dispositivo.

Na figura 4.4, apresentamos os resultados de ajustes lineares de $\sigma \times n$, como sugere o modelo de Drude. Com base nesses ajustes, determinamos a mobilidade para elétrons $\mu_E = (178 \pm 1) \frac{cm^2}{Vs}$ e para buracos $\mu_B = (510 \pm 10) \frac{cm^2}{Vs}$.

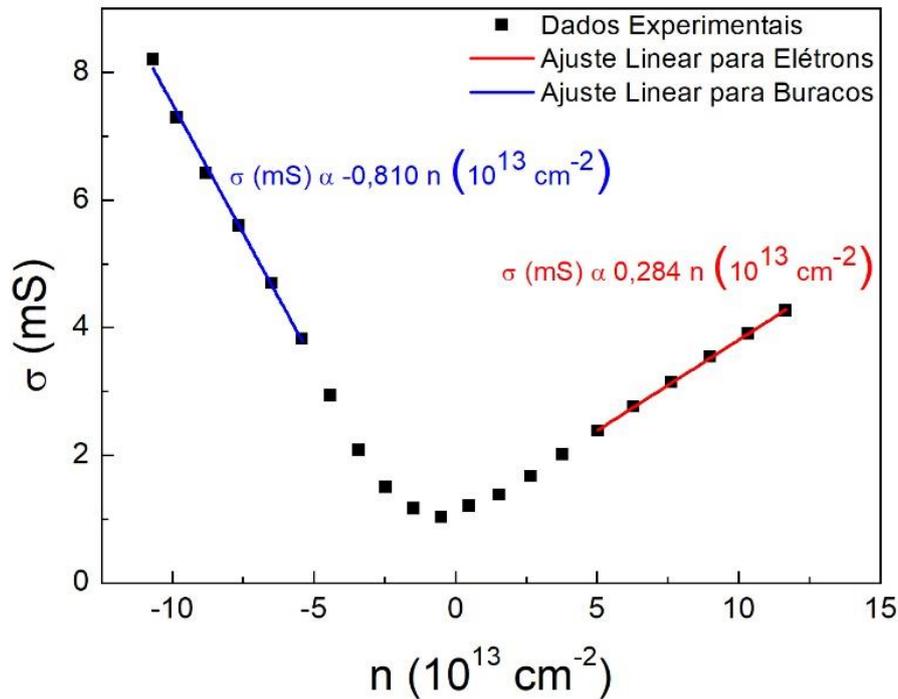


Figura 4.4: Condutividade em função da densidade de portadores de grafeno. As retas azul e vermelha são ajuste lineares para o ramo dos buracos e dos elétrons, respectivamente.

A partir da equação (1.12) notamos que a condutividade é mínima ($\sigma = \sigma_{\min}$) quando a densidade de portadores induzida pela tensão de porta superior é nula e esse valor corresponde à densidade de portadores intrínseca n_0 . A partir da figura 4.4, determinamos que a densidade de portadores intrínseca do dispositivo é $n_0 = 5,67 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$.

Quanto maior o valor da tensão de porta superior, mais o segundo termo da equação 1.13 irá prevalecer diante do primeiro. Desta forma, a partir dos dados da figura 4.3b, é possível determinar o valor da capacitância do dispositivo por meio de ajustes lineares nos limites da curva $n \times V_{tg}$ ($-1,4 \text{ V} \leq V_{tg} \leq -0,8 \text{ V}$ e $2,0 \text{ V} \leq V_{tg} \leq 2,6 \text{ V}$).

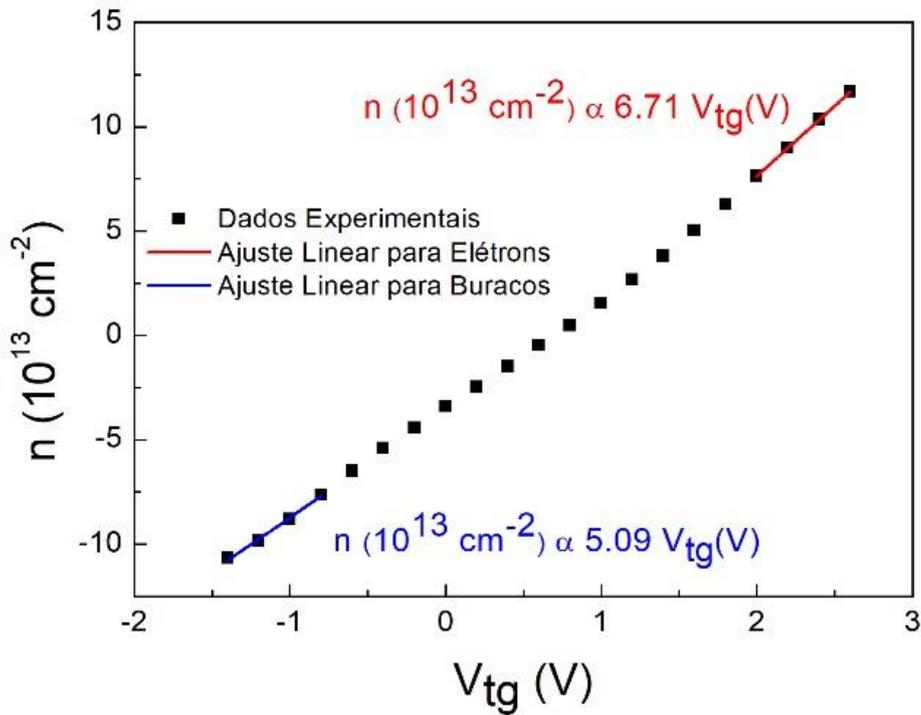


Figura 4.5: Densidade de portadores no grafeno em função da tensão de porta superior. As retas azul e vermelha são ajuste lineares para o ramo dos buracos e dos elétrons, respectivamente.

Na figura 4.5, apresentamos a curva $n \times V_{tg}$ com os ajustes lineares para elétrons (reta vermelha) e para buracos (reta azul). A partir dos ajustes lineares, obtivemos a capacitância geométrica para elétrons $C_{DE} = (10,74 \pm 0,05) \frac{\mu F}{cm^2}$ e para buracos $C_{DB} = (8,1 \pm 0,4) \frac{\mu F}{cm^2}$.

Com essa figura, é possível determinar que para $V_{tg} = 0$ V a condução se dá por buracos e que a densidade de portadores de carga é $n(V_{tg} = 0 \text{ V}) = 3,42 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$. Esse valor é comparável ao obtido a partir dos resultados da figura 4.3, $n(V_{tg} = 0 \text{ V}) = 5,44 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}$.

Tabela 4.2: Comparação entre os valores obtidos via modelo e via medidas do efeito Hall.

	Buracos		Elétrons	
	Modelo	Efeito Hall	Modelo	Efeito Hall
μ ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	$(7,3 \pm 0,2) \times 10^2$	$(5,1 \pm 0,1) \times 10^2$	$(3,2 \pm 0,7) \times 10^2$	$(1,78 \pm 0,01) \times 10^2$
n_0 ($10^{12} cm^{-2}$)	$6,9 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$	$6,9 \pm 0,5$	$5,6 \pm 0,5$
C_D ($\mu F cm^{-2}$)	$9,3 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,4$	$9,1 \pm 0,3$	$10,74 \pm 0,05$

Na tabela 4.2 comparamos os valores obtidos diretamente pelas medidas de efeito Hall e os valores obtidos por meio do ajuste da equação (1.15) aos dados experimentais. Podemos observar que os valores obtidos pelas duas metodologias são da mesma ordem

de grandeza. Diante das suposições e aproximações feitas na seção 1.3, onde o modelo foi proposto, podemos assumir que os valores obtidos a partir do ajuste da equação (1.15) representam bem a realidade do dispositivo e essa equação pode fornecer valores que possibilitam entender o funcionamento de um imunossensor com base em grafeno.

4.3 Medidas de Varredura de Porta Superior de um Dispositivo Imunossensor

Foram realizadas medidas da condutividade do dispositivo S_2 em função da tensão de porta superior com soluções de rSVN em diferentes concentrações. Como discutido na seção 1.4, acredita-se que a variação da capacitância do eletrólito é a responsável pela mudança na densidade de cargas no grafeno e uma consequente alteração na condutividade do imunossensor com base no grafeno. Desta forma, a partir dos resultados da condutividade em função da tensão de porta superior com a solução de PBS como meio dielétrico, estimamos os valores das mobilidades eletrônicas dos elétrons e dos buracos e assumimos que esses valores não variam com a concentração de rSVN na solução em contato com o dispositivo. Assim como na seção 4.1, foram feitos ajustes para o ramo dos buracos, $V_{tg} < V_{tg}^*$, e para o ramo dos elétrons, $V_{tg} > V_{tg}^*$.

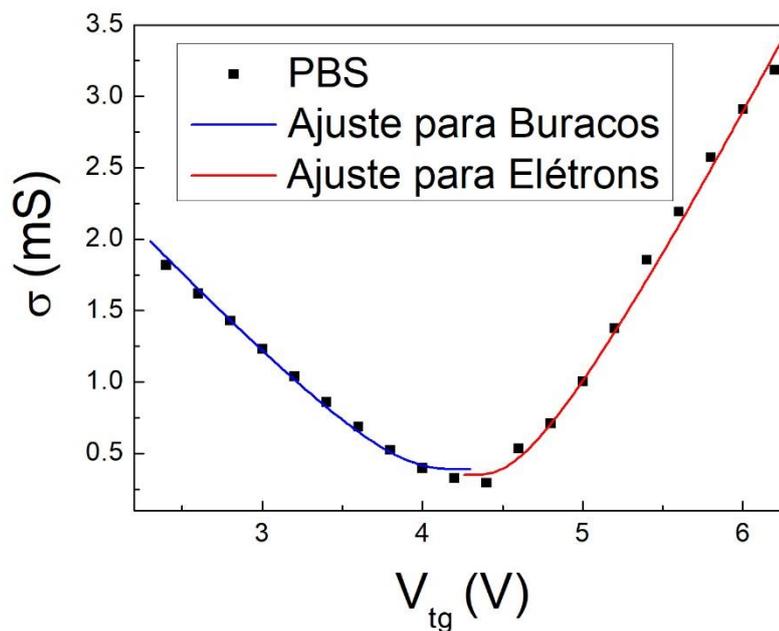


Figura 4.6: Condutividade versus tensão de porta superior em uma solução de PBS. As linhas contínuas são os ajustes da equação (1.15) no ramo dos buracos (curva azul) e no ramo dos elétrons (curva vermelha).

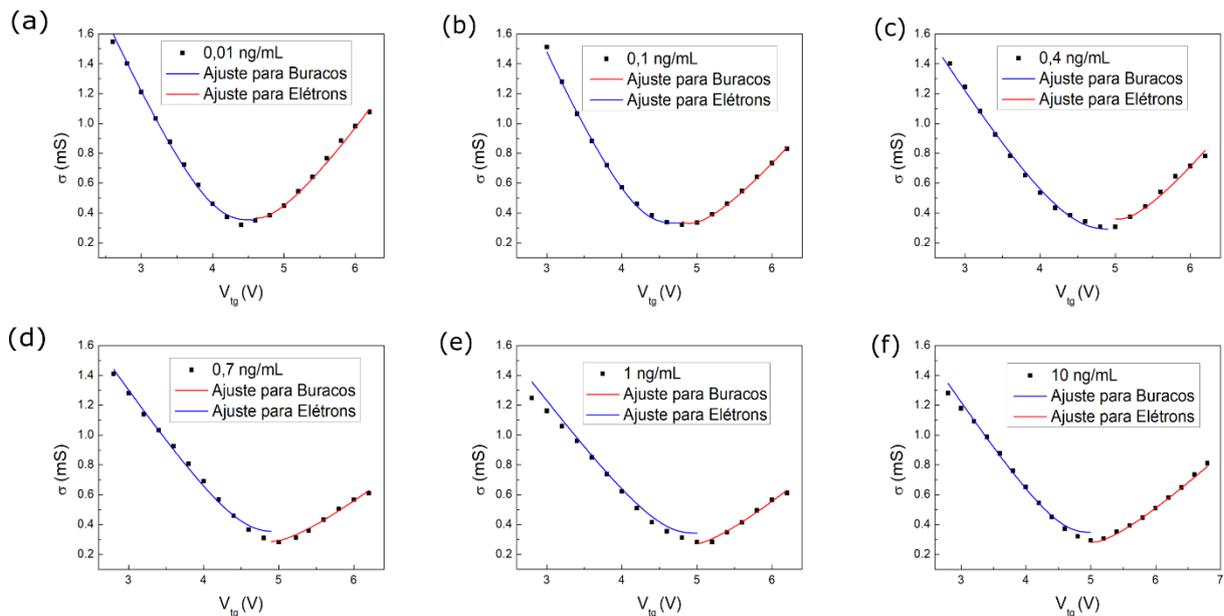
Na figura 4.6, apresentamos os resultados obtidos com o dispositivo em contato com uma solução de PBS (pH = 7,4). Ajustando a equação (1.15) a esse resultado obtivemos os valores da mobilidade eletrônica, da densidade intrínseca de portadores de carga e a capacitância do ISFET, mostrados na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores obtidos para o imunossensor em contato com a solução de PBS.

	Buracos	Elétrons
μ (cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^2$	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^2$
n_0 (cm ⁻²)	$(1,68 \pm 0,05) \times 10^{13}$	$(1,72 \pm 0,03) \times 10^{13}$
C_D (μF cm ⁻²)	$12,8 \pm 0,6$	$13,5 \pm 0,3$

Na figura 4.7, apresentamos as medidas da condutividade desse imunossensor em função da tensão de porta superior enquanto o dispositivo estava em contato com soluções com diferentes concentrações de rSVN. Para cada curva de $\sigma \times V_{tg}$ ajustamos a equação (1.15) para a condutividade de elétrons (curvas em vermelho) e de buracos (curvas em azul). Nesses ajustes, os valores das mobilidades eletrônicas foram mantidos constantes e iguais aos apresentados na tabela 4.3. Os parâmetros a serem determinados foram a densidade intrínseca de portadores de carga e a capacitância do ISFET.

Figura 4.7: Condutividade versus tensão de porta superior em uma solução contendo rSVN nas



concentrações de (a) 0,01 ng/mL, (b) 0,1 ng/mL, (c) 0,4 ng/mL, (d) 0,7 ng/mL, (e) 1 ng/mL e (f) 10 ng/mL. Em todos os gráficos as linhas contínuas são os ajustes da equação (1.15) no ramo dos buracos (curva azul) e no ramo dos elétrons (curva vermelha).

Dos 14 ajustes realizados, o que apresentou o menor valor para o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,996$) foi o ajuste para elétrons com concentração de de rSVN de 0,4 ng/ml (curva vermelha da figura 4.7c). Desta forma, podemos assumir que o modelo descreve bem os dados experimentais.

Na figura 4.8 apresentamos os valores obtidos para a densidade intrínseca de portadores de carga obtida pelo ajuste da condutividade por elétrons (pontos em vermelho) e por buracos (pontos em azul), em função do logaritmo da concentração de rSVN. A reta horizontal indica o valor médio $n_0 = (1,68 \pm 0,09) \times 10^{13}$ cm⁻². Diante desse resultado, é razoável assumir que a densidade intrínseca de portadores no grafeno é

mantida constante mesmo aumentando a concentração de rSVN na solução em contato com o dispositivo.

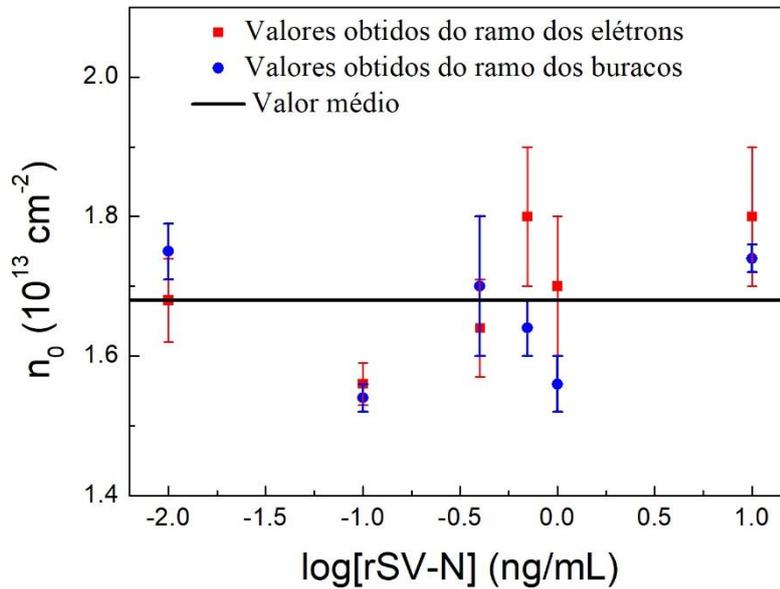


Figura 4.8: Densidade intrínseca de portadores, no grafeno, em função da concentração de rSVN. A linha horizontal representa o valor médio de n_0 dos 12 valores obtidos dos ajustes da figura 4.7.

Nas figuras 4.9a e 4.9b, apresentamos os valores para a capacitância geométrica obtida a partir do ajuste para o ramo dos buracos e elétrons, respectivamente. Notamos que em ambos os casos, um aumento na concentração de rSVN implica em uma queda no valor da capacitância do ISFET.

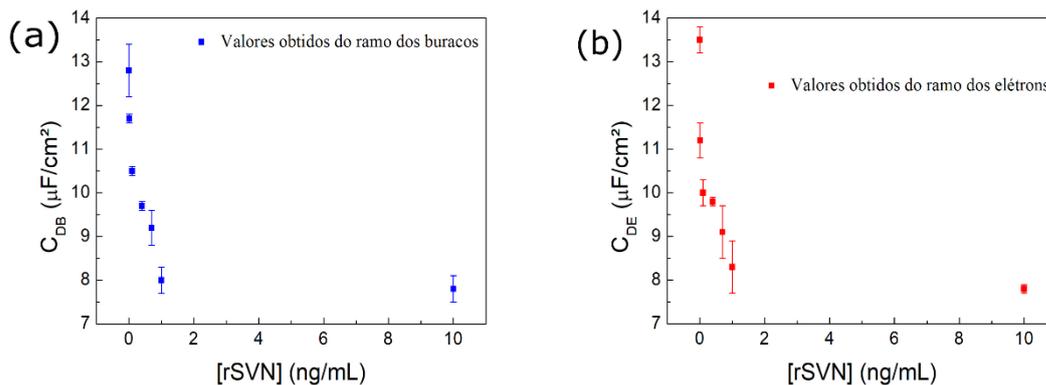


Figura 4.9: Valores da capacitância geométrica, obtidas dos ajustes, em função da concentração de rSVN. Em (a) são valores obtidos do ramo dos elétrons e (b) a partir do ramo dos buracos.

Esse resultado pode ser justificado pelo fato que na proximidade dos anticorpos de rSVN, negativamente carregados, há íons positivamente carregados, como esquematizado na figura 4.10a. Ao ocorrer a interação entre o anticorpo e a proteína alvo, haverá uma redistribuição de cargas na proximidade dos anticorpos, o que acarretará na expansão da camada alvo, como representado na figura 4.10b. Note que a expansão da

camada alvo ($d_2 > d_1$) implicará na diminuição da capacitância de Donnan, C_{DON} , uma vez que a capacitância por unidade de área é inversamente proporcional à dimensão do capacitor. Pela equação 1.16, a diminuição da capacitância de Donnan implica na diminuição da capacitância total do ISFET. Desta forma, o aumento da concentração da proteína alvo na solução em contato com o dispositivo implicará na diminuição da capacitância do ISFET, como observado nos resultados experimentais da figura 4.9.

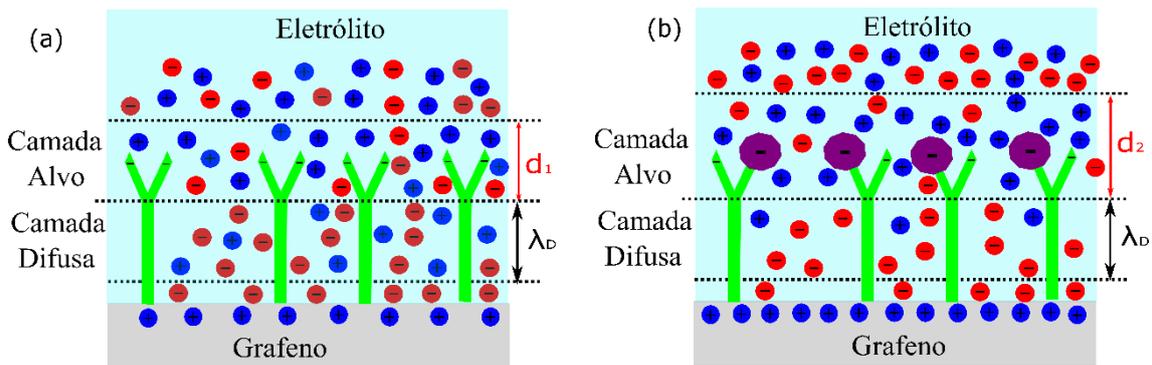


Figura 4.10: Esquema representando o aumento de comprimento da camada alvo de um imunossensor devido à detecção da proteína alvo (estruturas em lilás) pelos anticorpos (estruturas em verde). Em (a) a camada alvo tem comprimento d_1 , enquanto em (b) esse comprimento aumenta para d_2 .

Na figura 4.11, apresentamos a relação entre a tensão de Dirac e a concentração de rSVN. O aumento da tensão de Dirac V_{tg}^* com a concentração de rSVN na solução em contato com o dispositivo, indica que o grafeno apresenta uma dopagem do tipo p devido à interação anticorpo-antígeno na solução sobre o dispositivo.

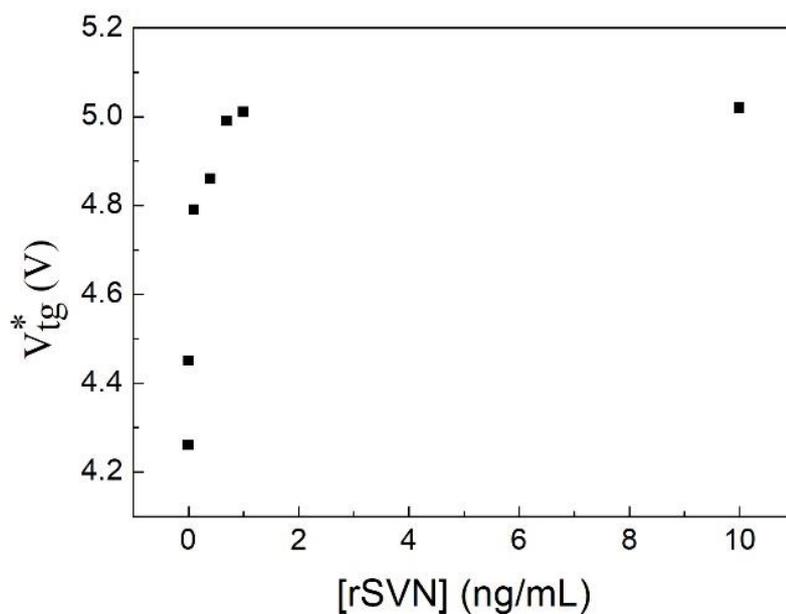


Figura 4.11: Tensão de Dirac em função da concentração de rSVN.

Os resultados das figuras 4.9 e 4.11 são correlacionados pois, uma vez que a densidade intrínseca de portadores é constante, a diminuição da capacitância do ISFET acarreta na diminuição da capacidade da solução de induzir cargas no grafeno. Isso leva à necessidade de um maior valor de tensão de porta superior para atingir o ponto de neutralidade de cargas.

Para um biossensor que utiliza a tensão de Dirac como parâmetro de análise, é possível obter uma curva de calibração a partir do resultado da figura 4.11. Para isso, calculamos o desvio relativo do valor da tensão de Dirac do dispositivo em contato com a solução de rSVN, em relação ao valor medido com o dispositivo em contato com a

solução de PBS, dado por $\Delta_{V^*} = \frac{|V_{PBS}^* - V_{rSVN}^*|}{V_{PBS}^*}$. Esse desvio em função do logaritmo da

concentração de rSVN é apresentado na figura 4.12, onde verificamos um comportamento linear para valores entre 0,01 ng/mL e 1 ng/mL. A curva vermelha é o resultado do ajuste linear aos dados experimentais dado por $\Delta_{V^*} = (17,7 \pm 0,6) + (6,4 \pm 0,6) \log([rSVN])$, com um coeficiente de determinação $R^2 = 0,966$.

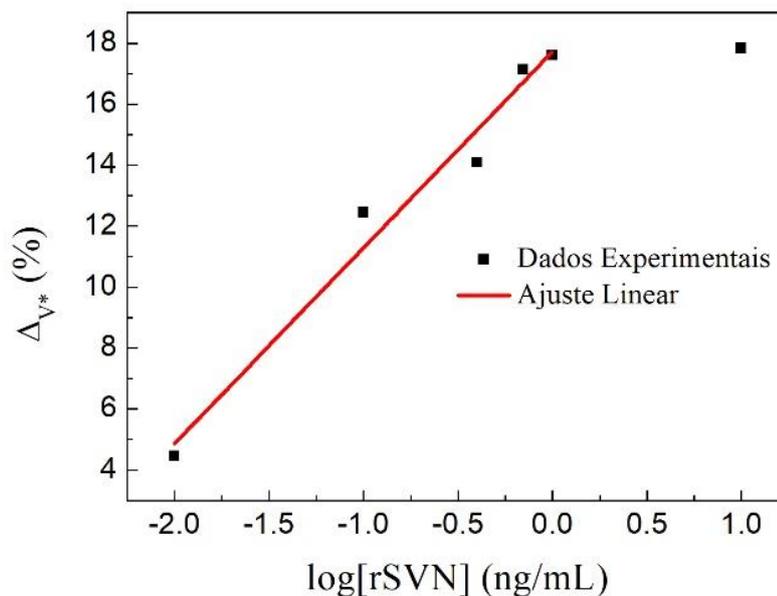


Figura 4.12: Desvio percentual da tensão de Dirac em função do logaritmo na base 10 da concentração de rSVN. A reta vermelha representa o ajuste linear aos dados experimentais.

A partir desse ajuste podemos determinar o valor C_L do limite de detecção do imunossensor de rSVN como o valor da concentração de rSV-N para que o desvio Δ_{V^*} seja igual a três vezes o desvio padrão σ da tensão de Dirac referente à solução de PBS [128]. Para essas medidas, $\sigma = 0,22\%$, o que resulta em um limite de detecção $C_L \approx 2,18$ pg/mL.

4.4 Análise de um Imunossensor V_{tg} fixo

A segunda metodologia, proposta na seção 1.4, para o funcionamento de um imunossensor com base em grafeno, consiste em fixar a tensão de porta superior do ISFET e medir a resistência do dispositivo para diferentes concentrações da proteína alvo em interação com o imunossensor.

Os resultados apresentados na figura 4.9 mostram que o aumento da concentração da proteína rSVN, na solução em contato com o dispositivo, leva à diminuição no valor da capacitância geométrica do ISFET. Consequentemente, para um valor fixo de tensão de porta superior, a densidade de cargas induzidas no grafeno irá diminuir. Essa diminuição resultará no aumento da condutividade para a condução por elétrons ou por buracos. Nessa seção, iremos apresentar os resultados em função da variação da resistência elétrica dos dispositivos. Como a resistência elétrica é inversamente proporcional à condutividade, espera-se que o aumento da concentração de rSVN resulte em uma diminuição no valor da resistência elétrica do dispositivo.

Para determinada a tensão porta superior a ser fixada, fizemos uma varredura de V_{tg} com a solução de PBS em contato com o dispositivo S_3 . O resultado obtido está apresentado na figura 4.13.

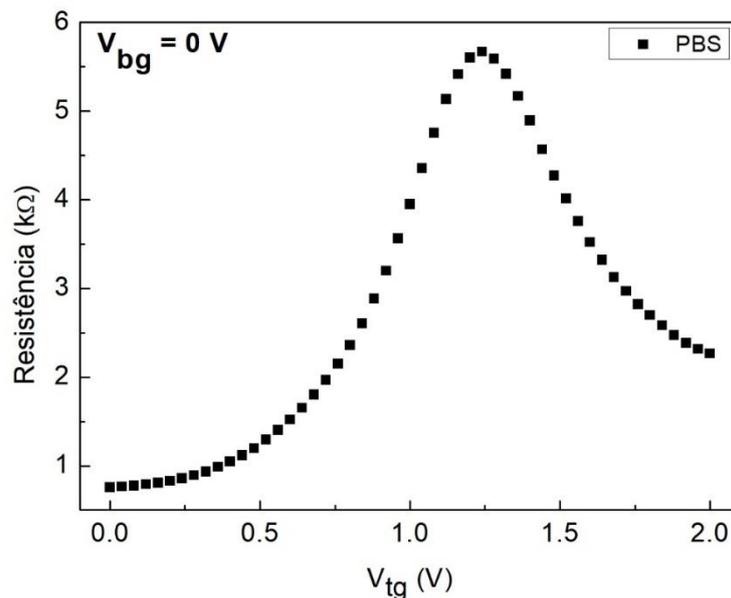


Figura 4.13: Resistência elétrica do grafeno em função da tensão de porta superior, V_{tg} , utilizando uma solução de PBS como meio dielétrico.

Essas medidas foram realizadas com a tensão de porta inferior, $V_{bg} = 0 V$. Diante desse resultado a tensão de porta superior, $V_{tg} = 1,0 V$ foi escolhida como o valor a ser fixado no restante do experimento, pois corresponde ao ponto de maior inclinação da curva $R \times V_{tg}$.

Com as tensões de porta superior e porta inferior fixadas em 1,0 V e 0 V, respectivamente, medimos a resistência elétrica do dispositivo enquanto variamos a concentração da proteína de rSVN em contato com ele. Na figura 4.14, apresentamos a os valores desta resistência em função do tempo; as setas na figura indicam o instante em que a concentração de rSVN na solução sobre o dispositivo foi alterada. Uma solução com concentração diferente era adicionada somente depois da resistência elétrica do dispositivo ficar estável. Como esperado, para uma dopagem tipo p, observa-se que a resistência do dispositivo diminui com o aumento da concentração de rSVN

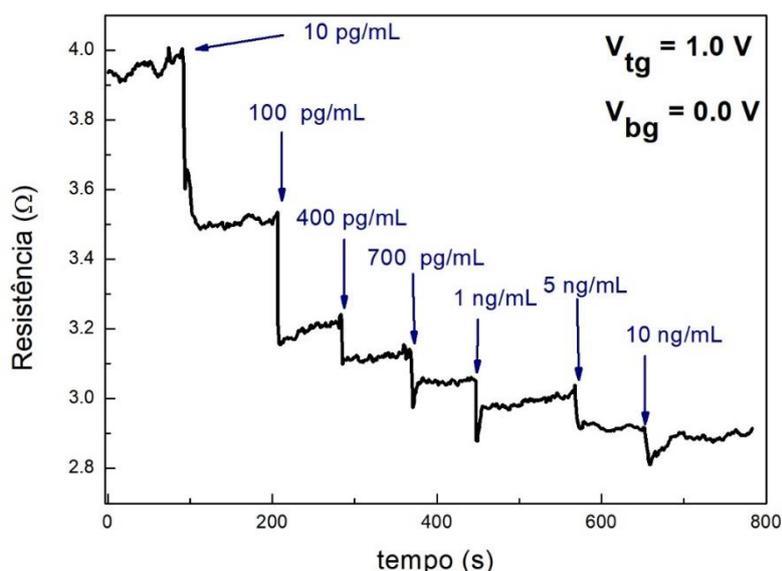


Figura 4.14: Variação da resistência com o tempo, as setas azuis indicam os instantes em que uma nova concentração de rSVN foi colocado sobre o dispositivo.

Na figura 4.15, apresentamos o valor médio da resistência elétrica do dispositivo S_3 quando em contato com cada solução de rSVN, onde observamos um comportamento de saturação do dispositivo para concentrações maiores que 1 ng/mL, essa saturação se deve ao fato de que uma solução de rSVN na concentração de 1 ng/mL é suficiente para grande parte dos anticorpos, imobilizados sobre o grafeno, se conjugarem às proteínas alvos da solução. Ao fim das medidas da resistência *versus* tempo, foi realizada uma varredura de porta superior com a solução de rSVN com concentração de 10 ng/mL sobre o dispositivo. Na inserção da figura 4.15, apresentamos essa medição junto com o da figura 4.13 feita com PBS. Fica evidenciado a dopagem tipo p do grafeno devido à interação entre os anticorpos e a adição da proteína rSVN. Esse resultado corrobora os apresentados nas figuras 4.9 e 4.11. Na inserção da figura 4.15, também estão indicados os valores da resistência, obtidos nas varreduras de porta superior, para tensão de 1,0 V, esses valores são compatíveis com os resultados obtidos para a resistência quando sobre os dispositivos estavam as soluções de PBS e de rSVN com concentração de 10 ng/mL.

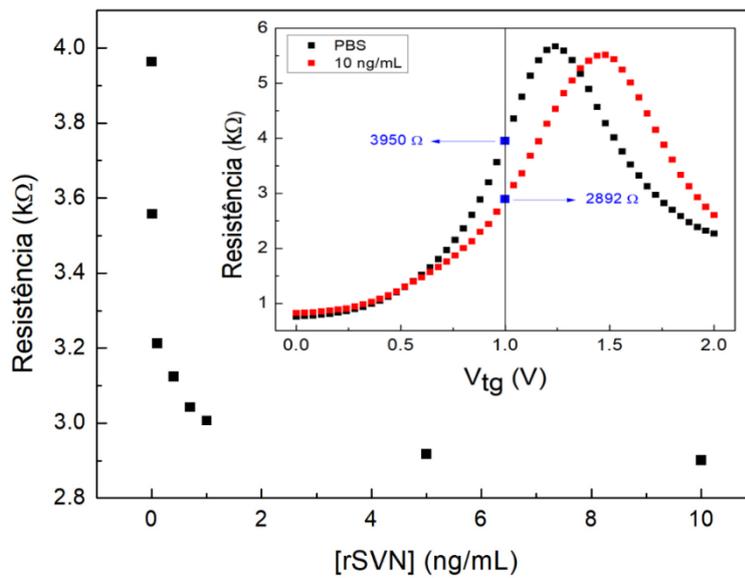


Figura 4.15: Valor médio da resistência do dispositivo em função da concentração de rSVN; a barra de erro na maioria dos valores é menor que o próprio ponto; inserção: Resistência elétrica do grafeno em função da tensão de porta superior com o dispositivo em contato com as soluções de PBS e 10 ng/mL de rSVN.

Como descrito anteriormente, apesar de todos os dispositivos que fabricamos terem sido processados da mesma forma, é comum que eles apresentem valores diferentes de resistência elétrica. No entanto, os resultados tornam-se independentes das dimensões dos dispositivos quando se analisa o desvio percentual do valor da resistência em relação ao valor medido com o dispositivo em contato com a solução de PBS (sem rSVN), ou seja, $\Delta_R = 100 \frac{R_{PBS} - R_{rSVN}}{R_{PBS}}$. Na figura 4.16, apresentamos a média dos desvios

percentuais da resistência, para três dispositivos diferentes, S₃, S₄ e S₅, em função do logaritmo da concentração de rSVN o que indica que a maior presença de rSVN propicia uma maior conjugação anticorpo-proteína, que leva a uma maior transferência de cargas para o grafeno. Na inserção da figura 4.16 é apresentado os resultados individuais dos dispositivos, S₃, S₄ e S₅, em ponto pretos, vermelhos e azuis, respectivamente.

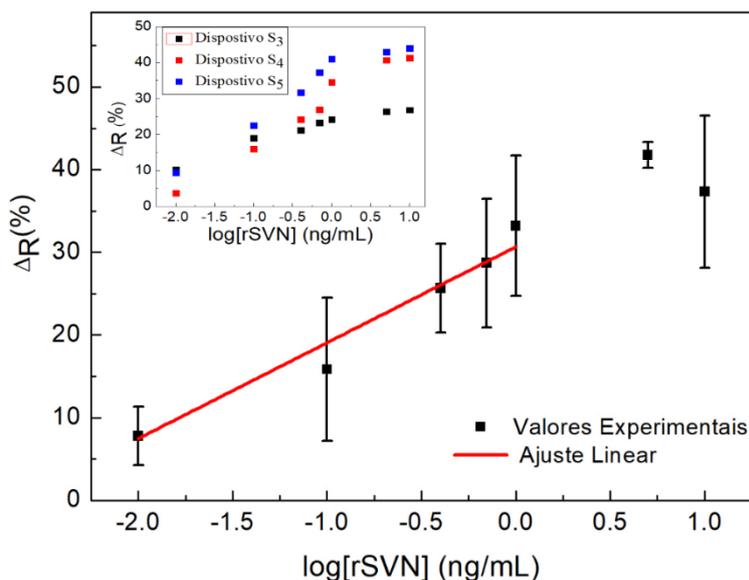


Figura 4.16: Média do desvio percentual da resistência (três dispositivos) em função do logaritmo na base 10 da concentração de rSVN. A reta vermelha representa o ajuste linear aos dados experimentais. Inserção: desvio percentual da resistência dos dispositivos S₃ (pontos pretos), S₄ (pontos vermelhos) e S₅ (pontos azuis).

Nessa figura, é observada uma faixa linear para valores de concentração entre 0,01 ng/mL e 1 ng/mL, valores maiores que 1 ng/mL foram excluídos dessa faixa devido à saturação do dispositivo. A partir do ajuste linear para esses dados (curva em vermelho), obtivemos esta curva de calibração do imunossensor $\Delta_R = (31 \pm 1) + (11,6 \pm 0,9) \log([rSVN])$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,979$. A partir desse ajuste, o valor limite de detecção desse dispositivo foi estimado em 2,13 pg/mL. Esse valor é próximo ao obtido pela metodologia da varredura de porta superior, ou seja, o limite de detecção do dispositivo é independente da metodologia adotada.

4.5 Comparação Entre as Duas Metodologias de Medidas

Nas seções 4.3 e 4.4, apresentamos duas metodologias de medidas para um imunossensor. Na primeira, para cada concentração da proteína rSVN foi realizada uma varredura de porta superior e, a partir de um modelo para a condutividade do grafeno em função da tensão de porta superior determinamos a capacitância geométrica do ISFET e a tensão de Dirac para cada concentração de rSVN. Na segunda metodologia, a tensão de porta superior no dispositivo foi mantida fixa e variou-se a concentração de rSVN na solução em contato com ele. Neste caso, obtivemos a curva de calibração do biossensor, ou seja, a curva que relaciona a variação da resistência elétrica, do dispositivo, com o logaritmo da concentração da proteína alvo presente na solução em contato com ele.

Para comparar essas duas metodologias, reescrevemos a equação (1.15) de modo a relacionar a condutividade do grafeno com a concentração de rSVN em contato com o imunossensor. Para isso, obtemos a partir dos resultados das figuras 4.9a e 4.12 as

relações da capacitância geométrica para buracos C_{DB} e a tensão de Dirac V_g^* com o logaritmo da concentração de rSVN.

Nas figuras 4.17a e 4.17b, apresentamos os mesmos valores de C_{DB} e V_{tg}^* das figuras 4.9a e 4.12, respectivamente, em função do logaritmo da concentração de rSVN. Na figura 4.17a, o ajuste linear (curva azul) para esses valores resulta em: $C_{DB} = (9,21 \pm 0,05) - (1,25 \pm 0,04) \log(C)$, em que C é a concentração de rSVN. Na figura 4.17b, o resultado do ajuste linear (curva vermelha) é dado por: $V_{tg}^* = (5,01 \pm 0,03) + (0,27 \pm 0,03) \log(C)$.

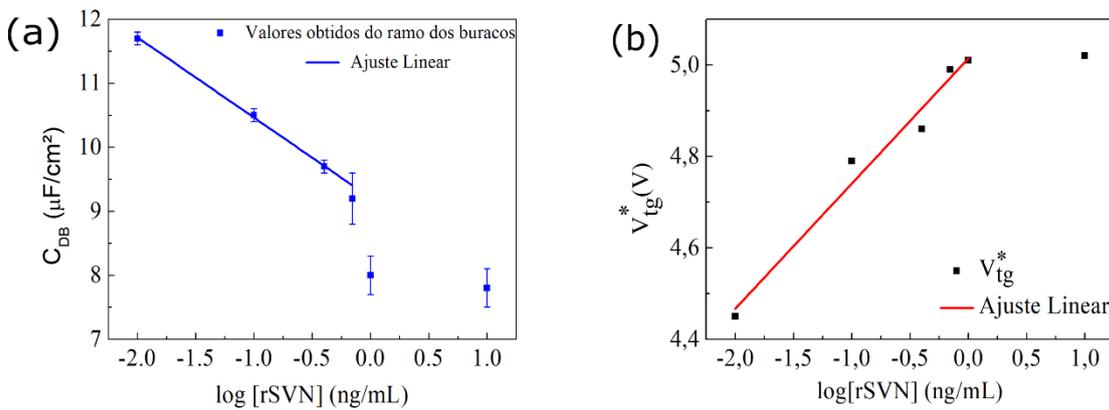


Figura 4.17: (a) Valores da capacitância geométrica, para o ramo dos buracos, obtidas dos ajustes, em função da concentração de rSVN. A curva azul representa o ajuste linear aos dados experimentais. (b) Tensão de Dirac em função da concentração de rSVN. A curva vermelha representa o ajuste linear aos dados experimentais

Substituindo essas duas funções na equação (1.15), obtemos uma relação entre a condutividade do grafeno e o logaritmo da concentração de rSVN. Utilizando os valores de concentração rSVN usados nesse trabalho (0 ng/mL , 0,01 ng/mL , 0,1 ng/mL , 0,4 ng/mL , 0,7 ng/mL , 1 ng/mL , 5 ng/mL e 10 ng/mL), obtivemos o gráfico do desvio percentual da resistência ($R \sim 1/\sigma$) em função do logaritmo da concentração de rSVN. O resultado obtido (pontos verdes) é apresentado na figura 4.18 junto com os valores (pontos pretos) obtidos experimentalmente (figura 4.16).

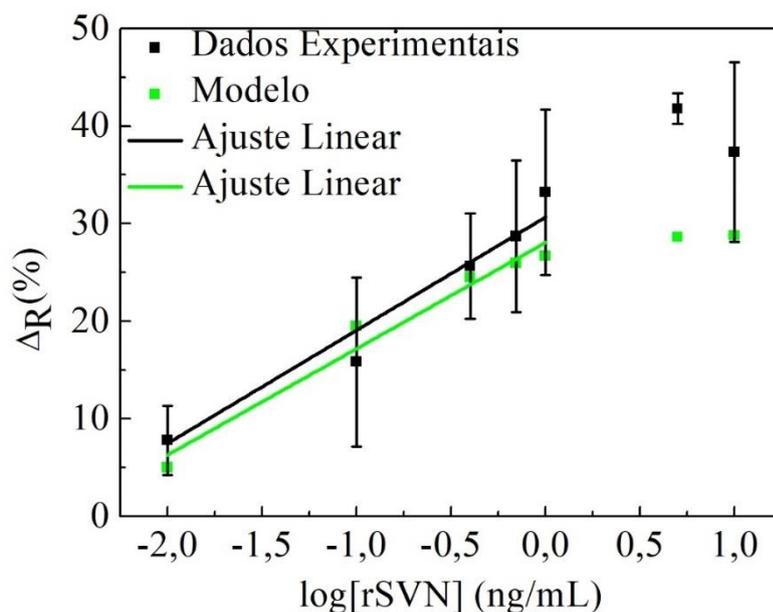


Figura 4.18: Comparação entre os valores obtidos experimentalmente (pontos e reta preta e os valores obtidos a partir da modelagem (pontos e reta verde).

Podemos observar na figura 4.18, que as inclinações dos ajustes lineares têm valores aproximados. O ajuste do modelo (curva verde) possui uma inclinação de aproximadamente 11,0% por década de concentração, enquanto o ajuste dos dados experimentais (curva preta) apresenta uma inclinação de aproximadamente 11,6% por década de concentração. Esse resultado demonstra a equivalência entre as duas metodologias utilizadas nas medições e corrobora com a comprovação da análise qualitativa do funcionamento de um imunossensor com base em grafeno.

5 Imunossensor de rCV-N

Neste capítulo, apresentaremos os resultados referentes à calibração de um imunossensor para a proteína rCV-N. A partir da curva de calibração do imunossensor, serão determinados a faixa de comportamento linear e o valor limite de detecção do dispositivo. Por fim, mostraremos o caráter seletivo dos imunossensores de rCV-N até mesmo para soluções complexas. Os procedimentos e análises descritos neste capítulo foram repetidos para três dispositivos.

5.1 Calibração do Imunossensor de rCV-N

Na Fig. 5.1 está mostrada a varredura da tensão de porta superior enquanto era medido o valor da resistência elétrica do dispositivo C_3 em contato com a solução de PBS. Como observado antes, na presença de PBS o grafeno apresenta dopagem do tipo p.

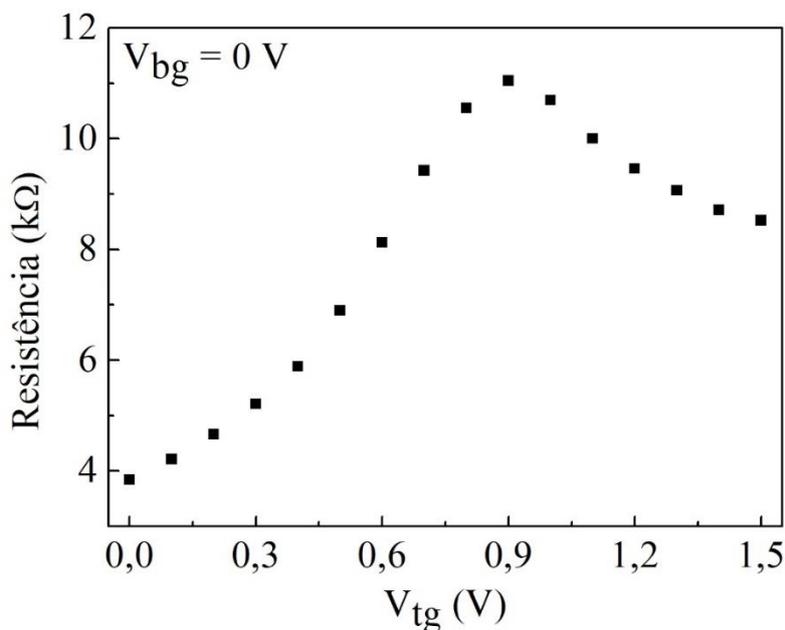


Figura 5.1: Resistência em função da tensão de porta superior (V_{tg}), com a solução de PBS sobre o dispositivo. Observamos que valores positivos de V_{tg} implicam em uma dopagem no grafeno do tipo p. A barra de erro de cada valor é menor que o próprio ponto.

Realizamos medidas da resistência elétrica do dispositivo em função do tempo, enquanto colocávamos sobre ele uma solução de rCV-N de concentração conhecida. A primeira solução colocada sobre o dispositivo foi uma solução tampão de PBS. Uma vez que a resistência do dispositivo se estabilizava, adicionávamos outra gota de solução com uma concentração de rCV-N maior que a anterior. Na figura 5.2, apresentamos o resultado dessa medida, onde as setas azuis indicam os instantes em que uma nova solução de rCV-N com a concentração indicada era adicionada. As sucessivas mudanças no valor da resistência são atribuídas ao aumento do número de ligações entre as proteínas e os anticorpos, de acordo com o mecanismo descrito na seção 1.3.

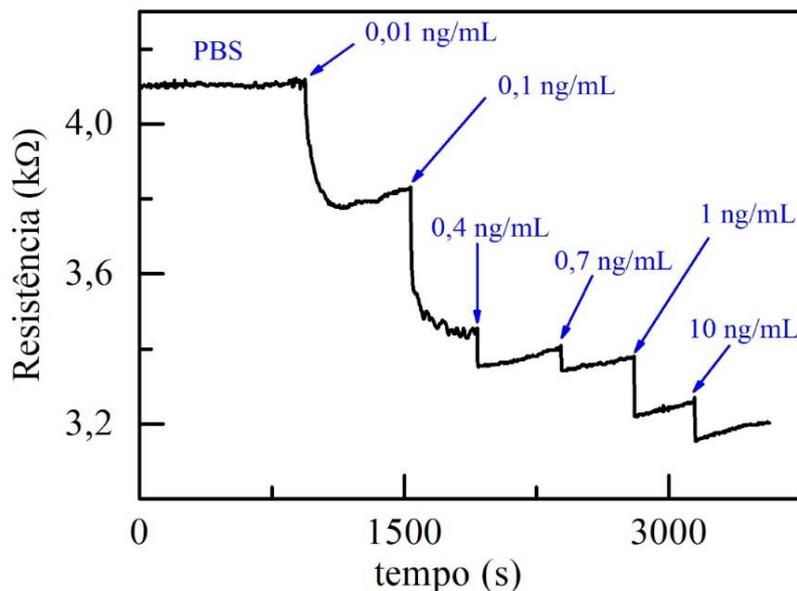


Figura 5.2: Variação da resistência com o tempo, as linhas azuis indicam o instante em que uma nova concentração de rCV-N foi colocada sobre o imunossensor.

Na figura 5.3, estão plotados os valores das resistências, medidas nos dois minutos antes de se mudar a concentração de rCV-N, em função da concentração de rCV-N. Nessa apresentação, observamos a estabilidade da resistência do dispositivo antes da aplicação de uma nova solução com maior concentração de rCV-N. Sobre cada platô indicamos a concentração de rCV-N da solução sobre o dispositivo naquele instante. A diminuição na resistência indica uma dopagem do tipo p no grafeno, devido à interação anticorpo-antígeno. Na inserção da figura 5.3, apresentamos o desvio percentual da resistência de cada platô em relação ao valor medido com o dispositivo em contato com a solução de PBS (sem rCV-N), ou seja, $\Delta_R = 100 \frac{R_{PBS} - R_{rCV-N}}{R_{PBS}}$, em função da concentração de rCV-N. Notamos nesse resultado um comportamento de saturação do dispositivo para concentrações maiores que 1 ng/mL. Essa saturação é explicada pelo fato de que uma solução de rCV-N na concentração de 1 ng/mL seja suficiente para se ligar a grande parte dos anticorpos imobilizados sobre o dispositivo.

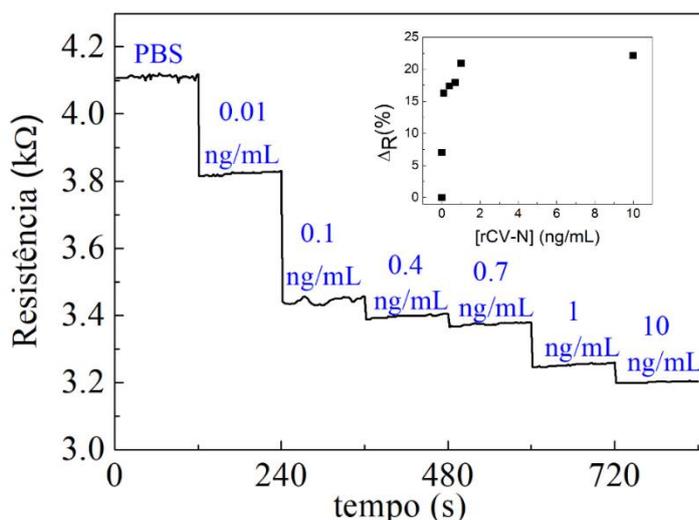


Figura 5.3: Resistência nos últimos dois minutos antes de se mudar a concentração de rCV-N sobre o dispositivo. Sobre cada platô está indicada a concentração da solução em questão. Inserção: Desvio percentual da resistência em função da concentração de rCV-N

Essas medições foram repetidas para três diferentes dispositivos, C₃, C₄ e C₅, na figura 5.4, apresentamos a média do desvio percentual da resistência, desses três dispositivos, em função do logaritmo da concentração de rCV-N. Notamos um aumento no desvio percentual da resistência com o aumento da concentração de rCV-N, que indica que a maior presença de rCV-N propicia uma maior conjugação anticorpo- proteína, que leva a uma maior transferência de cargas para o grafeno. As barras de erro são os desvios padrões das médias. Na inserção da figura 5.3 é apresentado os resultados individuais dos dispositivos, C₃, C₄ e C₅, em ponto pretos, vermelhos e azuis, respectivamente.

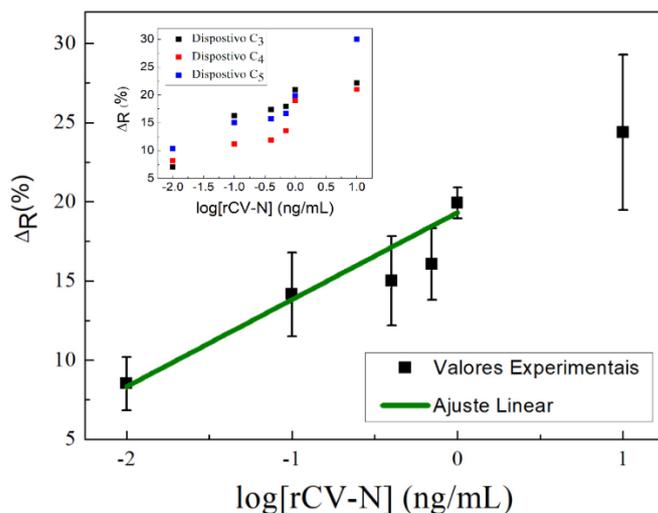


Figura 5.4: Desvio percentual da resistência em função do logaritmo da concentração de rCV-N; os pontos são a média dos valores obtidos experimentalmente para cada concentração e a linha verde é o ajuste linear entre o desvio percentual da resistência e o logaritmo da concentração de rCV-N. Inserção: desvio percentual da resistência dos dispositivos C₃ (pontos pretos), C₄ (pontos vermelhos) e C₅ (pontos azuis).

A partir do ajuste linear (curva verde) do resultado apresentado na figura 5.4, obtivemos a curva de calibração para o imunossensor de rCV-N, dada por $\Delta R = (19,3 \pm 0,6) + (5,5 \pm 0,6) \log([rCV-N])$, com um coeficiente de correlação de 0,93 para uma faixa detectável de 0,01 ng/mL até 1 ng/mL. O limite de detecção, C_L , para essas medidas foi estimado em 0,45 pg/mL (40,9 fM) [97]. Esse valor de C_L é muito menor que o obtido (usando aproximação similar) com outros imunossensores com base em grafeno, para outras proteínas [50,51,129,130], cujos os valores eram da ordem de ng/mL.

Com a solução de 10 ng/mL de rCV-N em contato com o imunossensor, medimos a resistência do dispositivo C_3 em função da tensão de porta superior. Esse resultado está mostrado na figura 5.5 (curva em vermelho) junto com os resultados da figura 5.1 para o PBS (curva preta). Como discutido antes, a presença de rCV-N desloca a curva para maiores valores de V_{tg} , o que caracteriza uma dopagem do tipo p devido à interação anticorpo-antígeno.

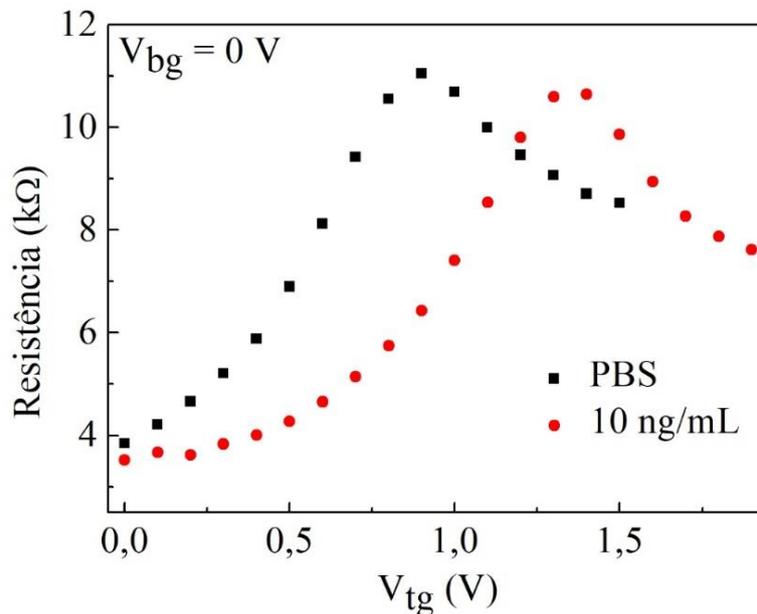


Figura 5.5: Resistência em função da tensão de porta superior (V_{tg}), para solução de 10 ng/mL de rCV-N (pontos vermelhos) e para a solução de PBS (pontos pretos) sobre o dispositivo.

5.2 Teste de Reprodutibilidade

Para avaliar a reprodutibilidade dos imunossensor com base em grafeno, uma solução com concentração de 0,01 ng/mL de rCV-N foi colocada sobre quatro diferentes dispositivos, C_6 , C_7 , C_8 e C_9 . O desvio percentual da resistência desses dispositivos, mostrados na figura 5.6, apresentam um desvio padrão relativo de 7,9%, o que indica uma boa reprodutibilidade do imunossensor.

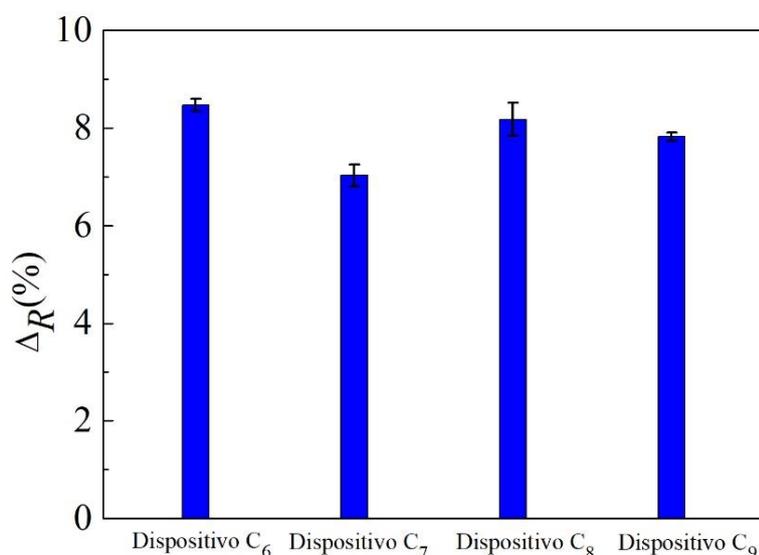


Figura 5.6: Desvio percentual da resistência medida para quatro imunossensores em contato com a solução de 0,01 ng/mL de rCV-N. As barras de erro representam o desvio padrão das medidas.

5.3 Detecção de rCV-N em Soluções Biológicas Complexas

Os resultados apresentados na seção 3.4 demonstram uma boa seletividade do imunossensor de rCV-N e os resultados apresentados nesse capítulo demonstram uma boa sensibilidade do dispositivo. Observamos que o imunossensor desenvolvido é também muito seletivo à rCV-N em extratos de proteínas solúveis provenientes de sementes de soja que foram geneticamente modificadas para expressar a rCV-N [104].

Nesta etapa do estudo, fizemos medições com soluções preparadas com base nos quatro extratos de proteínas cujos processos de obtenção foram explicados na seção 2.4. Esses quatro extratos, dois provenientes de sementes de soja que expressam rCV-N, ETP+ e ESP+ e dois de soja controle que não foram modificadas geneticamente, ETPC e ESPC, foram diluídos em PBS formando soluções contendo frações entre 1 e 50 partes por milhão (ppm) dos extratos matrizes.

Com essas soluções, fizemos medições análogas às apresentadas na seção 5.1, em que variamos a concentração dessas soluções sobre os dispositivos. Na figura 5.7a, estão plotados os valores das resistências do dispositivo C₁₀, medidas no último minuto antes de se mudar a concentração de ETP+, em função da concentração de rCV-N. Sobre cada platô está indicado a diluição do extrato sobre o dispositivo naquele instante, sendo o valor em vermelho referente à diluição de 50 ppm do ETPC.

A diminuição na resistência é consequência da interação dos anticorpos imobilizados sobre o dispositivo e a rCV-N presente nas soluções de ETP+, como explicado na seção 5.1. Utilizando o dispositivo C₁₁, obtivemos um resultado semelhante utilizando as soluções de ESP+, esse resultado é apresentado na figura 5.7b, em que sobre cada platô está indicada a diluição do ESP+ sobre o dispositivo naquele instante e o valor em vermelho refere-se à diluição de 50 ppm do ESPC. Nas inserções das figuras 5.7a e 5.7b, estão os resultados do desvio percentual da resistência em $\Delta_R = 100 \frac{R_{PBS} - R_C}{R_{PBS}}$, dos

dispositivos, em função a diluição do ETP+ e ESP+. Em ambos os casos observamos um comportamento de saturação para as soluções com diluição maiores que 10 ppm. Com esses resultados, certificamos que os imunossensores para rCV-N possibilitam estimar a concentração da proteína -alvo presente em soluções complexas.

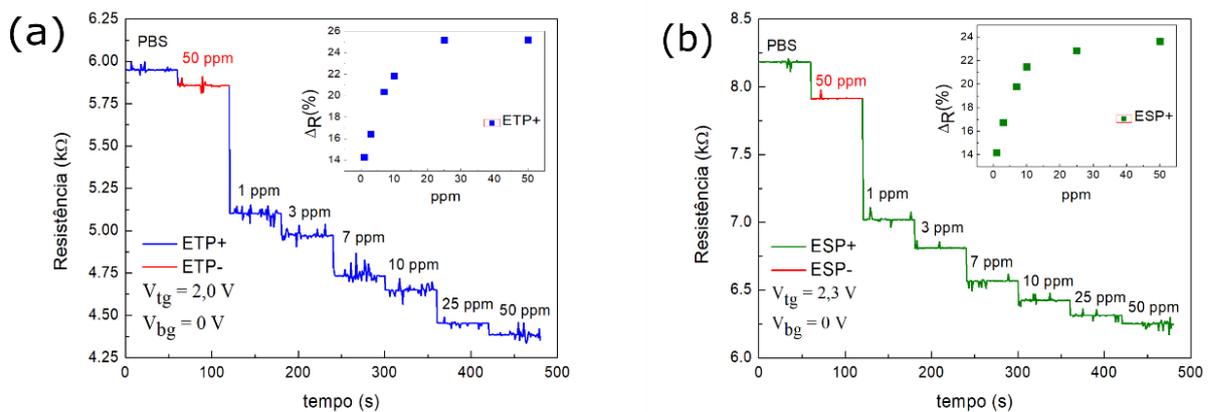


Figura 5.7: Resistência no último minuto antes de se mudar a concentração de (a) ETP+ e (b) ESP+ sobre o dispositivo. Sobre cada platô está indicada a concentração da diluição em questão. Inserções: Desvio percentual da resistência em função da concentração de (a) ETP+ e (b) ESP+.

Na figura 5.8, estão os resultados do desvio percentual da resistência, dos dispositivos C₁₀ e C₁₁, em função do logaritmo da diluição do ETP+ (figura 5.8a) e do ESP+ (figura 5.8b). As retas são ajustes lineares dadas por $\Delta_R(\%) = (13,8 \pm 0,8) + (8 \pm 1) \log(\text{ppm})$, para o ETP+ e $\Delta_R(\%) = (13,9 \pm 0,5) + (7,2 \pm 0,8) \log(\text{ppm})$, para o ESP+, com coeficientes de correlação de 0,94 e 0,97, respectivamente, para a faixa de 1 ppm a 10 ppm, essa faixa foi a escolhida devido à saturação dos dispositivos para concentrações maiores que 10 ppm. Utilizando a curva de calibração obtida na seção 5.1 para imunossensores de rCV-N, para as diluições nas faixas lineares dos resultados apresentados nessa seção (1 ppm, 3 ppm, 7 pmm e 10 ppm), estimamos a concentração de rCV-N, nas matrizes de ETP+ e ESP+, em $(18 \pm 8) \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ para o ETP+ e $(16 \pm 6) \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ para o ESP+.

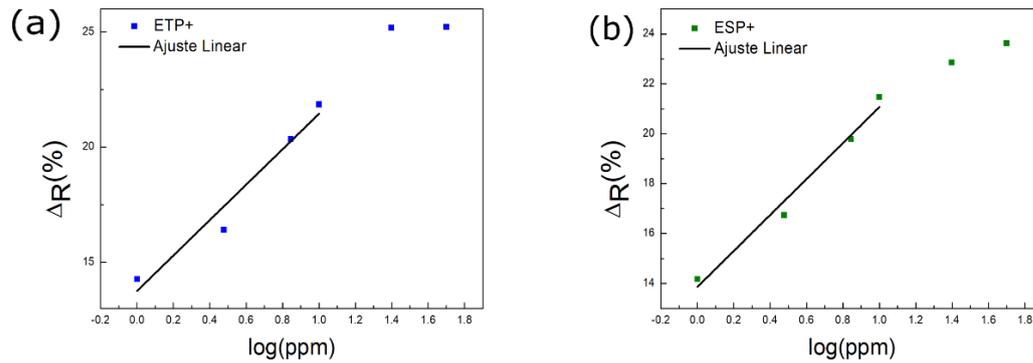


Figura 5.8: Desvio percentual da resistência em função do logaritmo das diluições (a) ETP+ e (b) ESP+. As linhas são os ajustes lineares entre o desvio percentual da resistência e o logaritmo das diluições.

A Figura 5.9a, apresenta a variação percentual da resistência do dispositivo C_{10} em contato com 50 ppm de ETPC (barra vermelha) e em contato 1 ppm de ETP+ (barra azul). Observamos, nesse resultado, que a presença de rCV-N na solução sobre o dispositivo resulta em uma variação 16,5 vezes maior que a variação gerada pela solução sem rCV-N. Na figura 5.9b, apresentamos o resultado, do dispositivo, C_{11} , para a solução semi-purificada e observamos que a variação para a solução de 1 ppm de ESP+ (barra verde) é 4,4 vezes maior que a variação para a solução de 50 ppm de ESPC (barra vermelha). Esses resultados corroboram para o fato que os imunossensores desenvolvidos neste estudo são seletivos para rCV-N, provenientes das sementes de soja geneticamente modificadas, presentes em soluções complexas.

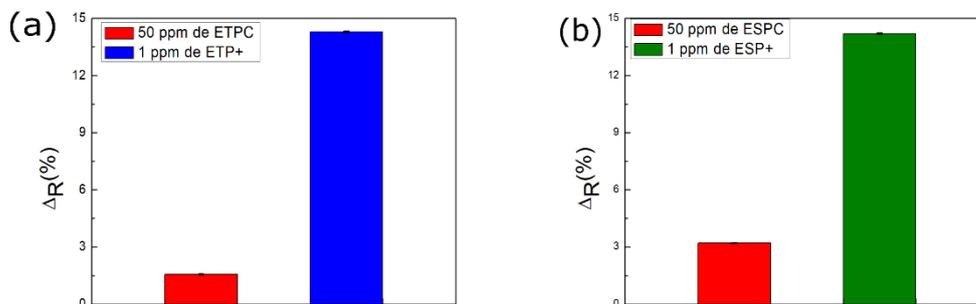


Figura 5.9: Variação percentual da resistência do dispositivo quando a solução sobre dispositivo é uma diluição do extrato sem rCV-N (barras vermelhas) e (a) com 1 ppm do ETP+ (barra azul) ou (b) com 1 ppm do ESPC (barra verde).

Os resultados, apresentados nessa seção, são de grande importância no auxílio ao avanço da tecnologia de produção de proteínas recombinantes a partir de sistemas vegetais, como o desenvolvido pela EMBRAPA para as sementes de soja que expressam a rCV-N. Atualmente proteínas recombinantes podem ser identificadas e/ou quantificadas por técnicas como cromatografia, ensaio de imunoabsorção enzimática e *western blot*. Entretanto, essas técnicas apresentam desvantagens tais como alto custo de execução, análises que demandam muito tempo, alta possibilidade de resultados falsos positivos ou negativos [131,132]. Em contrapartida, o imunossensor apresentado nesse estudo foi capaz de detectar e quantificar, em soluções não totalmente purificadas, uma proteína proveniente de sementes de sojas geneticamente modificadas. Desta forma, esses dispositivos se apresentam como alternativa para análises qualitativas e quantitativas de sistemas de expressão de proteínas em plantas.

6 Conclusão

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que em 2021 cerca de 38,4 milhões de pessoas, em todo o mundo, viviam com HIV, sendo que 1,5 milhões de pessoas foram infectadas em 2021, um aumento de, aproximadamente, 4% no número de infectados. A OMS espera que 2030 o número de novos infectados caia para 200 mil. Para se alcançar esse objetivo é de fundamental importância o desenvolvimento de novos métodos de inibição da transmissão do HIV, em adição aos métodos preventivos atuais. Estudos demonstram que proteínas recombinantes como Cianovirina-N (rCV-N), Sictovirina (rSVN) e Grifitissina (rGRFT) são capazes de inibir diferentes estirpes de HIV.

Neste trabalho, apresentamos o desenvolvimento de biossensores com base em grafeno, obtido por meio da técnica de clivagem micromecânica, capazes de detectar a interação anticorpo-antígeno. A ligação entre o anticorpo e o antígeno é denominado complexo imune. Devido a isso, biossensores capazes de detectar a formação dos complexos imunes são chamados de imunossensores. Os dispositivos foram fabricados por meio de técnica de litografia óptica, em uma geometria conhecida como transistor de efeito de campo seletivo a íon (ISFET, acrônimo do inglês *ion-sensitive field-effect transistor*). Foram fabricados três tipos de imunossensores capazes de detectar rCV-N, rSVN e rGRFT, que são proteínas capazes de inibir diferentes estirpes de HIV, vírus da imunodeficiência símia e outras doenças viróticas.

Com o intuito de tornar os biossensores seletivos aos materiais de interesse, suas superfícies foram funcionalizadas. Essa funcionalização consistiu em imobilizar, sobre a superfície do grafeno, anticorpos específicos às proteínas alvo. A imobilização dos anticorpos sobre o grafeno foi intermediada pela molécula éster succinimidílico do ácido 1-pireno butanoico (PBSE), a qual se liga ao grafeno via uma interação π - π e aos anticorpos por meio do seu grupo amina. A partir de medidas Raman, demonstramos que o processo de funcionalização não afeta as propriedades eletrônicas do grafeno.

Analizamos o comportamento seletivo dos imunossensores desenvolvidos e demonstramos que o contato de soluções contendo a proteína alvo dos imunossensores provocam sinais até 30 vezes maior que os sinais provocados por soluções sem a proteína alvo. Demonstramos que a geometria dos dispositivos desenvolvidos não afeta na análise dos sinais obtidos.

Desenvolvemos um modelo para explicar o funcionamento de um imunossensor estruturado como um ISFET, no qual é proposto que efeitos capacitivos são responsáveis pela geração de sinais. Propomos que a formação do complexo imune altera a quantidade e/ou redistribui as cargas na proximidade do grafeno. A partir de medidas de varredura de tensão de *porta superior*, fomos capazes de estimar valores para a capacitância dos ISFET e os valores obtidos indicaram que a formação do complexo imune diminui a capacitância total do dispositivo. A partir de medidas de Efeito Hall demonstramos que os valores estimados pelo modelo representam bem a realidade do dispositivo.

Além de modelar o mecanismo de funcionamento de um imunossensor, a partir de medidas de resistência elétrica dos dispositivos, fomos capazes de determinar parâmetros importantes para a aplicabilidade dele. Para o imunossensor de rSVN obtivemos um regime linear para concentrações entre 0,01 ng/mL e 1 ng/mL com um limite de detecção de 2,13 pg/mL. Para o imunossensor de rCV-N a faixa linear foi de 0,01 ng/mL até 10 ng/mL, com um limite de detecção estimado 0,45 pg/mL. Este resultado demonstrou a boa sensibilidade do imunossensor desenvolvido.

Utilizando o imunossensor de rCV-N, mostramos a capacidade do dispositivo desenvolvido em detectar a proteína alvo mesmo em soluções complexas. Obtivemos sinais consideravelmente mais intensos em soluções provenientes de extratos de proteínas, totais e semi-purificados, de soja expressando rCV-N que os sinais obtidos a partir de soluções de extratos provenientes de soja que não expressa a rCV-N. Este resultado demonstrou a boa seletividade do imunossensor desenvolvido e possibilitou estimar a concentração de rCV-N nos extratos de proteína total $(18 \pm 8) \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e semi-purificado $(16 \pm 6) \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Avaliamos como positivo os resultados obtidos neste estudo, destacando dois pontos de grande valor: o primeiro destaque é a importância do desenvolvimento de trabalhos de ciência aplicada para que possibilite solucionar problemas do cotidiano; o segundo ponto é extraordinária experiência de se desenvolver um projeto em parceria, neste caso com o grupo de biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de Brasília/DF.

Por fim, o conhecimento adquirido com esse estudo possibilitará um maior controle na produção de soja expressando microbicidas. Esse controle, por sua vez, permitirá o desenvolvimento de produtos a serem utilizados na inibição da transmissão do HIV, o que ajudará a OMS alcançar os objetivos traçados contra a transmissão e em favor da extinção do HIV entre humanos.

Bibliografia

- [1] P.M. Sharp, B.H. Hahn, Origins of HIV and the AIDS pandemic, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1 (2011) 1–22.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>.
- [2] U. Global, A. Update, the Path That Ends, (2023) 196.
- [3] UNAIDS, Political declaration on HIV and AIDS: Ending inequalities and getting on track to end AIDS by 2030. United Nations General Assembly. UNAIDS. 2021., Un aids. (2021) 1–28.
https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2021_political-declaration-on-hiv-and-aids_en.pdf.
- [4] P. Mehrotra, Biosensors and their applications - A review, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- [5] C. Fan, K.W. Plaxco, A.J. Heeger, Biosensors based on binding-modulated donor-acceptor distances, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 186–192.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.02.005>.
- [6] R. Monošík, M. Stred’anský, E. Šturdík, Biosensors - classification, characterization and new trends, *Acta Chim. Slovaca.* 5 (2012) 109–120.
<https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>.
- [7] J. Ali, J. Najeeb, M. Asim Ali, M. Farhan Aslam, A. Raza, Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review, *J. Biosens. Bioelectron.* 08 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000235>.
- [8] S. Chen, M.H. Shamsi, Biosensors-on-chip: A topical review, *J. Micromechanics Microengineering.* 27 (2017) aa7117. <https://doi.org/10.1088/1361-6439/aa7117>.
- [9] A.P.F. Turner, Biosensors: Sense and sensibility, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3184–3196. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>.
- [10] M. MEHRVAR, M. ABDI, Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Anal. Sci.* 20 (2004) 1113–1126.
<https://doi.org/10.2116/analsci.20.1113>.
- [11] F. Mollarasouli, S. Kurbanoglu, S.A. Ozkan, The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis, *Biosensors.* 9 (2019) 1–19.
<https://doi.org/10.3390/bios9030086>.
- [12] M.L. Chiu, D.R. Goulet, A. Teplyakov, G.L. Gilliland, Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics, *Antibodies.* 8 (2019).
<https://doi.org/10.3390/antib8040055>.
- [13] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5th editio, W H Freeman, New York, 2002.
- [14] C.J. van Oss, R.J. Good, M.K. Chaudhury, Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: Optimal conditions for association and dissociation, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 376 (1986) 111–119.

- [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)80828-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)80828-2).
- [15] P.L. Truong, Y. Yin, D. Lee, S.H. Ko, Advancement in COVID-19 detection using nanomaterial-based biosensors, *Exploration*. 3 (2023). <https://doi.org/10.1002/exp.20210232>.
- [16] G. Yang, S.N. Velgos, S.P. Boddapati, M.R. Sierks, Probing Antibody- Antigen Interactions, (2014). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0010-2013.Correspondence>.
- [17] I. Sela-Culang, V. Kunik, Y. Ofran, The structural basis of antibody-antigen recognition, *Front. Immunol.* 4 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00302>.
- [18] M.S. Jr Charles A Janeway, Charles Janeway, Charles A Janeway Jr, Paul Travers, Mark Walport, Mark Schlomchik, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th ed., Garland Science, 2001.
- [19] J.J. Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A., Valdes, *Biosensor Recognition Elements*, (2005) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.007>.
- [20] Y. Wang, H. Xu, J. Zhang, G. Li, Electrochemical sensors for clinic analysis, *Sensors*. 8 (2008) 2043–2081. <https://doi.org/10.3390/s8042043>.
- [21] N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, Review Electrochemical Sensors : A Powerful Tool in Analytical Chemistry, *J.Braz.Chem.Aoc.* 14 (2003) 159–173. <https://doi.org/doi:10.1590/S0103-50532003000200003>.
- [22] M. Yuqing, G. Jianguo, C. Jianrong, Ion sensitive field effect transducer-based biosensors, *Biotechnol. Adv.* 21 (2003) 527–534. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00103-4).
- [23] S. Cao, P. Sun, G. Xiao, Q. Tang, X. Sun, H. Zhao, S. Zhao, H. Lu, Z. Yue, ISFET-based sensors for (bio)chemical applications: A review, *Electrochem. Sci. Adv.* (2022) 1–25. <https://doi.org/10.1002/elsa.202100207>.
- [24] R.G. and D.M. SAITO, A. Jorio, DRESSELHAUS, Part One Materials Science and Raman Spectroscopy Background The sp² Nanocarbons : Prototypes for Nanoscience and Nanotechnology, (2011).
- [25] M.J. Allen, V.C. Tung, R.B. Kaner, Honeycomb carbon: A review of graphene, *Chem. Rev.* 110 (2010) 132–145. <https://doi.org/10.1021/cr900070d>.
- [26] K.N. Andre Geim, The Rise of Graphene, *Nat. Mater.* 6 (2007) 1–14.
- [27] B. Guo, L. Fang, B. Zhang, J.R. Gong, Graphene Doping: A Review, *Insciences J.* 1 (2011) 80–89. <https://doi.org/10.5640/insc.010280>.
- [28] S. Das Sarma, S. Adam, E.H. Hwang, E. Rossi, Electronic transport in two-dimensional graphene, *Rev. Mod. Phys.* 83 (2011) 407–470. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.83.407>.
- [29] F. Schedin, A.K. Geim, S. V. Morozov, E.W. Hill, P. Blake, M.I. Katsnelson, K.S. Novoselov, Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene, *Nat. Mater.* 6 (2007) 652–655. <https://doi.org/10.1038/nmat1967>.
- [30] S. He, B. Song, D. Li, C. Zhu, W. Qi, Y. Wen, L. Wang, S. Song, H. Fang, C.

- Fan, A graphene nanoprobe for rapid, sensitive, and multicolor fluorescent DNA analysis, *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 453–459.
<https://doi.org/10.1002/adfm.200901639>.
- [31] H. Jang, Y.K. Kim, H.M. Kwon, W.S. Yeo, D.E. Kim, D.H. Min, A graphene-based platform for the assay of duplex-DNA unwinding by helicase, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49 (2010) 5703–5707. <https://doi.org/10.1002/anie.201001332>.
- [32] S. Manochehry, M. Liu, D. Chang, Y. Li, Optical biosensors utilizing graphene and functional DNA molecules, *J. Mater. Res.* 32 (2017) 2973–2983.
<https://doi.org/10.1557/jmr.2017.103>.
- [33] J. Kong, J.T. Robinson, F.K. Perkins, E.S. Snow, Z. Wei, P.E. Sheehan, P.K. Ang, W. Chen, A.T.S. Wee, K.P. Loh, F. Schedin, A.K. Geim, S. V Morozov, E.W. Hill, P. Blake, M.I. Katsnelson, K.S. Novoselov, N. Mohanty, V. Berry, R.S. Swathi, K.L. Sebastiania, Graphene Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for the Thrombin Detection, *Anal. Chem.* 8 (2007) 2341–2346. <https://doi.org/10.1021/ac9025384>.
- [34] C.H. Lu, J. Li, M.H. Lin, Y.W. Wang, H.H. Yang, X. Chen, G.N. Chen, Amplified aptamer-based assay through catalytic recycling of the analyte, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 49 (2010) 8454–8457.
<https://doi.org/10.1002/anie.201002822>.
- [35] W.S. Jiang, W. Xin, S. Xun, S.N. Chen, X.G. Gao, Z.B. Liu, J.G. Tian, Reduced graphene oxide-based optical sensor for detecting specific protein, *Sensors Actuators, B Chem.* 249 (2017) 142–148.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.03.175>.
- [36] P. Suvarnaphaet, S. Pechprasarn, Graphene-based materials for biosensors: A review, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017). <https://doi.org/10.3390/s17102161>.
- [37] C.G. Siontorou, K.N. Georgopoulos, G.P. Nikoleli, D.P. Nikolelis, S.K. Karapetis, S. Bratakou, Protein-based graphene biosensors: Optimizing artificial chemoreception in bilayer lipid membranes, *Membranes (Basel)*. 6 (2016) 1–11.
<https://doi.org/10.3390/membranes6030043>.
- [38] M. Pilo, R. Farre, J.I. Lachowicz, E. Masolo, A. Panzanelli, G. Sanna, N. Senes, A. Sobral, N. Spano, Design of Amperometric Biosensors for the Detection of Glucose Prepared by Immobilization of Glucose Oxidase on Conducting (Poly)Thiophene Films, *J. Anal. Methods Chem.* 2018 (2018).
<https://doi.org/10.1155/2018/1849439>.
- [39] Z. Liu, Y. Guo, C. Dong, A high performance nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on polyvinylpyrrolidone-graphene nanosheets-nickel nanoparticles-chitosan nanocomposite, *Talanta*. 137 (2015) 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.037>.
- [40] L. Klukova, J. Filip, S. Belicky, A. Vikartovska, J. Tkac, Graphene oxide-based electrochemical label-free detection of glycoproteins down to aM level using a lectin biosensor, *Analyst*. 141 (2016) 4278–4282.
<https://doi.org/10.1039/c6an00793g>.
- [41] L. Wang, A. Wu, G. Wei, Graphene-based aptasensors: From molecule-interface interactions to sensor design and biomedical diagnostics, *Analyst*. 143 (2018)

- 1526–1543. <https://doi.org/10.1039/c8an00081f>.
- [42] Y. Ohno, K. Maehashi, K. Matsumoto, Label-free biosensors based on aptamer-modified graphene field-effect transistors, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 18012–18013. <https://doi.org/10.1021/ja108127r>.
- [43] Y. Guo, Y. Guo, C. Dong, Ultrasensitive and label-free electrochemical DNA biosensor based on water-soluble electroactive dye azophloxine-functionalized graphene nanosheets, *Electrochim. Acta.* 113 (2013) 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.09.039>.
- [44] Y. Hu, F. Li, D. Han, T. Wu, Q. Zhang, L. Niu, Y. Bao, Simple and label-free electrochemical assay for signal-on DNA hybridization directly at undecorated graphene oxide, *Anal. Chim. Acta.* 753 (2012) 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.09.038>.
- [45] Y. Ohno, K. Maehashi, Y. Yamashiro, K. Matsumoto, Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistors for Detecting pH and Protein Adsorption, *Nano Lett.* 9 (2009) 3322.
- [46] E. Akbari, A. Nikoukar, Z. Buntat, A. Afroozeh, A. Zeinalinezhad, Escherichia coli bacteria detection by using graphene-based biosensor, *IET Nanobiotechnology.* 9 (2015) 273–279. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0010>.
- [47] N. Mohanty, V. Berry, Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: Interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents, *Nano Lett.* 8 (2008) 4469–4476. <https://doi.org/10.1021/nl802412n>.
- [48] Y. Huang, X. Dong, Y. Liu, L.-J. Li, P. Chen, Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 12358. <https://doi.org/10.1039/c1jm11436k>.
- [49] Y. Chen, R. Ren, H. Pu, X. Guo, J. Chang, G. Zhou, S. Mao, M. Kron, J. Chen, Field-Effect Transistor Biosensor for Rapid Detection of Ebola Antigen, *Sci. Rep.* 7 (2017) 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11387-7>.
- [50] L. Zhou, H. Mao, C. Wu, L. Tang, Z. Wu, H. Sun, H. Zhang, H. Zhou, C. Jia, Q. Jin, X. Chen, J. Zhao, Label-free graphene biosensor targeting cancer molecules based on non-covalent modification, *Biosens. Bioelectron.* 87 (2017) 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.025>.
- [51] S. Afsahi, M.B. Lerner, J.M. Goldstein, J. Lee, X. Tang, D.A. Bagarozzi, D. Pan, L. Locascio, A. Walker, F. Barron, B.R. Goldsmith, Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection, *Biosens. Bioelectron.* 100 (2018) 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.051>.
- [52] Y. Wang, Y. Zhang, D. Wu, H. Ma, X. Pang, D. Fan, Q. Wei, B. Du, Ultrasensitive Label-free Electrochemical Immunosensor based on Multifunctionalized Graphene Nanocomposites for the Detection of Alpha Fetoprotein, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep42361>.
- [53] D. Shahdeo, N. Chauhan, A. Majumdar, A. Ghosh, S. Gandhi, Graphene-Based Field-Effect Transistor for Ultrasensitive Immunosensing of SARS-CoV-2 Spike

- S1 Antigen, *ACS Appl. Bio Mater.* 5 (2022) 3563–3572.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00503>.
- [54] A. Das, S. Pisana, B. Chakraborty, S. Piscanec, S.K. Saha, U. V. Waghmare, K.S. Novoselov, H.R. Krishnamurthy, A.K. Geim, A.C. Ferrari, A.K. Sood, Monitoring dopants by Raman scattering in an electrochemically top-gated graphene transistor, *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 210–215.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2008.67>.
- [55] Y.W. Tan, Y. Zhang, K. Bolotin, Y. Zhao, S. Adam, E.H. Hwang, S. Das Sarma, H.L. Stormer, P. Kim, Measurement of scattering rate and minimum conductivity in graphene, *Phys. Rev. Lett.* 99 (2007) 10–13.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.99.246803>.
- [56] J.L. Xia, F. Chen, P. Wiktor, D.K. Ferry, N.J. Tao, Effect of top dielectric medium on gate capacitance of graphene field effect transistors: Implications in mobility measurements and sensor applications, *Nano Lett.* 10 (2010) 5060–5064. <https://doi.org/10.1021/nl103306a>.
- [57] S. Adam, E.H. Hwang, V. Galitski, S. Das Sarma, A self-consistent theory for graphene transport, 2007 (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0704772104>.
- [58] S. Kim, J. Nah, I. Jo, D. Shahrjerdi, L. Colombo, Z. Yao, E. Tutuc, S.K. Banerjee, Realization of a high mobility dual-gated graphene field-effect transistor with Al₂O₃ dielectric, *Appl. Phys. Lett.* 94 (2009) 062107.
<https://doi.org/10.1063/1.3077021>.
- [59] M.F. Craciun, S. Russo, M. Yamamoto, S. Tarucha, Tuneable electronic properties in graphene, *Nano Today.* 6 (2011) 42–60.
<https://doi.org/10.1016/j.nantod.2010.12.001>.
- [60] J. Wu, Understanding the Electric Double-Layer Structure , Capacitance , and Charging Dynamics, (2022). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00097>.
- [61] K.D.-D. and M.T.M. Koper, Modeling the Gouy–Chapman Diffuse Capacitance with Attractive Ion–Surface Interaction.pdf, (2021) 16664–16673.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c02381>.
- [62] K.B. Oldham, A Gouy-Chapman-Stern model of the double layer at a (metal)/(ionic liquid) interface, *J. Electroanal. Chem.* 613 (2008) 131–138.
<https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2007.10.017>.
- [63] V. Kesler, B. Murmann, H.T. Soh, Going beyond the Debye Length: Overcoming Charge Screening Limitations in Next-Generation Bioelectronic Sensors, *ACS Nano.* 14 (2020) 16194–16201. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08622>.
- [64] V. Lockett, M. Horne, R. Sedev, T. Rodopoulos, J. Ralston, Differential capacitance of the double layer at the electrode/ionic liquids interface, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 12499–12512.
<https://doi.org/10.1039/c0cp00170h>.
- [65] A. Velikonja, E. Gongadze, V. Kralj-Iglic, A. Iglic, Charge dependent capacitance of stern layer and capacitance of electrode/electrolyte interface, *Int. J. Electrochem. Sci.* 9 (2014) 5885–5894.
- [66] G. Palazzo, D. De Tullio, M. Magliulo, A. Mallardi, F. Intranuovo, M.Y. Mulla,

- P. Favia, I. Vikholm-lundin, L. Torsi, Detection Beyond Debye ' s Length with an Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor, (2014) 1–6.
<https://doi.org/10.1002/adma.201403541>.
- [67] J. Xia, F. Chen, J. Li, N. Tao, Measurement of the quantum capacitance of graphene, *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 505–509.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2009.177>.
- [68] Z. Zheng, H. Zhang, T. Zhai, F. Xia, Overcome Debye Length Limitations for Biomolecule Sensing Based on Field Effective Transistors†, *Chinese J. Chem.* 39 (2021) 999–1008. <https://doi.org/10.1002/cjoc.202000584>.
- [69] C.H. Chu, I. Sarangadharan, A. Regmi, Y.W. Chen, C.P. Hsu, W.H. Chang, G.Y. Lee, J.I. Chyi, C.C. Chen, S.C. Shiesh, G. Bin Lee, Y.L. Wang, Beyond the Debye length in high ionic strength solution: Direct protein detection with field-effect transistors (FETs) in human serum, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05426-6>.
- [70] A. de Moraes, L. Kubota, Recent Trends in Field-Effect Transistors-Based Immunosensors, *Chemosensors.* 4 (2016) 20.
<https://doi.org/10.3390/chemosensors4040020>.
- [71] E. Stern, R. Wagner, F.J. Sigworth, R. Breaker, T.M. Fahmy, M.A. Reed, Importance of the Debye Screening Length on Nanowire Field Effect Transistor Sensors, (2007) 0–4.
- [72] W. Huang, A.K. Diallo, J.L. Dailey, K. Besar, H.E. Katz, Electrochemical processes and mechanistic aspects of field-effect sensors for biomolecules, *J. Mater. Chem. C.* 3 (2015) 6445–6470. <https://doi.org/10.1039/C5TC00755K>.
- [73] C. Chu, I. Sarangadharan, A. Regmi, Y. Chen, C. Hsu, Beyond the Debye length in high ionic strength solution : direct protein detection with field-effect transistors (FETs) in human serum, *Sci. Rep.* (2017) 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05426-6>.
- [74] G.S. Kulkarni, Z. Zhong, Detection beyond the Debye Screening Length in a High-Frequency Nanoelectronic Biosensor, (2012) 1–5.
- [75] M. Magliulo, A. Mallardi, M.Y. Mulla, S. Cotrone, B.R. Pistillo, P. Favia, I. Vikholm-lundin, G. Palazzo, L. Torsi, Electrolyte-Gated Organic Field-Effect Transistor Sensors Based on Supported Biotinylated Phospholipid Bilayer, (2013) 2090–2094. <https://doi.org/10.1002/adma.201203587>.
- [76] K. Manoli, G. Palazzo, E. Macchia, A. Tiwari, C. Di Franco, K. Manoli, G. Palazzo, E. Macchia, A. Tiwari, D. Franco, G. Scamarcio, P. Favia, A. Mallardi, L. Torsi, Electrolyte gated TFT biosensors based on the Donnan ' s capacitance of anchored biomolecules, (2017). <https://doi.org/10.1117/12.2274940>.
- [77] M. Kaisti, Biosensors and Bioelectronics Detection principles of biological and chemical FET sensors, 98 (2017) 437–448.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.010>.
- [78] P. Bergveld, A Critical Evaluation of Direct Electrical Protein Detection Methods *, 6 (1991) 55–72.
- [79] R.B.M. Schasfoort, Possibilities and limitations of direct detection of protein

- charges by means of an immunological field-effect transistor, 238 (1990) 323–329.
- [80] S.I. Chen, *Electronic Sensors Based on Nanostructured Field-Effect Devices*, 2013.
- [81] S. Szunerits, T. Rodrigues, R. Bagale, H. Happy, R. Boukherroub, W. Knoll, Graphene-based field-effect transistors for biosensing: where is the field heading to?, *Anal. Bioanal. Chem.* (2023). <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04760-1>.
- [82] N. Haustein, Ó. Gutiérrez-Sanz, A. Tarasov, Analytical Model to Describe the Effect of Polyethylene Glycol on Ionic Screening of Analyte Charges in Transistor-Based Immunosensing, *ACS Sensors*. 4 (2019) 874–882. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01515>.
- [83] S. Sarkar, A.K. Sengupta, P. Prakash, The Donnan membrane principle: Opportunities for sustainable engineered processes and materials, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 1161–1166. <https://doi.org/10.1021/es9024029>.
- [84] H. Ha, Method for Estimation of Protein Isoelectric Point, (2012). <https://doi.org/10.1021/ac301569b>.
- [85] J. Ciborowski, P.;Silberring, *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, 2nd ed., Elsevier, 2016.
- [86] N. Liu, R. Chen, Q. Wan, Recent advances in electric-double-layer transistors for bio-chemical sensing applications, *Sensors (Switzerland)*. 19 (2019). <https://doi.org/10.3390/s19153425>.
- [87] Y. Liu, L. Yuan, M. Yang, Y. Zheng, L. Li, L. Gao, N. Nerngchamnong, C.T. Nai, C. Suchand Sangeeth, Y.P. Feng, C.A. Nijhuis, K.P. Loh, Giant enhancement in vertical conductivity of stacked CVD graphene sheets by self-assembled molecular layers, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6461>.
- [88] P. Blake, E.W. Hill, A.H. Castro Neto, K.S. Novoselov, D. Jiang, R. Yang, T.J. Booth, A.K. Geim, Making graphene visible, *Appl. Phys. Lett.* 91 (2007) 2007–2009. <https://doi.org/10.1063/1.2768624>.
- [89] D.C. Elias, Estudo das propriedades de transporte elétrico de grafeno e de grafeno hidrogenado, (2009).
- [90] F.M. Applications, *Microposit S1800 Series Photoresists 2 Instructions for Use*, 2006.
- [91] R.J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, Noncovalent Sidewall Functionalization of Carbon Nanotubes for Protein Immobilization, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 3838–3839. <https://doi.org/10.1021/Ja010172b>.
- [92] V. Georgakilas, M. Otyepka, A.B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K.C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K.S. Kim, Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications, *Chem. Rev.* 112 (2012) 6156–6214. <https://doi.org/10.1021/cr3000412>.
- [93] A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K.S. Novoselov, S. Roth, A.K. Geim, Raman spectrum of

- graphene and graphene layers, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 1–4.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401>.
- [94] A.C. Ferrari, J.C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K.S. Novoselov, S. Roth, A.K. Geim, Raman spectrum of graphene and graphene layers, *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006) 1–4.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401>.
- [95] A. Das, B. Chakraborty, A.K. Sood, Raman spectroscopy of graphene on different substrates and influence of defects, *Bull. Mater. Sci.* 31 (2008) 579–584. <https://doi.org/10.1007/s12034-008-0090-5>.
- [96] V.K. Kodali, J. Scrimgeour, S. Kim, J.H. Hankinson, K.M. Carroll, W.A. De Heer, C. Berger, J.E. Curtis, Nonperturbative chemical modification of graphene for protein micropatterning, *Langmuir.* 27 (2011) 863–865.
<https://doi.org/10.1021/la1033178>.
- [97] P.R. de Almeida, A.M. Murad, L.P. Silva, E.L. Rech, E.S. Alves, Development of a Graphene-Based Biosensor for Detecting Recombinant Cyanovirin-N, *Biosensors.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/BIOS10120206>.
- [98] Y. Huang, X. Dong, Y. Liu, L.J. Li, P. Chen, Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 12358–12362. <https://doi.org/10.1039/c1jm11436k>.
- [99] G.T. Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Third Edit, Academic Press, 2013.
- [100] Protocol:, Protein labeling with FITC This protocol describes labeling of proteins with Fluorescein isothiocyanate, (n.d.) 20.
- [101] M.R. Boyd, K.R. Gustafson, J.B. McMahan, R.H. Shoemaker, Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applicatn..., *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (1997) 1521–1530.
- [102] H.R. Bokesch, B.R. O’Keefe, T.C. McKee, L.K. Pannell, G.M.L. Patterson, R.S. Gardella, R.C. Sowder, J. Turpin, K. Watson, R.W. Buckheit, M.R. Boyd, A potent novel anti-HIV protein from the cultured cyanobacterium *Scytonema varium*, *Biochemistry.* 42 (2003) 2578–2584. <https://doi.org/10.1021/bi0205698>.
- [103] T. Mori, B.R. O’Keefe, R.C. Sowder, S. Bringans, R. Gardella, S. Berg, P. Cochran, J.A. Turpin, R.W. Buckheit, J.B. McMahan, M.R. Boyd, Isolation and characterization of Griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 9345–9353.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M411122200>.
- [104] B.R. O’Keefe, A.M. Murad, G.R. Vianna, K. Ramessar, C.J. Saucedo, J. Wilson, K.W. Buckheit, N.B. da Cunha, A.C.G. Araújo, C.C. Lacorte, L. Madeira, J.B. McMahan, E.L. Rech, Engineering soya bean seeds as a scalable platform to produce cyanovirin-N, a non-ARV microbicide against HIV, *Plant Biotechnol. J.* 13 (2015) 884–892. <https://doi.org/10.1111/pbi.12309>.
- [105] T.N. Grooms, H.R. Vuong, K.M. Tyo, D.A. Malik, L.B. Sims, C.P. Whittington, K.E. Palmer, N. Matoba, J.M. Steinbach-Rankins, Griffithsin-modified

- electrospun fibers as a delivery scaffold to prevent HIV Infection, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 6518–6531. <https://doi.org/10.1128/AAC.00956-16>.
- [106] C.C. Tsai, P. Emau, Y. Jiang, M.B. Agy, R.J. Shattock, A. Schmidt, W.R. Morton, K.R. Gustafson, M.R. Boyd, Cyanovirin-N Inhibits AIDS Virus Infections in Vaginal Transmission Models, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 20 (2004) 11–18. <https://doi.org/10.1089/088922204322749459>.
- [107] D.M. Colleluori, D. Tien, F. Kang, T. Pagliei, R. Kuss, T. McCormick, K. Watson, K. McFadden, I. Chaiken, R.W. Buckheit, J.W. Romano, Expression, purification, and characterization of recombinant cyanovirin-N for vaginal anti-HIV microbicide development, *Protein Expr. Purif.* 39 (2005) 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.009>.
- [108] A.L.H. Jordana Muñoz-Basagoitia, 1, Fábio Luís Lima Monteiro, 1, Lauren R. H. Krumpec, d, 1, Victoria Armario-Najerae, Shilpa R. Shenoy, d, Daniel Perez-Zsolta, Harrison James Westgarth, Gemma Villorbinæ, Larissa Maciel Bomfim, Dàlia Raich-Reguéa, Lara, and B.R.O. Edwards Pradenasa, Luiza Mendonça Higab, Manuel Portero-Otine, Benjamin Trinitéa, Richard M. Twymang, Teresa Capelle, Amilcar Tanurib, Julià Blanco, h, i, j, Nuria Izquierdo-Userosa, h, i, Elibio L. Rech, Paul Christou, l, Cyanovirin-N binds to select SARS-CoV-2 spike oligosaccharides outside of the receptor binding domain and blocks infection by SARS-CoV-2 Jordana, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120 (10) (2023). <https://doi.org/10.1073/pnas>.
- [109] F. Helle, C. Wychowski, N. Vu-Dac, K.R. Gustafson, C. Voisset, J. Dubuisson, Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25177–25183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602431200>.
- [110] B.R. O’Keefe, A.M. Murad, G.R. Vianna, K. Ramessar, C.J. Saucedo, J. Wilson, K.W. Buckheit, N.B. da Cunha, A.C.G. Araújo, C.C. Lacorte, L. Madeira, J.B. McMahon, E.L. Rech, Engineering soya bean seeds as a scalable platform to produce cyanovirin-N, a non-ARV microbicide against HIV, *Plant Biotechnol. J.* 13 (2015) 884–892. <https://doi.org/10.1111/pbi.12309>.
- [111] T. Moulæi, I. Botos, N.E. Ziólkowska, H.R. Bokesch, L.R. Krumpe, T.C. McKee, B.R. O’Keefe, Z. Dauter, A. Wlodawer, Atomic-resolution crystal structure of the antiviral lectin scytovirin, *Protein Sci.* 16 (2007) 2756–2760. <https://doi.org/10.1110/ps.073157507>.
- [112] S. Lusvarghi, C.A. Bewley, Griffithsin: An antiviral lectin with outstanding therapeutic potential, *Viruses.* 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/v8100296>.
- [113] R.S. Singh, A.K. Walia, J.S. Khattar, D.P. Singh, J.F. Kennedy, Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 475–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.041>.
- [114] K.B. Alexandre, E.S. Gray, H. Mufhandu, J.B. McMahon, E. Chakauya, B.R. O’Keefe, R. Chikwamba, L. Morris, The lectins griffithsin, cyanovirin-N and scytovirin inhibit HIV-1 binding to the DC-SIGN receptor and transfer to CD4+ cells, *Virology.* 423 (2012) 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.001>.

- [115] E.L. Rech, G.R. Vianna, F.J.L. Aragão, High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 410–418. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.9>.
- [116] B.I.R. Julie R Kikkert, José R Vidal, J.R. Kikkert, J.R. Vidal, B.I. Reisch, Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics, *Methods Mol. Biol. Clift. Nj.* 286 (2005) 61–78. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:061>.
- [117] X. QI, Y. Yang, Y. Su, T. Wang, Molecular cloning and sequence analysis of cyanovirin-N homology gene in *Ceratopteris thalictroides*, *Am. Fern J.* 99 (2009) 79–92. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-99.2.78>.
- [118] L.P. Kozlowski, IPC - Isoelectric Point Calculator, *Biol. Direct.* 11 (2016) 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13062-016-0159-9>.
- [119] H. Yang, J. Li, S.K. Patel, K.E. Palmer, B. Devlin, L.C. Rohan, Design of poly(Lactic-co-glycolic acid) (plga) nanoparticles for vaginal co-delivery of griffithsin and dapivirine and their synergistic effect for hiv prophylaxis, *Pharmaceutics.* 11 (2019) 1–21. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040184>.
- [120] A.M. Murad, G.H.M.F. Souza, J.S. Garcia, E.L. Rech, Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS E, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2618–2630. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100238>.
- [121] G.R. Vianna, N.B. Cunha, A.M. Murad, E.L. Rech, Soybeans as bioreactors for biopharmaceuticals and industrial proteins, *Genet. Mol. Res.* 10 (2011) 1733–1752. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1476>.
- [122] X. Dong, Y. Shi, P. Chen, Q. Ling, W. Huang, Aromatic molecules doping in single-layer graphene probed by Raman spectroscopy and electrostatic force microscopy, *Jpn. J. Appl. Phys.* 49 (2010). <https://doi.org/10.1143/JJAP.49.01AH04>.
- [123] H. Xu, Z. Zhang, H. Xu, Z. Wang, S. Wang, L.M. Peng, Top-gated graphene field-effect transistors with high normalized transconductance and designable dirac point voltage, *ACS Nano.* 5 (2011) 5031–5037. <https://doi.org/10.1021/nn201115p>.
- [124] B. Huard, N. Stander, J.A. Sulpizio, D. Goldhaber-Gordon, Evidence of the role of contacts on the observed electron-hole asymmetry in graphene, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 78 (2008). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.78.121402>.
- [125] R. Nouchi, M. Shiraishi, Y. Suzuki, Transfer characteristics in graphene field-effect transistors with Co contacts, *Appl. Phys. Lett.* 93 (2008). <https://doi.org/10.1063/1.2998396>.
- [126] J. Ye, M.F. Craciun, M. Koshino, S. Russo, S. Inoue, H. Yuan, Accessing the transport properties of graphene and its multilayers at high carrier density, (2011). <https://doi.org/10.1073/pnas.1018388108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018388108>.
- [127] D.K. Efetov, P. Kim, Controlling Electron-Phonon Interactions in Graphene at Ultrahigh Carrier Densities, 256805 (2010) 2–5.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.105.256805>.

- [128] D.A. Armbruster, T. Pry, Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation., *Clin. Biochem. Rev.* 29 Suppl 1 (2008) S49-52.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852857><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556583>.
- [129] Y. Wang, Y. Qu, G. Liu, X. Hou, Y. Huang, W. Wu, K. Wu, C. Li, Electrochemical immunoassay for the prostate specific antigen using a reduced graphene oxide functionalized with a high molecular-weight silk peptide, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 2061–2067. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1552-2>.
- [130] S. Cheng, K. Hotani, S. Hideshima, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, M. Hashimoto, Y. Mori, T. Osaka, Field effect transistor biosensor using antigen binding fragment for detecting tumor marker in human serum, *Materials (Basel).* 7 (2014) 2490–2500. <https://doi.org/10.3390/ma7042490>.
- [131] S. Sakamoto, W. Putalun, S. Vimolmangkang, W. Phoolcharoen, Y. Shoyama, H. Tanaka, S. Morimoto, Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites, *J. Nat. Med.* 72 (2018) 32–42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>.
- [132] R. Ghosh, J.E. Gilda, A. V. Gomes, The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots, *Expert Rev. Proteomics.* 11 (2014) 549–560. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635>.