

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**ESTUDO E APLICAÇÃO DO GRAFENO COMO  
BIOSSENSOR**

**LEONEL MUNIZ MEIRELES**

**ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO GRIBEL LACERDA**

Belo Horizonte - MG  
Janeiro/2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA

**ESTUDO E APLICAÇÃO DO GRAFENO COMO  
BIOSSENSOR**

**LEONEL MUNIZ MEIRELES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Belo Horizonte - MG  
Janeiro/2016

© 2016 Leonel Muniz Meireles  
TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

*Aos meus pais, Sirléa e Waldir,*

*Irmãos, Waldir, Jonas e Laís,*

*E a minha namorada, Jéssica*

# AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Waldir e Sirléa, pelo amor, carinho atenção, orientação, suporte e incentivo em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Denver, Meireles e Laís, pela amizade, companhia, incentivo e momentos de descontração.

A minha namorada Jéssica, pelo amor, incentivo, conforto, compreensão e pela leitura desta dissertação em busca de erros.

A minha família, por serem meu alicerce.

Ao Professor Rodrigo (Orientador), pela excelente orientação, suporte e momentos de motivação.

Ao Paulo, pelas lições de biologia, pela parceria no trabalho e ajuda com a dissertação.

Aos amigos de laboratório: Grasiano, Ingrid, Alisson, Gustavo, Edrian, Andreij, Lobão, Leonardo, Igor, André, Cíntia, Natália, Vinícius, Luan, Tiago IC e Sérgio pelos ensinamentos de física experimental e momentos de distração, dentro e fora do laboratório.

À Universidade Federal de Minas Gerais e as agências financiadoras CAPES, FAPEMIG e CNPq pela estrutura dos laboratórios e financeira.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para meu desempenho acadêmico.

*"Success consists of going from failure to failure without loss of enthusiasm"*

*Winston Churchill*

# RESUMO

O grafeno tem emergido como uma importante ferramenta para o estudo e aplicação em biossensores. Com apenas um átomo de espessura, sua relação área/volume é muito grande, com propriedades eletrônicas únicas, o grafeno é extremamente sensível a modificações em sua superfície, que o torna um importante instrumento para o estudo de sistemas biológicos.

Nesta dissertação, nos empenhamos em aprimorar o entendimento do grafeno como um material sensor realizando um estudo dos mecanismos de detecção. Executamos, como prova de conceito, a confecção de dispositivos em uma arquitetura de transistor de efeito de campo (FET) utilizando o grafeno como o canal condutor e aplicamos a tensão de *gate* através de uma solução eletroquímica. Exploramos três tipos de dispositivos: biossensor de pH, biossensor de acetilcolina e biossensor de anti-HSA. Nos sensores de acetilcolina e nos sensores de anti-HSA o grafeno estava funcionalizado respectivamente com PBSE + acetilcolinesterase e PBSE + HSA. Para os sensores de pH o grafeno não estava funcionalizado.

Nossos experimentos consistiram em verificar a evolução das propriedades elétricas do grafeno funcionalizado, quando este entra em contato com anti-HSA em diferentes concentrações (sensor de anti-HSA), com a acetilcolina (sensor de acetilcolina) e a evolução das propriedades elétricas do grafeno quando em contato com PBS (phosphate buffered saline) com diferentes pH (sensor de pH).

Os resultados mostram que o grafeno, sem funcionalização, é sensível a mudança de pH da solução em uma variação de 25 mV/pH. Este resultado é importante para a interpretação e entendimento do mecanismo sensorial do biossensor de acetilcolina, sendo capaz de detectar acetilcolina em uma concentração de 3,33 mmol/L. O dispositivo com grafeno funcionalizado com PBSE+HSA foi capaz de detectar a anti-HSA em uma concentração de 3,33 mmol/L. Também foram realizadas medidas para caracterizar a influência da funcionalização sobre o grafeno. Para cada resultado obtido é realizamos uma discussão sobre o processo de sensoriamento do referente dispositivo.

**Palavras-chave:** GFET, grafeno, biossensor, eletroquímica, ph, anti-HSA, acetilcolina, transistor.

# ABSTRACT

Graphene have emerged as an important tool for use and study in biosensor. With only one atom thick, its surface area/volume ratio is very large, combined with unique electronic properties, graphene is extremely sensitive to changes on its surface, which makes it a promising template for probing biological systems.

In this work, we strive to improve the understanding of graphene as sensor material, by conducting a study to develop different detection approaches. We execute, as a proof of concept, the fabrication of devices in a field-effect transistor architecture (FET) using graphene as the conductor channel and applying a gate voltage via an electrochemical solution. We explored three types of devices: pH biosensor, the acetylcholine biosensor and the anti-HSA biosensor. In acetylcholine sensors and anti-HSA sensors, the graphene was functionalized with PBSE + acetylcholinesterase and PBSE + HAS respectively. For pH sensors, the graphene not was functionalized.

Our experiments consists to verify the evolution of the electrical properties of functionalized graphene when it comes in contact with anti-HSA at different concentrations (anti-HSA sensor), with acetylcholine (acetylcholine sensor) and evolution of electrical graphene properties when in contact with PBS (phosphate buffered saline) at different pH (pH sensor).

The results show that graphene, without functionalization, is sensitive to change of pH solution in a **variation of 25 mV/pH**. This result is important for the interpretation and understanding of the sensing mechanism acetylcholine biosensor, which was able to detect acetylcholine in a concentration of 3.33 mmol/L. The functionalized graphene device PBSE + HSA detected anti-HSA at a concentration of 3.33 mmol/L. In addition, measurements were performed to characterize the influence of functionalization of graphene. For each result, we performed a discussion of the sensing mechanism for each device.

**Keywords:** GFET, graphene, biosensor, electrochemistry, pH, anti-HSA, acetylcholine, transistor.



# LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Forma dos orbitais s e 2p que se hibridizam e formam os orbitais  $sp^2$  que se posicionam em um ângulo de  $120^\circ$  entre si. Imagem adaptada de [2]... 18
- Figura 2: Formação das ligações  $\sigma$  e  $\pi$  entre átomos vizinho. (b) Orbitais  $p_z$  de átomos de carbonos vizinhos interagem formando a região onde os elétrons estão delocalizados. Figura adaptada de [32]..... 19
- Figura 3: Ilustração esquemática de biosensores e suas partes.....20
- Figura 4: Figura esquemática onde o anticorpo foi clivado. Figura retirada de [22]. .22
- Figura 5: a) Passagem de DNA por nanoporos no grafeno. b) Funcionalização do grafeno com DNA. Figura retirada de [23].....22
- Figura 6: Folha de átomos de carbono organizados em uma rede exagonal, possuindo espessura atômica. Figura obtida de [25]. .....25
- Figura 7: Rede exagonal do grafeno vista como uma sobreposição de 2 redes triangulares de átomos não equivalentes A e B. Adaptada de [26]. .....25
- Figura 8: Rede recíproca do grafeno com a primeira zona de Brillouin em destaque. Adaptada de [26]. .....26
- Figura 9: (a) Estrutura de banda do grafeno. (b) Bandas de energia cônicas próximas ao nível de Fermi se tocam nos pontos K e K'. Figura obtida de [46].....27
- Figura 10: Espaço do momentos. Em destaque a área entre  $k$  e  $k + dk$ . .....29
- Figura 11: Dependência linear do número de estados por energia.....29
- Figura 12: (a) Ilustração da camada de carga na interface solução/Metal, induzindo cargas no metal. (b) Perfil do potencial para este modelo. ....32
- Figura 13: Grafeno ligado ao linker, que por sua vez está ligado a proteína. A reação de ligação da proteína e o antígeno deve ocorrer dentro da dupla camada com o comprimento de Debye. Adaptada de [47]. .....36
- Figura 14: Gate Eletroquímico GFET. (a) Indução de cargas na superfície do grafeno através de um potencial aplicado na solução. Se o eletrodo do gate é positivo, vai induzir íons negativos no grafeno. (b) Modelo de um circuito evidenciando o caráter resistivo e capacitivo. Figura adaptada de [30]. 37
- Figura 15: a) Curva de gate para o grafeno não dopado. b) Posição do nível de Fermi para o grafeno não dopado. ....38
- Figura 16: Curvas de gate do grafeno para dopagem tipo-n e tipo-p.....38
- Figura 17: Mudanças na curva de condutividade devido a dois fatores distintos. Transferência de carga devido a dopagem por agentes externos que

resulta em uma variação horizontal do ponto de neutralidade. Mudança na inclinação das curvas de condutividade, mudando a mobilidade dos portadores de carga. ....	39
Figura 18: Chip e arquitetura do dispositivo, evidenciando um conjunto de contatos de fonte, marcas de alinhamento e um contato de canal onde possui o grafeno. ....	42
Figura 19: Imagem de um contato ouro/grafeno. ....	43
Figura 20: Ilustração em corte do dispositivo com a piscina de PDMS posicionada sobre o dispositivo. ....	44
Figura 21: Ilustração da geometria do canal de macrofluídica em PDMS. ....	44
Figura 22: Foto do molde dos canais de macrofluídica. Em destaque uma região já recortada e destacada. ....	45
Figura 23: Ilustração do posicionamento do PDMS sobre os contatos. Removida e adaptada de [48]. ....	45
Figura 24: Ilustração de como um fluxo de solução pelo canal é ajustado. Seringa contendo a solução entregue ao dispositivo. Adaptada de [49]. ....	46
Figura 25: Eletrodo de referencia. a) Eletrodo comercial ET072 da marca eDAQ. b) Esquemático mostrando o fio de prata coberto com um filme de cloreto de prata. ....	47
Figura 26: Foto do dispositivo montado, com os micro tubos e eletrodo de Ag/AgCl conectados. ....	47
Figura 27: Estrutura de um anticorpo evidenciando o sitio de ligação. Adaptada de [51]. ....	48
Figura 28: Estrutura do PBSE. ....	50
Figura 29: Processo de funcionalização do grafeno. (a) Grafeno limpo, pronto para ser funcionalizado. (b) grafeno com PBSE após o excesso de PBSE removido. (c) Grafeno com PBSE e com antígeno ou enzima ligado. (d) Partes ainda expostas do grafeno e do PBSE bloqueadas com blocker. ....	51
Figura 30: Configuração de medida, evidenciando em cinza o grafeno entre a Fonte e o Dreno, e o liquido em azul. ....	52
Figura 31: Resultado da medida desmostrando que a medida além de ruidosa leva um longo tempo para estabilizar. ....	55
Figura 32: Resultado de uma medida usando a configuração de piscina. Em destaque os ruídos inseridos no sistema ao gotejar uma solução. ....	56
Figura 33: Resultado da medida do comportamento resistivo do dispositivo. Curva ôhmica com resistência de 4,3 k $\Omega$ . ....	57

Figura 34: Medida de uma corrente de fuga entre o eletrodo e o dreno do dispositivo. .....	58
Figura 35: Curvas de Gate para PBS com diferentes pH.....	59
Figura 36: Valor da tensão de gate do mínimo de condutividade por pH da solução. .....	60
Figura 37: Gráfico contendo resultado da corrente para tensão de fonte e tensão de gate fixos. As setas indicam o momento em que um novo PBS com pH diferente é adicionado. ....	61
Figura 38: Formação da bicamada que induz cargas no grafeno devido a organização dos íons de $\text{OH}^-$ e $\text{H}_3\text{O}^+$ na interface grafeno/solução. (a) Adsorção de $\text{OH}^-$ induzindo buracos no grafeno, dopando-o tipo-p. (b) Adsorção de $\text{H}_3\text{O}^+$ induzindo elétrons no grafeno, dopando-o tipo-n. ....	62
Figura 39: Comparação das curvas de <i>gate</i> em diferentes etapas da funcionalização. .....	63
Figura 40: Clivagem da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....	64
Figura 41: Curva de gate.....	65
Figura 42: Gráfico de corrente por tempo indicando o momento em que ocorreu a primeira substituição e a segunda substituição. ....	66
Figura 43: Gráfico indicando momento em que o PBS + acetilcolina foi inserida, e quando a solução de apenas PBS foi inserida. ....	67
Figura 44: Gráfico indicando a adição da proteína não específica.....	67
Figura 45: Funcionalização do grafeno com PBSE + HSA e a ligação da anti-HSA ao HSA.....	69
Figura 46: Gate para o dispositivo funcionalizado para detecção de anti-HSA.....	70
Figura 47: Gráfico obtido do sensor de anti-HSA. As setas indicam o momento em que a solução foi substituída na seringa. ....	71
Figura 48: Resultado da medida do biossensor, com as setas indicando o momento em que as soluções foram inseridas no sistema.....	72
Figura 49: Figura ilustrativa da dopagem tipo-n, destacando a diminuição da condutividade para $V_G$ igual a -75 mV e o deslocamento devido a dopagem. ....	73
Figura 50: Ilustração do sistema de crescimento de grafeno CVD. É ilustrada suas partes mais importantes: Controlador de gás, forno + tubo de quartzo e a bomba de vácuo. Retirada de [50]. ....	79
Figura 51: Fluxograma de Crescimento de grafeno sobre o cobre e transferência para o substrato desejado. Retirado de [50]. ....	81

Figura 52: Fluxograma com as etapas de litografia ótica: 1) Substrato limpo. 2) Substrato com foto resiste. 3) Exposição à luz UV. 4) e 5) Revelação com MF26A. 6) Limpeza com plasma. 7) Deposição dos Metais. 8) Lift off. .84

Figura 53: Proteção e corrosão do grafeno. a) Proteção do grafeno com PMMA e foto resiste. b) Corrosão do grafeno e do PMMA. ....85

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo de crescimento do Grafeno. ....	80
Tabela 2: Protocolo de limpeza do grafeno. ....	86

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**GFET'S** – Transistores de efeito de campo baseado em grafeno (*Graphene Field Effect Transistors*)

**PBSE** – Ácido 1-pirenobutanoico succinimidil éster

**DMF** – Dimetilformamida

**Fab** – Fragmento de ligação à antígeno (*fragment antigen-binding*)

**PBS** – Tampão fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

**PDMS** – Polydimethylsiloxane

**HSA** - Albumina Sérica Humana

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Grafeno .....	18
1.2 Biossensores.....	20
1.3 Nano-biotecnologia .....	21
<b>CAPÍTULO 2 - GRAFENO</b> .....	<b>24</b>
2.1 Estrutura Cristalina.....	24
2.2 Estrutura Eletrônica.....	26
2.3 Densidades de Estados e de Portadores .....	28
<b>CAPÍTULO 3 - ELETROQUÍMICA</b> .....	<b>31</b>
3.1 Interface Metal-Líquido e Comprimento de Debye.....	31
3.2 <i>Gate</i> Eletroquímico.....	36
<b>CAPÍTULO 4 - O DISPOSITIVO BIOSENSOR</b> .....	<b>41</b>
4.1 A arquitetura do Dispositivo.....	41
4.2 Desenvolvimento do Canal de Macrofluídica .....	43
4.3 Eletrodo de Referencia Ag/AgCl.....	46
4.4 Proteínas: Anticorpo e Antígeno.....	48
4.5 Funcionalização do Grafeno.....	49
4.6 Montagem do Sistema de Medidas .....	51
<b>CAPÍTULO 5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>54</b>
5.1 Uso do PDMS em Arquitetura de Piscina.....	54
5.2 Grafeno como Sensor de pH.....	56
5.2.1 Discussão do Sensor de pH.....	61
5.3 Caracterização da Funcionalização .....	63
5.4 Sensor de Acetilcolina .....	64
5.4.1 Discussão do Sensor de Acetilcolina .....	68
5.5 Sensor da Proteína Anti-HSA.....	69
5.5.1 Discussão de Sensor de Anti-HSA.....	72
5.6 Conclusão .....	74

5.7 Perspectivas.....	75
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>85</b>



# Capítulo 1

## INTRODUÇÃO

---

A necessidade de entender processos químicos e biológicos em escala cada vez menores vem crescendo, acompanhada pela necessidade de métodos de diagnósticos medicinais e monitoramento químico. Atualmente os métodos existentes, em sua maioria, utilizam-se de grandes equipamentos e demandam grande tempo de trabalho.

Devido à maioria dos processos químicos e biológicos serem fundamentalmente interações eletrostáticas, por exemplo; ligações não covalentes entre antígeno-anticorpo, ligações iônicas entre  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , pontes de hidrogênio em grupos hidrogenados, abre-se a possibilidade da utilização do conhecimento físico para desenvolver técnicas e produtos que possam detectar e monitorar tais reações. O foco deste trabalho é estudar o grafeno como um biossensor e, como prova de conceito, integrá-lo em um dispositivo eletrônico como biossensor.

Neste capítulo iniciaremos apresentando o grafeno em uma breve introdução. Seguiremos descrevendo o que são os biossensores e suas partes. Por fim descreveremos a nano-biotecnologia como uma junção de grafeno aliado a biossensores.

No Capítulo 2 descreveremos as propriedades do grafeno que são mais importantes para este trabalho. Ao leitor interessado em estudar a fundo este material, grafeno, recomendamos as referências [1],[2],[3].

Seguimos no Capítulo 3 explicando sobre a eletroquímica necessária para o entendimento do funcionamento do biossensor. O Capítulo 4 contém informações do biossensor construído, arquitetura e o motivo dela, o que é a funcionalização e como

ela é feita e, por fim, a montagem do sistema de medidas. Vamos exibir e analisar os resultados no Capítulo 5, fechando-o com propostas de melhorias e implementações.

Este trabalho ainda contém 3 apêndices com informações a respeito da fabricação do dispositivo, fornecendo as receitas para a confecção.

## 1.1 Grafeno

Andre Geim e Konstantin Novoselov, em 2004, isolaram pela primeira vez o grafeno [4]: um cristal de apenas um átomo de espessura, composto unicamente por átomos de carbono arranjados em uma geometria hexagonal. Mais tarde, em 2010, Geim e Novoselov, devido suas contribuições a ciência com os experimentos realizados neste material, receberam o prêmio Nobel de 2010.

O átomo de carbono é o sexto elemento da tabela periódica, possuindo quatro elétrons na camada de valência, sendo assim, classificado como elemento da família do grupo IV ou, de acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), grupo 14. Os elétrons ocupam os orbitais 2s, 2p<sub>x</sub>, 2p<sub>y</sub> e 2p<sub>z</sub> [5]. As funções de ondas destes orbitais podem se combinar e formar um novo estado hibridizado sp<sup>n</sup> [6]. No grafeno ocorre a hibridização sp<sup>2</sup>, que é a combinação do orbital 2s com o orbital 2p. A Figura 1 ilustra a hibridização dos carbonos que constituem o grafeno: três orbitais do grafeno são hibridizados, formando um ângulo de 120° entre eles e apenas o orbital p<sub>z</sub> é mantido inalterado e se posiciona perpendicular ao plano que contém os outros três orbitais.

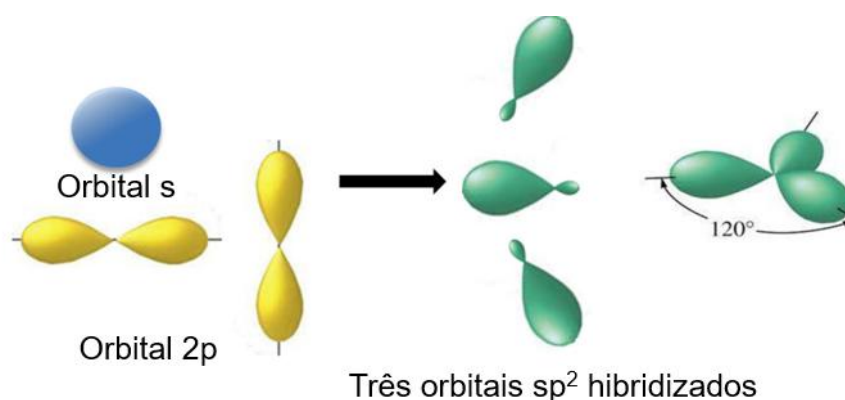
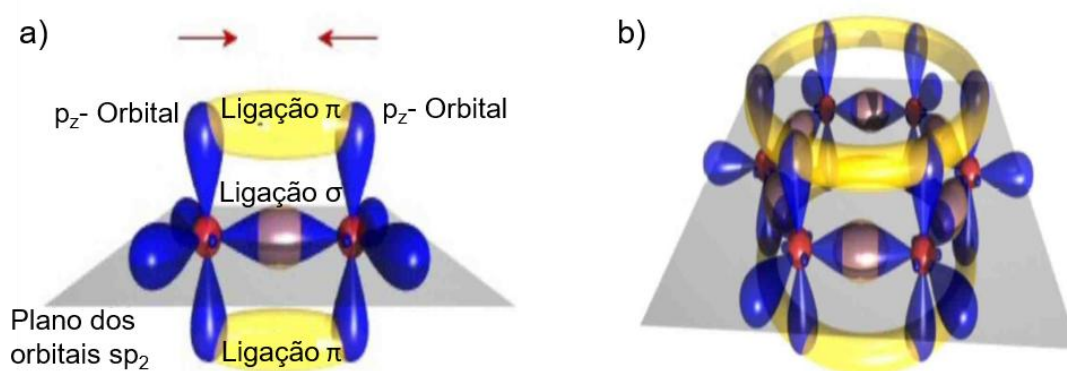


Figura 1: Forma dos orbitais s e 2p que se hibridizam e formam os orbitais sp<sup>2</sup> que se posicionam em um ângulo de 120° entre si. Imagem adaptada de [2].

Estes estados  $sp^2$  se ligam covalentemente com os orbitais, também  $sp^2$ , dos átomos de carbono vizinhos, formando ligações  $\sigma$ . Tais ligações conferem estabilidade mecânica e rigidez ao grafeno, mas devido a estarem fortemente ligados estes elétrons não contribuem para as propriedades de transporte elétrico. O orbital  $p_z$  permanece inalterado e o seu elétron forma uma ligação covalente delocalizada com o átomo vizinho, ligação  $\pi$ , como ilustrado na Figura 2. Outras propriedades importantes para o presente trabalho serão estudadas no capítulo 2.

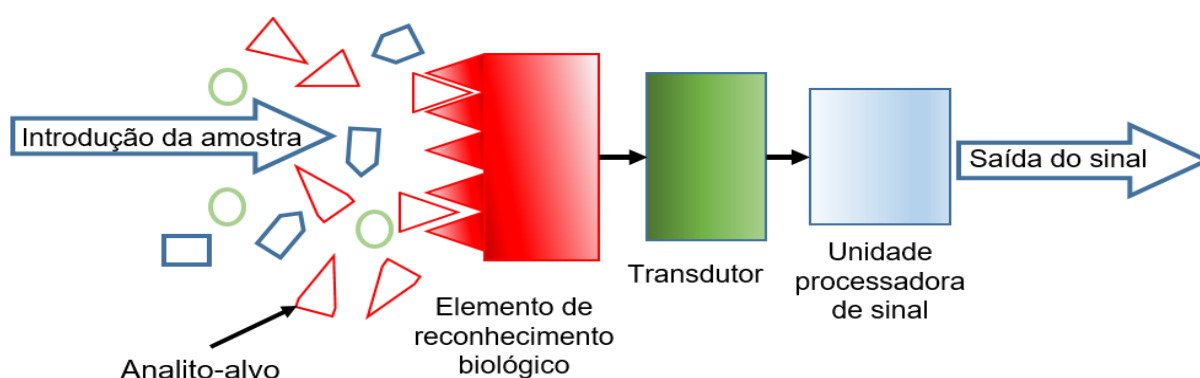


**Figura 2: Formação das ligações  $\sigma$  e  $\pi$  entre átomos vizinho. (b) Orbitais  $p_z$  de átomos de carbonos vizinhos interagem formando a região onde os elétrons estão delocalizados. Figura adaptada de [32].**

Desde 2004 o grafeno tem sido o utilizado para vários estudos e aplicações, tal como efeito hall quântico [7], eletrodinâmica relativística [8], biossensores, condutores transparentes [9], circuitos integrados [10], entre outros. Por ser um material bidimensional, sua relação área superficial por volume é enorme, o que indica que suas propriedades são altamente influenciadas por modificações em sua superfície, assim o grafeno vem se mostrando um ótimo material para aplicações em sensores [11], [12], [13], [14].

## 1.2 Biossensores

Sendo a ciência dos biossensores uma área multidisciplinar e não delineada, é possível encontrar na literatura várias formas de definição de biossensor, no entanto, em poucas palavras, um biossensor é um dispositivo capaz de detectar uma biomolécula específica, seja ela qual for. Um exemplo de biossensor amplamente utilizado são os monitores de glicose no sangue, que através da reação entre glicose do sangue com a glicose oxidase do dispositivo, analisa a criação de ácido glucônico. Atualmente o monitor de glicose auxilia no tratamento de mais 9 milhões de pessoas com diabetes no Brasil, segundo a pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em parceria com o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) realizada em 2012. Outros tipos de biossensores são usados para detectar anticorpos, proteínas [13] e DNA [15].



**Figura 3: Ilustração esquemática de biossensores e suas partes.**

A arquitetura e funcionamento de um biossensor é, em geral, dividida em 3 partes (Figura 3): elemento de reconhecimento biológico, o transdutor e a unidade processadora de sinal. O elemento de reconhecimento biológico executa o papel de seletividade; é nele que o elemento biológico a ser detectado interage ocorrendo uma mudança física ou química. O transdutor é responsável por medir esta mudança, transformando-a em um produto mensurável, como massa, carga, calor ou luz. Por fim, a unidade processadora age transformando este produto mensurável em gráficos, tabelas ou textos.

Devido à natureza de extrema seletividade entre anticorpos e seus antígenos, vários dispositivos de biossensores fazem uso de proteínas para detecção de alguma molécula-alvo. Esses biossensores que possuem apenas um objeto para identificação são chamados de dispositivos de *point-of-care*, cujos os testes são não invasivos e podem ser realizados em qualquer lugar, apenas com a utilização de algum fluido corpóreo de fácil extração, seja sangue ou urina [16]. Eletrodos enzimáticos, por exemplo, são compostos por uma junção de uma enzima com um eletrodo, são utilizados para detectar a oxidação de glicose a ácido glicônico, envolvendo a formação de peróxido e consumo de oxigênio por ação da enzima glicose oxidase utilizando sangue fora do copo.

O emprego de biossensores em indústrias químicas e setores correlatos, como o de alimentos e farmacêutica, está aumentando cada vez mais. Nestes setores os biossensores estão substituindo técnicas convencionais, como a espectrometria de massa, que requerem grandes equipamentos, preparação de amostra e um longo tempo de processamento.

### 1.3 Nano-biotecnologia

Com a manipulação e integração de materiais nanométricos com agentes biológicos e químicos, uma nova porta da ciência tem sido aberta e através dela é possível entrar em uma área, que até então, inexplorada. Estes avanços tecnológicos têm possibilitado estudos qualitativos e quantitativos de diversas interações e reações biológicas e químicas [17], [18].

A união do grafeno com agentes biológicos é um exemplo de nano-biotecnologia. Transistores de efeito de campo de grafeno, GFET (*Graphene Field Effect Transistor*) funcionalizado com agentes biológicos é um exemplo da união entre nanotecnologia e biologia. Estes FET's, incluindo transistor de nanofios e nanotubos de carbono, têm permitido estudos de interação antígeno-anticorpo [19] e reação bioquímica de uma única molécula [20].

Em todo o mundo, um grande número de cientistas têm estudado e desenvolvido diferentes técnicas de funcionalização do grafeno. Os resultados

alcançados são surpreendentes: Chunmeng Yu e Yunqi Liu, da *Beijing National Laboratory for Molecular Sciences*, desenvolveram uma técnica de funcionalização do grafeno, capaz de detectar concentrações de 0,1 nM de  $\text{Hg}^{2+}$ , um íon de metal pesado [21]. Em 2012, Okamoto e Matsumoto, da *Osaka University*, fabricaram um dispositivo capaz de detectar 2,3 nM da proteína HSA, para isto utilizaram um método de funcionalização em que o anti-HSA foi clivado e reduzido de tamanho [22], Figura 4:

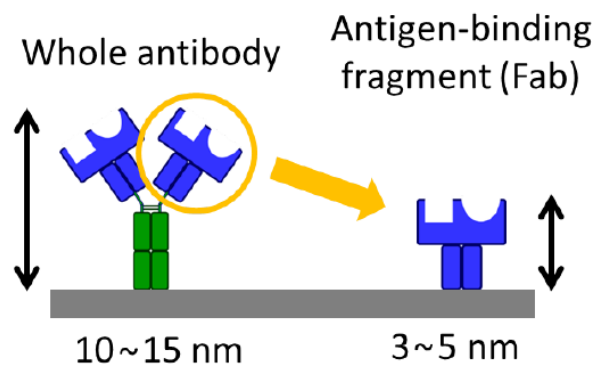


Figura 4: Figura esquemática onde o anticorpo foi clivado. Figura retirada de [22].

Trabalhos que estudam a passagem de DNA por nanoporos no grafeno e funcionalização do grafeno com DNA também se destacam, com a possibilidade de selecionar certas sequências de DNA e copiá-las [23], [24].

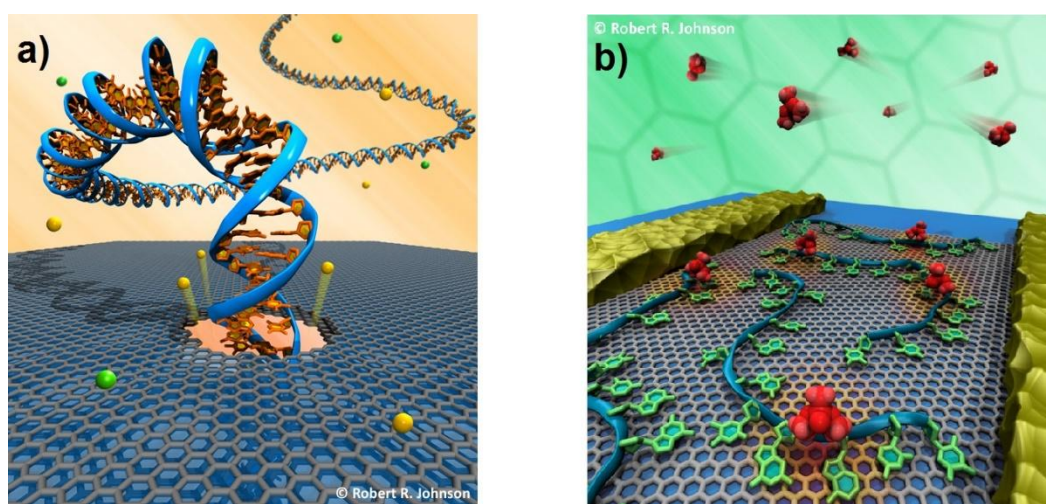


Figura 5: a) Passagem de DNA por nanoporos no grafeno. b) Funcionalização do grafeno com DNA. Figura retirada de [23].

Estes dispositivos, citados aqui, possuem excelentes características para fins comerciais como: tempo de detecção em minutos, pequenas dimensões e custo de

fabricação baixo. Sendo possível, portanto, seu uso não restrito em laboratório de pesquisas, fornecendo o resultado de detecção em um curto período de tempo e baixo preço.

No entanto, muito precisa ser feito nesse ramo da ciência: descobrir novas técnicas de funcionalização com diferentes agentes biológicos e químicos, aplicar tais técnicas em diferentes arquiteturas de dispositivos, e desenvolver técnicas que permitam a fabricação em níveis comerciais.

Neste trabalho realizamos um passo em direção a essa junção, unindo grafeno à biologia e à química. Estudamos o grafeno como um material biossensor e como prova de conceito o aplicamos como sensor de pH, sensor de acetilcolina e sensor da proteína anti-HSA, uma importante etapa no processo de criação de um protótipo realmente operável.

# Capítulo 2

## GRAFENO

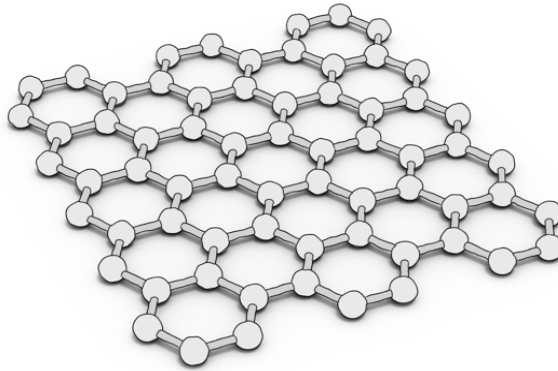
---

Neste capítulo descreveremos algumas propriedades físicas do grafeno, que é uma das peças centrais deste trabalho. Tais propriedades serão o alicerce para o entendimento do presente trabalho de mestrado. Iniciaremos com uma descrição de sua estrutura cristalina e posteriormente a estrutura eletrônica. Estas estruturas eletrônicas concedem interessantes propriedades elétricas. O grafeno utilizado no trabalho foi obtido pelo método CVD, da sigla *Chemical Vapor Deposition*. A técnica de CVD é brevemente descrita no Apêndice A.

### 2.1 Estrutura Cristalina

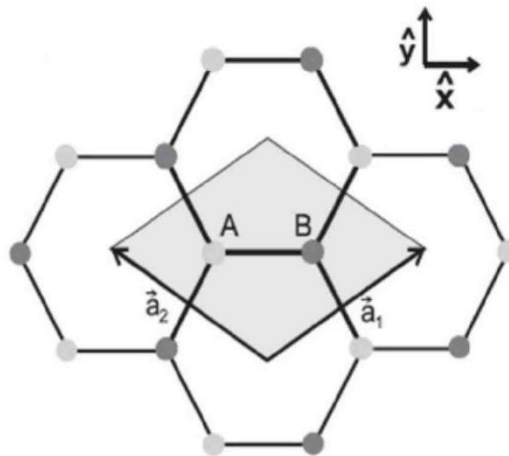
O grafeno, como visto no capítulo 1, é um material composto por uma única camada de átomos de carbono arranjados em uma estrutura hexagonal e, portanto, é um material bidimensional. Essa estrutura é conhecida como favo de mel, exemplificada na Figura 6:





**Figura 6: Folha de átomos de carbono organizados em uma rede exagonal, possuindo espessura atômica. Figura obtida de [25].**

A rede hexagonal do grafeno, apesar de não ser uma rede de Bravais, pode ser descrita como uma sobreposição de duas redes de Bravais, triangulares, compostas por átomos não equivalentes, **A** e **B**, em sua base. Veja Figura 7.



**Figura 7: Rede exagonal do grafeno vista como uma sobreposição de 2 redes triangulares de átomos não equivalentes A e B. Adaptada de [26].**

Podem ser escolhidos como vetores unitários desta rede dois vetores,  $\vec{a}_1$  e  $\vec{a}_2$ , escritos em coordenadas cartesianas como:

$$\vec{a}_1 = \left( \frac{\sqrt{3}a}{2}, \frac{a}{2} \right) \quad e \quad \vec{a}_2 = \left( -\frac{\sqrt{3}a}{2}, \frac{a}{2} \right) \quad (1)$$

Com  $a = \sqrt{3}a_{c-c}$  e  $a_{c-c}$  sendo a distância entre os dois átomos de carbonos mais próximos e possui o valor de 0,142 nm [6].

A rede recíproca do grafeno tem seus vetores unitários,  $\vec{b}_1$  e  $\vec{b}_2$ , relacionados com os vetores da rede recíproca através da relação  $\vec{a}_i \cdot \vec{b}_j = 2\pi\delta_{ij}$  onde  $\delta_{ij}$  é o delta de Kronecker. Em coordenadas cartesianas  $\vec{b}_1$  e  $\vec{b}_2$  são ilustradas na Figura 8 e são escrito como:

$$\vec{b}_1 = \left( \frac{2\pi}{\sqrt{3}a}, \frac{2\pi}{a} \right) \quad e \quad \vec{b}_2 = \left( -\frac{2\pi}{\sqrt{3}a}, \frac{2\pi}{a} \right) \quad (2)$$

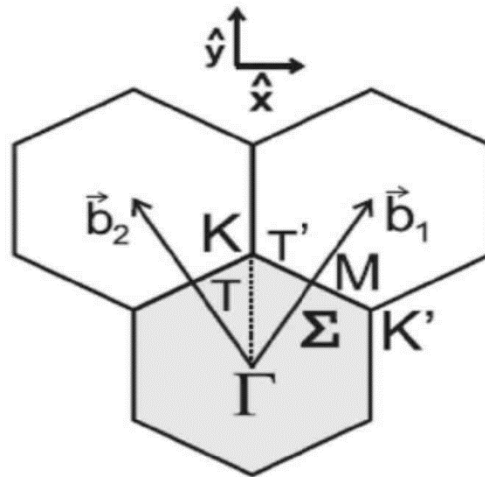


Figura 8: Rede recíproca do grafeno com a primeira zona de Brillouin em destaque. Adaptada de [26].

A Figura 8 destaca a primeira zona de Brillouin, e seus pontos de alta simetria K,  $\Gamma$  e M. Estes pontos de alta simetria, especialmente K, tem um papel importante na estrutura de bandas que será visto na seção seguinte.

## 2.2 Estrutura Eletrônica

O grafeno possui seus átomos de carbono em um estado de hibridização  $sp^2$ , realizando ligações  $\sigma$  no plano da folha e formando um ângulo de  $120^\circ$  entre si. Essas

ligações proporcionam ao grafeno importantes características como rigidez e estabilidade mecânica, porém, elétrons neste orbital, por estarem fortemente ligados ao átomo de carbono, pouco contribuem para as propriedades elétricas. O outro orbital  $2p_z$ , orbital  $\pi$ , é perpendicular ao plano do grafeno, possui um elétron mais fracamente ligado ao átomo de carbono, e portanto, pode se mover pela rede cristalina sendo facilmente excitados para níveis mais energéticos [6].

Podemos utilizar o método de Ligações-Fortes (*Tight-Binding*) para obter a relação de dispersão dos elétrons  $\pi$ , uma vez que estes estão suficientemente ligados ao átomo. Nesse método, utiliza-se como base das funções de Bloch os orbital atômicos  $p_z$  dos átomos não equivalentes A e B. Através destes cálculos, obtém-se a seguinte relação de dispersão das bandas de energia formadas pelos elétrons do orbital  $\pi$  [27]:

$$E_{\pm}(\vec{k}) - \varepsilon_{2p_z} = \pm t \sqrt{1 + 4 \cos\left(\frac{\sqrt{3}ak_x}{2}\right) \cos\left(\frac{ak_y}{2}\right) + 4 \cos^2\left(\frac{ak_y}{2}\right)} \quad (3)$$

em que  $t$  é o elemento de matriz de transferência ( $t \approx 2,8V$ ) [27] e os sinais  $+$  e  $-$  geram os valores da banda  $\pi$  e  $\pi^*$ , banda de valência e condução respectivamente e  $\varepsilon_{2p_z}$  é a energia do orbital  $2p_z$ . A curva de dispersão de energia dada pela Eq. 3 pode ser vista na Figura 9 (a).

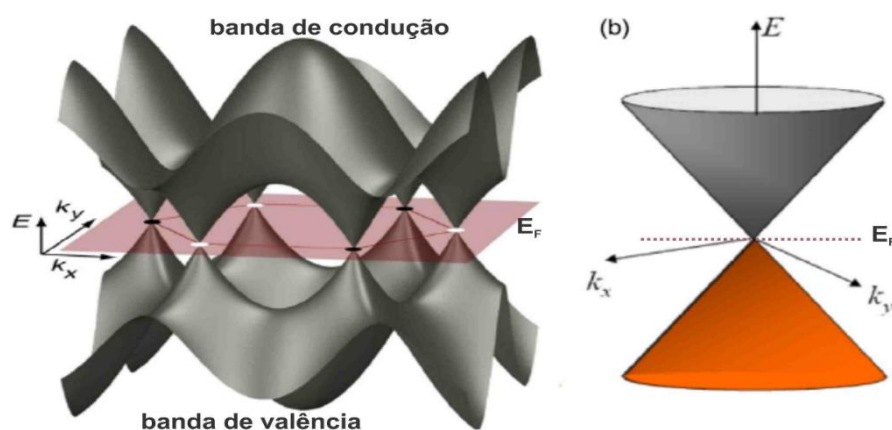


Figura 9: (a) Estrutura de banda do grafeno. (b) Bandas de energia cônicas próximas ao nível de Fermi se tocam nos pontos K e K'. Figura obtida de [46].

Note que as bandas, de condução e de valência, se tocam nos pontos de alta simetria K. Realizando uma expansão na relação de dispersão, Eq. 3, em torno destes pontos, obtemos uma relação linear [27], [1]:

$$E_{\pm} \approx \pm \hbar k v_F \quad (4)$$

Sendo  $v_F \approx 10^6 \text{ m/s}$  a velocidade de Fermi. Assim, vemos que nos pontos K a relação de dispersão é aproximadamente linear. Essa aproximação é válida para energias menores que 1.0 eV [28]. A relação de dispersão é ilustrada na Figura 9 (b).

Estes pontos K são conhecidos como ponto de Dirac, ou pontos de neutralidade de carga (CNP), devido a semelhança da equação de dispersão de energia com a equação de energia relativística,  $E = pc$ , proposta por Dirac, para partículas relativísticas em que a massa é exatamente igual a zero. Desde modo é possível mapear problemas em torno do ponto K em problemas de partículas de massa nula.

Portanto, o grafeno é um semiconductor de gap nulo, ou seja, não possui banda proibida e neste ponto K, quando a temperatura é 0 Kelvin, é exatamente onde passa o nível de Fermi [6].

## 2.3 Densidades de Estados e de Portadores

Em um material bidimensional, representamos o espaço dos momentos como um plano com os eixos  $k_x$  e  $k_y$ . Para obtermos a densidade de estados para um material, devemos calcular o número de estados entre  $\vec{k}$  e  $\vec{k} + d\vec{k}$ , Figura 10, ou seja,  $N(k)dk$ . Assim, para o grafeno, dividimos a área de um disco de área  $2\pi k dk$ , pela área de uma célula unitária que é dada por  $(2\pi)^2/A$ , onde  $A$  é a área do material. Logo:

$$N(k) = A \frac{2\pi k dk}{(2\pi)^2} \times 4 \quad (5)$$

onde o fator 4 representa a degenerescência de *spin* e de *valley*.

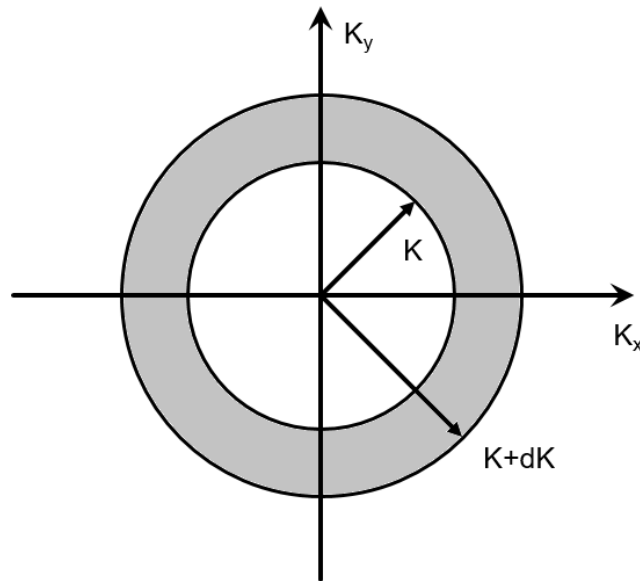


Figura 10: Espaço do momentos. Em destaque a área entre  $\vec{k}$  e  $\vec{k} + d\vec{k}$ .

Como visto na seção anterior, perto dos pontos K a energia é dada pela Eq. 4, então:

$$E(k) = \hbar v_F k \rightarrow k dk = \frac{E dE}{(\hbar v_F)^2}$$

substituindo na Eq. 5:

$$N(E) = 4A \frac{E dE}{2\pi(\hbar v_F)^2} \tag{6}$$

uma dependência linear com a energia, Figura 11:

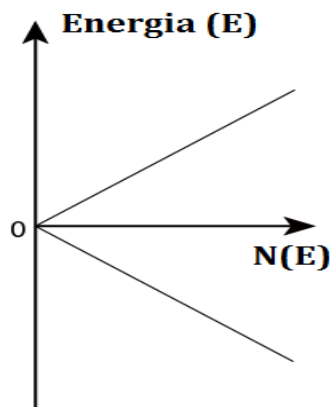


Figura 11: Dependência linear do número de estados por energia.

Como o número de elétrons por unidade de área,  $n$ , pode ser dado por:

$$n = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{N(E)f(E)}{A} dE \quad (7)$$

para o grafeno, resolvemos esta integral, usando o intervalo de integração de 0 à energia de Fermi,  $E_F$ , para obtermos  $n$  em função de  $k_F$ . Lembrando que, em  $T=0$  a função de Fermi-Dirac,  $f(E)$ , é igual a um para  $E < E_F$ .

$$n = \int_0^{E_F} \frac{2E}{\pi(\hbar v_F)^2} dE = \frac{E_F^2}{\pi(\hbar v_F)^2} \quad (8)$$

Por tanto:

$$E_F = \hbar v_F \sqrt{\pi n} \quad (10)$$

Através desta relação, notamos que é possível modular o nível de Fermi, modificando o número de portadores de cargas no grafeno.

Devido a estas características incomuns, o grafeno tem conquistado um lugar de destaque na física de materiais, e vem sendo amplamente usado em diversas áreas da ciência.

A pesquisa de biossensores tem avançado com a integração do grafeno nesta área. No entanto, ainda há várias possibilidades e rotas de investigação neste estudo. Usaremos neste trabalho estas possibilidades, afim de aprimorar e aprender ainda mais sobre o estudo e aplicação do grafeno em biossensores.

# Capítulo 3

## ELETROQUÍMICA

---

O comportamento e a transferência de cargas, em uma solução, desempenham um papel fundamental nos estudos das reações químicas e biológicas. Uma potente área da ciência que realiza o estudo desses eventos é a eletroquímica. Este capítulo dará ao leitor uma visão geral sobre a interface líquido/grafeno, comprimento de Debye e *gate* eletroquímico, a fim de iluminar os resultados descritos no Capítulo 5. Para um maior aprofundamento busque [29].

### 3.1 Interface Metal-Líquido e Comprimento de Debye

Processos elétricos que ocorrem em soluções são largamente estudados pela eletroquímica e pela físico-química. Nesta seção vamos abordar pontos importantes destes processos, necessários para o estudo do biosensor.

Toda superfície carregada em contato com uma solução irá induzir, nesta solução, cargas opostas, formando uma dupla camada carregada na interface. Hermann Helmholtz [29] desenvolveu um modelo simples para tratar esta dupla camada considerando que, na solução, uma única camada de cargas contrárias, à do metal, é adsorvida na superfície afim de neutralizar as cargas no metal como mostrado na Figura 12 (a). Dessa forma, o potencial cai linearmente através da interface, como mostrado na Figura 12 (b).

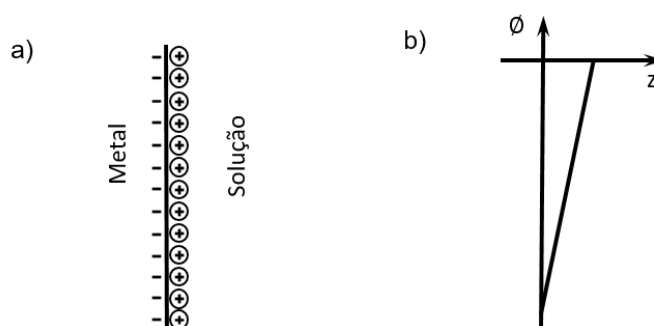


Figura 12: (a) Ilustração da camada de carga na interface solução/Metal, induzindo cargas no metal. (b) Perfil do potencial para este modelo.

Podemos encontrar a capacitância deste sistema, considerando um capacitor de placas paralelas, de forma simples. O campo em um capacitor de placas paralelas, com área muito maior que a distância entre elas, é constante e perpendicular às placas com valor  $E = \sigma/\epsilon_0$ . Então, podemos calcular a carga total (Eq. 11) e a diferença de potencial entre as placas (Eq. 12), constatando que a capacitância por área é dada pela Eq.13:

$$Q = \epsilon_0 \oint \vec{E} \cdot d\vec{A} = \epsilon_0 EA \quad (11)$$

$$V = \int_-^+ \vec{E} \cdot d\vec{l} = Ed \quad (12)$$

$$\frac{C}{A} = \frac{Q}{VA} = \frac{\epsilon_0 EA}{AEd} = \frac{\epsilon_0}{d} \quad (13)$$

No entanto, em um meio aquoso, podemos escrever a capacitância por área como  $C_A = \epsilon_0 \epsilon/d$ , onde a permissividade do vácuo é 8,85 pF/m, a constante dielétrica da água, por exemplo, é  $\epsilon \approx 80$ , e  $d$  é a distância de separação entre as cargas, que é aproximadamente o tamanho dos íons. Para valor de raio típico de íon, 2 Å, a capacitância é 3,5 F/m<sup>2</sup>, porém, experimentalmente observa-se valores menores que variam de 0,1 F/m<sup>2</sup> a 0,4 F/m<sup>2</sup> [29]. Modelos mais sofisticados, como o de Gouy-Chapman, descrevem um melhor comportamento da dupla camada.

Partindo da equação de Poisson, podemos obter uma melhor descrição da formação da dupla camada:



$$\nabla^2 \phi(x) = -\frac{\rho(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (14)$$

Uma vez que as cargas se movem pela solução, estas movimentações causam flutuações em  $\rho(x)$ . Se assumirmos, contudo, que estes íons obedecem a distribuição de Boltzmann, podemos escrever as concentrações de cargas positivas e negativas como:

$$c^+(x) = c_0 e^{-e\phi(x)/k_B T} \quad \text{e} \quad c^-(x) = c_0 e^{e\phi(x)/k_B T} \quad (15)$$

onde  $c_0$  é a concentração de sal,  $k_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura. Assumindo que:

$$\rho(x) = e[c^+(x) + c^-(x)] + \rho_{Fixo}(x) \quad (16)$$

em que  $\rho_{Fixo}(\vec{x})$  é uma densidade de carga fixa, por exemplo, DNA ou alguma macromolécula que não tem sua carga modificada. Substituindo a Eq. 16 e a Eq. 15 na Eq. 14:

$$\nabla^2 \phi(x) = \frac{e}{\epsilon \epsilon_0} (c_0 e^{e\phi(x)/k_B T} - c_0 e^{-e\phi(x)/k_B T}) - \frac{\rho_{Fixo}(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (17)$$

Através da Eq. 12 podemos estudar o potencial mais próximo à superfície, por exemplo, em moléculas de DNA na superfície do eletrodo ou do grafeno. Fazendo uma expansão Taylor, linearizamos a Eq. 17, mantendo somente os termos de primeira ordem. Esta aproximação funciona bem quando  $e|\phi| < k_B T$ , ou seja, quando o potencial é pequeno comparado com a energia térmica, então obtemos a Eq.18:

$$\nabla^2 \phi(x) = \frac{2c_0 e^2}{\epsilon \epsilon_0 k_B T} \phi(x) - \frac{\rho_{Fixo}(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (18)$$

Debye fez esta linearização e definiu [29]:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k_B T}{2c_0 e^2}} \quad (19)$$

como o comprimento de Debye.

Reescrevendo a Eq. 18:

$$\nabla^2 \phi(x) = \frac{1}{\lambda_D^2} \phi(x) - \frac{\rho_{fixo}(x)}{\epsilon \epsilon_0} \quad (20)$$

A Eq. 20 é conhecida como equação de Debye-Hückel e tem como sua solução um potencial que decai exponencialmente,  $e^{-r/\lambda_D}$ .

Considerando que os portadores de carga são cargas pontuais, podemos reescrever a Eq. 19 como [30]:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon \epsilon_0 k_B T}{2I e^2}} \quad (21)$$

onde  $I$  é a força iônica. Força iônica é a medida da concentração de íons em uma solução:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (22)$$

Com  $z_i$  e  $c_i$  sendo a carga e sua concentração respectivamente. Para sais que dissolvem em dois íons monovalentes, a força iônica é equivalente a concentração dos sais. Em uma solução de cloreto de sódio, por exemplo, em uma concentração de 0,001 mol/L, as concentrações dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são iguais, 0,001 mol/L com  $z(\text{Na}^+) = 1$  e  $z(\text{Cl}^-) = -1$ , por tanto:

$$I(\text{NaCl}) = \frac{1}{2} \cdot \left( 1^2 \cdot 0.001 \frac{\text{mol}}{\text{L}} + (-1)^2 \cdot \frac{0.001 \text{mol}}{\text{L}} \right)$$

$$I(\text{NaCl}) = 0.001 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \quad (23)$$

Usando a constante de Avogadro ( $N_A = 6,02 \times 10^{23}$  moléculas/mol), para reescrever a Eq. 22 em Mols/Litro, como é tipicamente escrito concentrações, a Eq.21 pode ser aproximada por:

$$\lambda_D \approx \frac{0.3nm}{\sqrt{I[M]}} \quad (24)$$

O comprimento de Debye desempenha um importante papel em diversos ramos da física, entre elas estão, física de plasma, eletrólitos e coloides. Em todas essas áreas de estudo, o comprimento de Debye fornece a medida da distância na qual a influência de um campo elétrico é sentida em uma determinada região, ou seja, é a distância média de penetração do campo elétrico.

Observando a Eq. 24, notamos que, quanto maior a concentração de portadores de cargas  $I$ , ou cargas livres, menor é o comprimento de Debye. Em um metal, por exemplo, o número de elétrons livres é muito grande e, portanto, o comprimento de Debye é muito pequeno, assim o campo elétrico praticamente não o penetra.

Para o presente trabalho, o comprimento de Debye desempenha um importante papel; as reações químicas e biológicas devem ocorrer dentro deste comprimento, Figura 13. Se, por exemplo, a reação de ligação anticorpo-antígeno ocorrer na região do comprimento de Debye o arranjo de carga na superfície do grafeno, ou seja, cargas do capacitor grafeno/solução, se modifica. Esta modificação de cargas adsorvidas no grafeno, como veremos na Seção 3.2, muda a dopagem do grafeno. Portanto, quando a ligação do antígeno no anticorpo é efetivada dentro do comprimento de Debye, a capacitância da dupla camada é alterada.

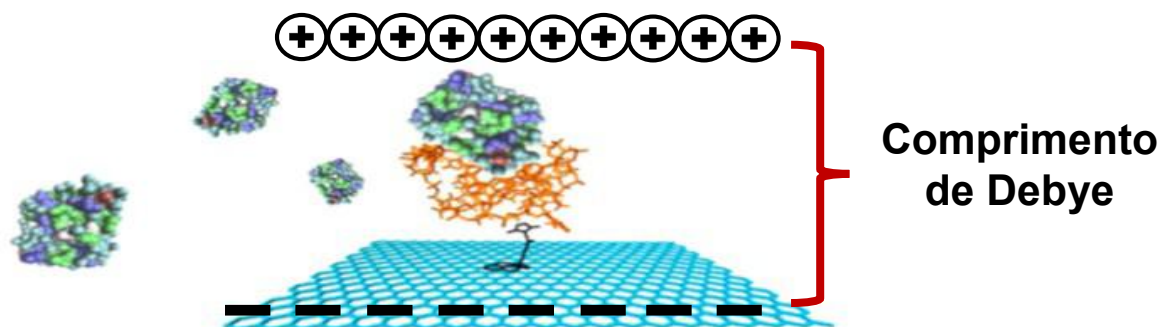
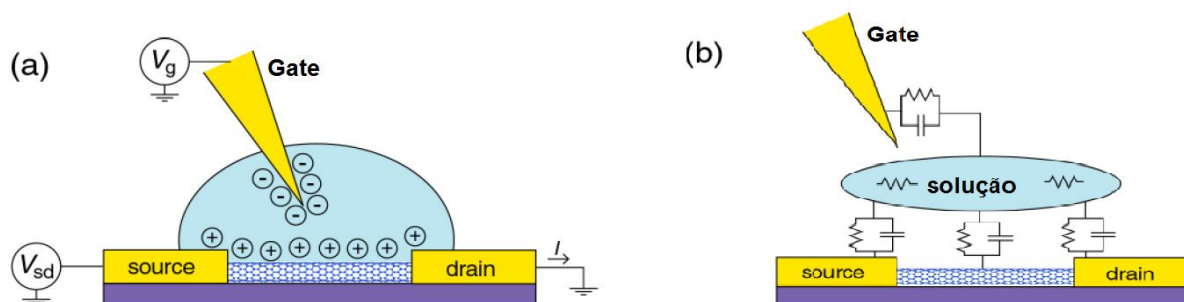


Figura 13: Grafeno ligado ao linker, que por sua vez está ligado a proteína. A reação de ligação da proteína e o antígeno deve ocorrer dentro da dupla camada com o comprimento de Debye. Adaptada de [47].

### 3.2 Gate Eletroquímico

Nesta seção, mostraremos como um *gate* eletroquímico pode adicionar cargas no grafeno mudando sua dopagem, como as curvas de *gate* se comportam quando estão sujeitas a diferentes tipos de dopagens e a importância da capacitância quântica quando utilizamos um *gate* eletroquímico.

Os dispositivos estudados e confeccionados neste trabalho são baseados em um modelo de Transistor de Efeito de Campo (FET). Foram construídos transistores de efeito de campo cujo o canal de condução é o grafeno por CVD, este tipo de transistor é conhecido como GFET (*Graphene Field Effect Transistor*). Um bom modelo para tratar o circuito de um GFET é ilustrado na Figura 14:



**Figura 14: Gate Eletroquímico GFET. (a) Indução de cargas na superfície do grafeno através de um potencial aplicado na solução. Se o eletrodo do gate é positivo, vai induzir íons negativos no grafeno. (b) Modelo de um circuito evidenciando o caráter resistivo e capacitivo. Figura adaptada de [30].**

Quando uma tensão de *gate* ( $V_G$ ) é aplicada no dispositivo, cargas são induzidas na interface grafeno/solução, Figura 14 (a). Portanto, ao aplicar diferentes  $V_G$ , quantidades diferentes de cargas são induzidas na interface, ou seja, através da aplicação de um potencial de *gate* é possível modificar a dopagem do grafeno. Como vimos no Capítulo 2, ao alterar o número de portadores de carga,  $n$ , o nível de Fermi,  $E_F$ , modifica obedecendo a Eq.10. A Figura 15 exemplifica uma curva de *gate* para o grafeno não dopado: ao aplicar um *gate* positivo cargas negativas são induzidas no grafeno e conseqüentemente o nível de Fermi será deslocado para acima do ponto de Dirac tornando a dopagem tipo-n, igualmente, ao aplicar um *gate* negativo cargas positivas são induzidas no grafeno e conseqüentemente o nível de Fermi será deslocado para abaixo do ponto de Dirac tornando a dopagem tipo-p.

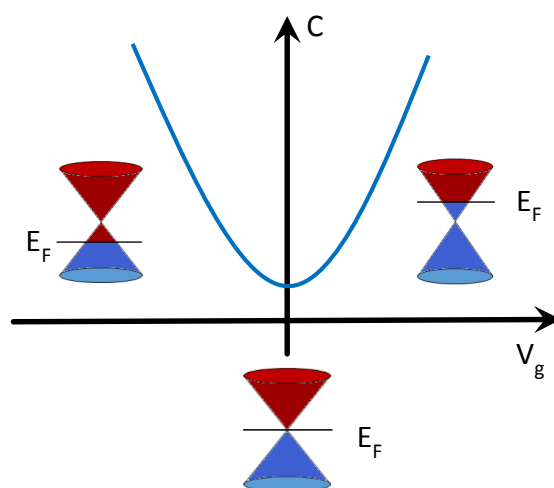


Figura 15: a) Curva de gate para o grafeno não dopado. b) Posição do nível de Fermi para o grafeno não dopado.

A Figura 16 ilustra duas curvas de *gate* para grafeno extrinsecamente dopado; com  $V_G$  igual a zero o nível de Fermi já está acima ou abaixo do ponto de Dirac. O mínimo de cada curva indica a região onde o grafeno possui o menor número de portadores livres, este mínimo de condutividade tem origem na desordem dos portadores [31].

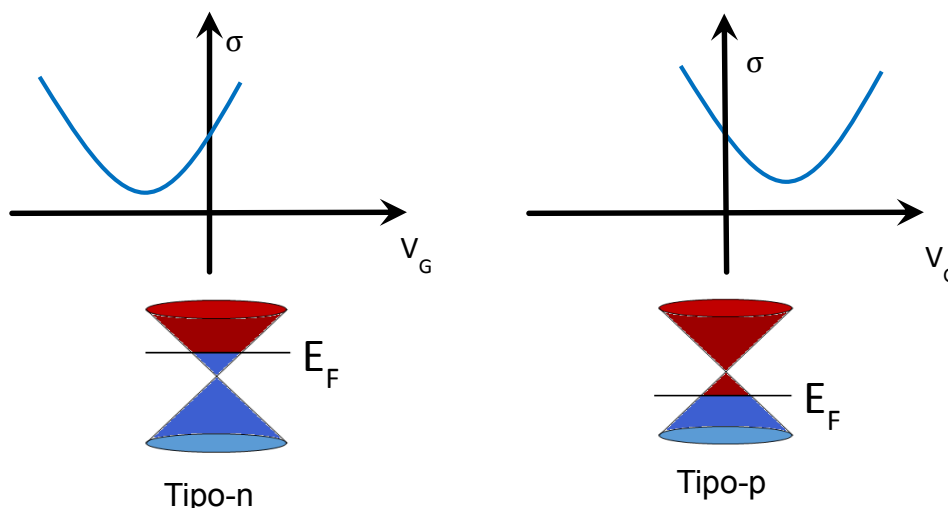
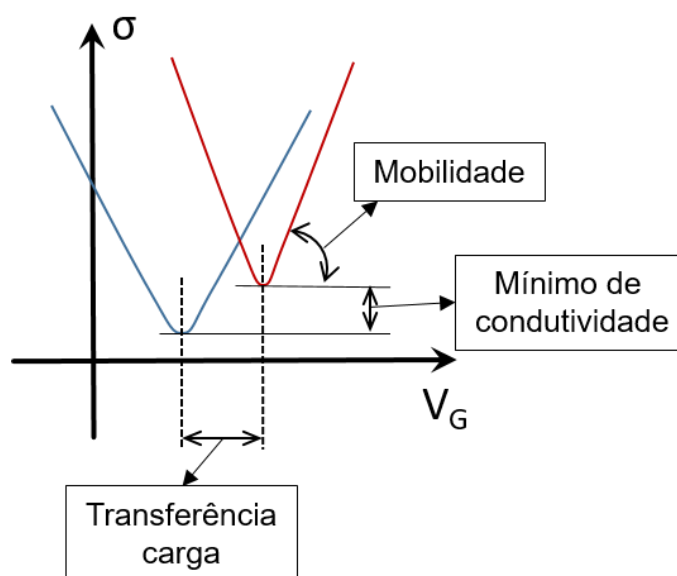


Figura 16: Curvas de gate do grafeno para dopagem tipo-n e tipo-p.

Devemos ressaltar duas características importantes a respeito das curvas de condutividade do grafeno: o deslocamento horizontal do ponto de neutralidade (*CNP- Charge Neutral Point*), ponto de menor valor de condutividade, indica uma mudança na dopagem devido a transferência de carga. Uma mudança na inclinação da curva

de condutividade, é devido a uma variação na mobilidade dos portadores de carga  $\mu$ , tal variação é devido a defeitos ou centros espalhadores no grafeno. Os dois fenômenos estão ilustrados na Figura 17.



**Figura 17: Mudanças na curva de condutividade devido a dois fatores distintos. Transferência de carga devido a dopagem por agentes externos que resulta em uma variação horizontal do ponto de neutralidade. Mudança na inclinação das curvas de condutividade, mudando a mobilidade dos portadores de carga.**

Uma vez que a mobilidade pode ser obtida através da inclinação da curva, [32]:

$$\mu = \frac{1}{c_g} \left( \frac{\partial \sigma}{\partial V_G} \right) \quad (25)$$

onde  $c_g$  é a capacitância de *gate*.

Vimos que o arranjo de carga na interface cria um capacitor, no entanto, a capacitância total desta interface é dada por:

$$C^{-1} = (C_E^{-1} + C_Q^{-1}) \quad (26)$$

uma combinação da capacitância eletrostática com a capacitância quântica do grafeno. A capacitância quântica surge devido ao fato da densidade de estados no grafeno ser baixa; é preciso mais energia a cada carga adicionada no grafeno.

É necessário ressaltar que, em um dispositivo em que é aplicado *back gate* (onde o *gate* é aplicado através do SiO<sub>2</sub> de 300 nm, por exemplo) a capacitância eletrostática é muito menor que a capacitância quântica e portanto o termo  $C_E^{-1}$  domina na Eq.26. No dispositivo que utiliza o *back gate*, é necessário aplicar grandes tensões para se obter a mesma modulação de cargas no grafeno, obtidas em um dispositivo de que utiliza *gate* eletroquímico. Assim, a capacitância quântica pode influenciar na capacitância total do dispositivo, portanto, devemos leva-la em consideração em dispositivos que utilizam *gate* eletroquímico, ou dispositivos com alta capacitância geométrica.



# Capítulo 4

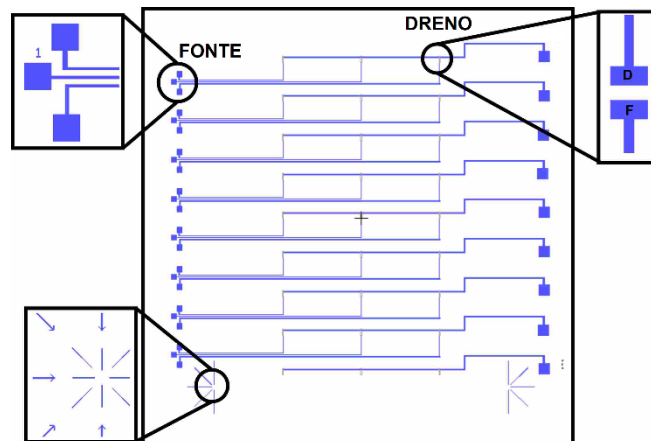
## O DISPOSITIVO BIOSSENSOR

---

Neste capítulo discutiremos a confecção. Iniciamos descrevendo sua arquitetura, dimensões e o motivo de escolher tal configuração. Passaremos para o desenvolvimento do canal de macro fluídica falando de como o sistema de fluídica funciona. Introduziremos a reação anticorpo-antígeno e descreveremos o protocolo de funcionalização utilizado e o porquê utilizamos tais agentes químicos e biológicos. Por fim, descreveremos o sistema de medidas utilizado e seus componentes elétricos.

### 4.1 A arquitetura do Dispositivo

O biossensor foi desenvolvido para conter 27 contatos grafeno/ouro, divididos em 8 conjuntos de 3 contatos. Cada conjunto possui um dreno comum para 3 fontes distintas, a arquitetura é mostrada na Figura 18, todo o chip possui a dimensão de  $(2 \times 2)$  cm<sup>2</sup>. Cada contato é montado em uma arquitetura de GFET's, onde a tensão de *gate* é aplicado através da solução, sendo possível a aplicação de *back gate* através do SiO<sub>2</sub>. Esta arquitetura permite a construção do dispositivo em substratos baratos como o vidro. A Figura 19 mostra um destes canais.



**Figura 18:** Chip e arquitetura do dispositivo, evidenciando um conjunto de contatos de fonte, marcas de alinhamento e um contato de canal onde possui o grafeno.

O grafeno faz o papel do canal semicondutor, mostrado na Figura 17, por onde a corrente será modulada através de um *gate* eletroquímico ou *back gate*. Quando uma tensão é aplicada entre os terminais do grafeno, nos contatos de ouro, uma corrente é estabelecida através da relação:

$$I = V/R$$

com,

$$R = \frac{L}{\sigma w}$$

onde  $\sigma$  é a condutividade,  $L$  é o comprimento do canal e  $w$  é a largura do canal. Usando o modelo de Drude, a condutividade é dada por:

$$\sigma = e(n\mu_e + p\mu_p)$$

onde  $n$  é o número de portadores negativos,  $\mu_e$  é a mobilidade para cargas negativas,  $p$  é o número de portadores positivos e  $\mu_p$  é a mobilidade para cargas positivas.

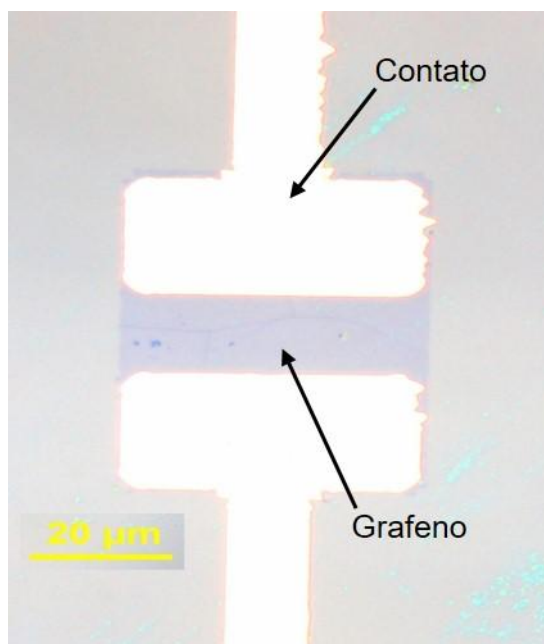


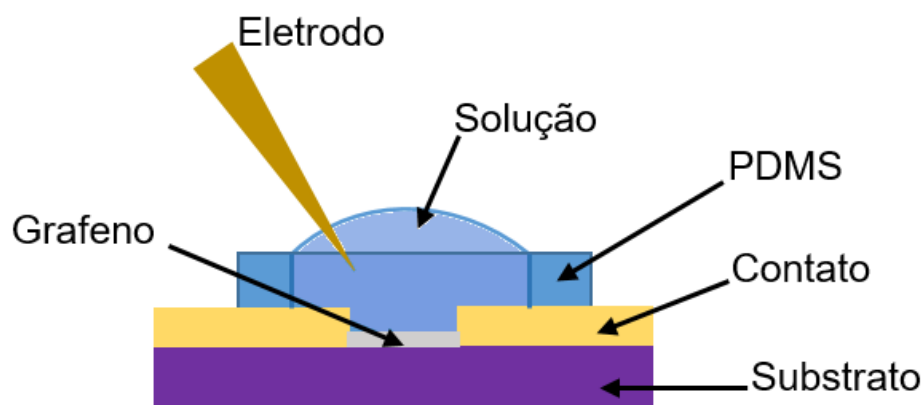
Figura 19: Imagem de um contato ouro/grafeno.

O processo de fabricação do dispositivo, desde a obtenção do grafeno, é explicado nos apêndices A, B e C.

## 4.2 Desenvolvimento do Canal de Macrofluídica

Com a necessidade de se limitar uma região sobre o dispositivo, região do grafeno, a qual a solução trabalho deve se manter, foram desenvolvidas duas técnicas de contenção da solução; uma “piscina” e um canal de macrofluídica.

A piscina consiste em uma barreira de PDMS (polimetilsiloxano), posicionada sobre o dispositivo, cuja a região do grafeno permaneça exposta, ilustrada na Figura 20. Para que o PDMS se fixe sobre o substrato, é necessário que os dois, PDMS e substrato, estejam limpos. Portanto, o PDMS é imerso em isopropílico e levado ao ultrassom por 5 minutos, seco com jato de  $N_2$ , e em seguida posicionado sobre a região desejada do dispositivo e pressionada durante 1 minuto.



**Figura 20: Ilustração em corte do dispositivo com a piscina de PDMS posicionada sobre o dispositivo.**

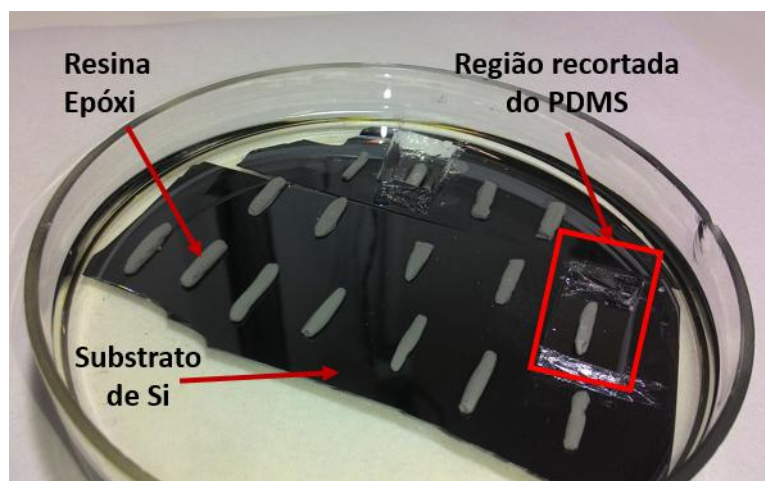
Através da abertura da piscina as soluções de trabalho e o eletrodo são inseridos no sistema. No entanto, esta arquitetura não nos forneceu bons resultados, que serão brevemente expostos no Capítulo 5.

O sistema de canal macrofluídica, também fabricado em PDMS, consiste uma estrutura ilustrada na Figura 21.



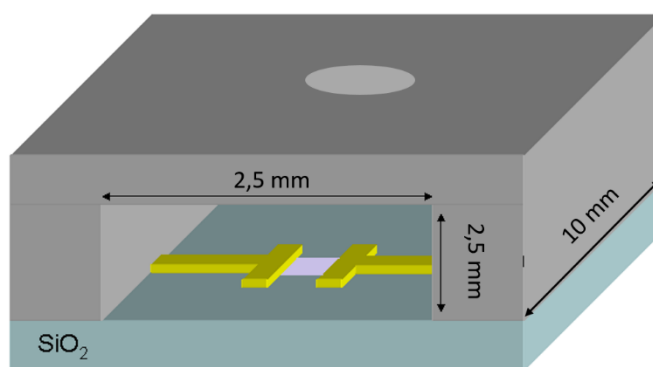
**Figura 21: Ilustração da geometria do canal de macrofluídica em PDMS.**

Para a obtenção desta estrutura, usamos um molde de resina epóxi. Diversos filetes de resina epóxi foram moldados com as dimensões desejadas para o canal e posicionadas sobre um substrato de Si por 12 horas. Após o enrijecimento da resina, o PDMS é preparado e despejado sobre o molde de epóxi até que o cubra por completo e em seguida é mantido em uma superfície plana por 24 horas. A Figura 22 contém uma foto do molde após o tempo de cura do PDMS.



**Figura 22:** Foto do molde dos canais de macrofluídica. Em destaque uma região já recortada e destacada.

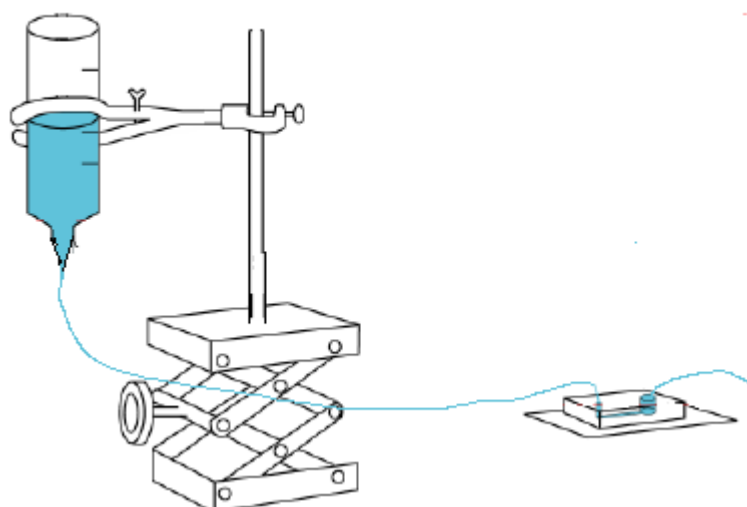
As dimensões destes canais, em geral, são de 10 mm x 2,5 mm x 2,5 mm. Recortamos um canal desejado do molde, uma abertura é feita na parte de cima afim de dar acesso do eletrodo que fará o gate através da solução e por fim o fixamos sobre o dispositivo, Figura 23.



**Figura 23:** Ilustração do posicionamento do PDMS sobre os contatos. Removida e adaptada de [48].

Com o PDMS fixado no SiO<sub>2</sub>, utilizamos a wire-bonder para conectar os contatos de fonte e dreno à um chip *holder*, projetado e confeccionado pelo aluno Vinicius Ornelas, membro do grupo de nano-materiais.

Na entrada do canal de PDMS, um micro tubo conecta o canal à uma seringa e, através deste, é inserido as soluções de trabalho do biossensor. A seringa tem a abertura do embolo aberta, de forma que a solução possa escorrer pelo micro tubo sob efeito apenas da gravidade. A diferença de altura entre a seringa e o dispositivo é ajustada a fim de se obter o fluxo desejado de solução pelo canal de PDMS, de acordo com cada medida, veja Figura 24.

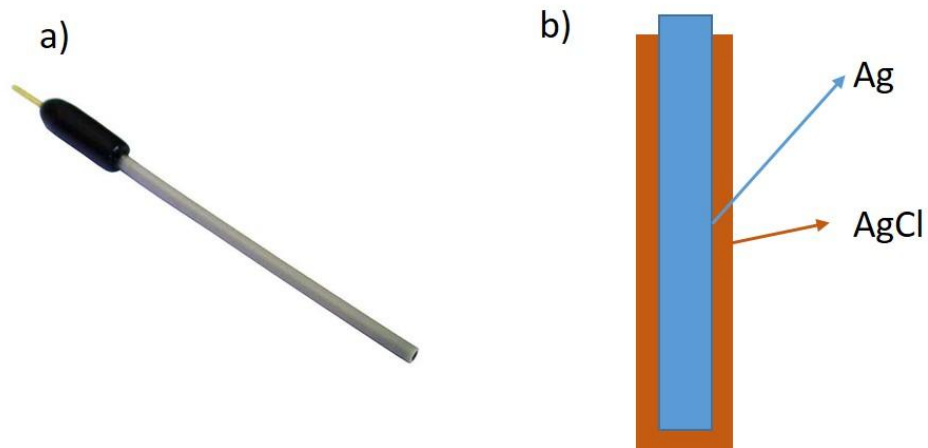


**Figura 24: Ilustração de como um fluxo de solução pelo canal é ajustado. Seringa contendo a solução entregue ao dispositivo. Adaptada de [49].**

Com o sistema montado, o eletrodo de Ag/AgCl, usado para aplicar a tensão de *gate*, é inserido no furo superior do PDMS. O eletrodo usado é o ET072 da marca eDAQ.

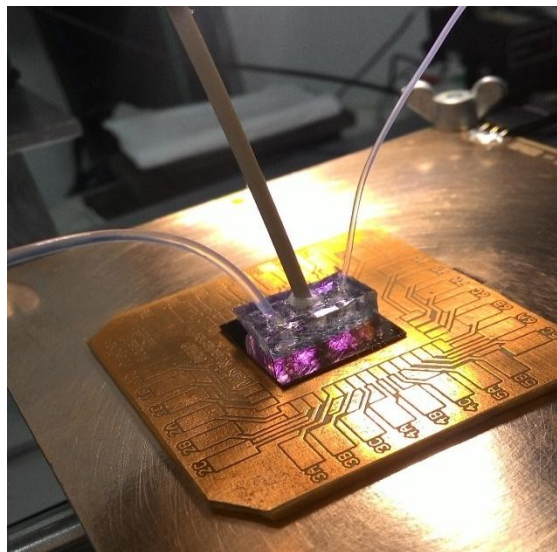
### 4.3 Eletrodo de Referência Ag/AgCl

Os eletrodos de referência têm a característica de manterem um potencial fixo e conhecido durante a realização do experimento. O eletrodo Ag/AgCl consiste de uma junção de prata com cloreto de prata, Figura 25, que mantém um potencial de 0,1 eV na junção. Tal eletrodo foi escolhido por ser de fácil manuseio e fabricação.



**Figura 25: Eletrodo de referencia. a) Eletrodo comercial ET072 da marca eDAQ. b) Esquemático mostrando o fio de prata coberto com um filme de cloreto de prata.**

A necessidade da utilização deste eletrodo de referência, é para que não ocorra corrente faradaica, ou seja, uma corrente de oxirredução, interferindo nas medidas, na concentração da solução e uma possível contaminação, além disso, o eletrodo de Ag/AgCl mantém um potencial constante em relação à solução. A Figura 26 mostra a foto do dispositivo com os tubos, de entrada e saída da solução, e o eletrodo de referência, conectados.



**Figura 26: Foto do dispositivo montado, com os micro tubos e eletrodo de Ag/AgCl conectados.**

## 4.4 Proteínas: Anticorpo e Antígeno

Proteínas são definidas como macromoléculas compostas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, sendo cada uma constituída por uma sequência linear de aminoácidos unidos entre si por ligações covalentes. Estas macromoléculas estão presentes em todos os seres vivos exercendo papéis fundamentais em diversos processos celulares como replicação celular e transporte de moléculas. Muitas proteínas são catalizadoras biológicas (enzimas) que diminuem o tempo no qual algumas reações químicas, necessárias no organismo, possam ocorrer. Outras proteínas também muito importantes para os seres vivos são os anticorpos que reagem apenas às proteínas estranhas ao organismo, os antígenos, realizando assim a sua defesa.

A reação de interação, anticorpo-antígeno, possui uma alta seletividade. Certos anticorpos reagem virtualmente somente com seu respectivo antígeno, ou seja, estes têm uma especificidade entre eles. As ligações que os unem são dos tipos não-covalentes, no entanto múltiplas ligações garantem que o antígeno será ligado fortemente ao anticorpo. Tais ligações tem origens eletrostáticas, pontes de hidrogênio ou forças de Van der Waals. A região onde ocorre esta ligação é denominada de Fab (fragment antigen-binding). A Figura 27 ilustra um antígeno e um anticorpo de forma didática.

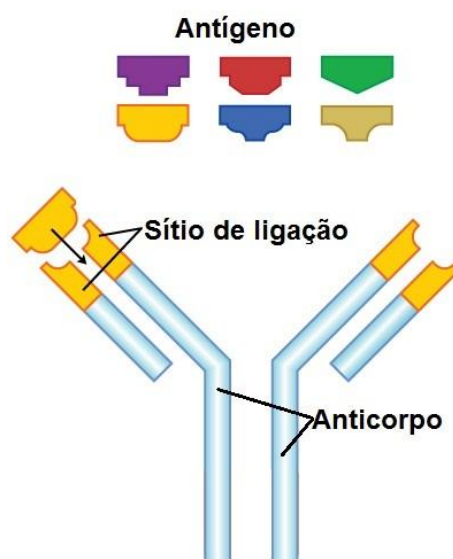


Figura 27: Estrutura de um anticorpo evidenciando o sítio de ligação. Adaptada de [51].



Como estas ligações tem origem eletroestática, a distribuição de cargas na região de ligação, na Fab, sofre uma mudança. Uma vez que o local de fixação do antígeno seja o grafeno, ou próximo a ele, podemos detectar essa mudança de densidade de cargas através da mudança de potencial. E como vimos, no Capítulo 3, quando esta ligação ocorre dentro do comprimento de Debye ela pode influenciar na dopagem do grafeno.

## 4.5 Funcionalização do Grafeno

O grafeno foi funcionalizado, primeiramente, com uma solução contendo o linker, uma molécula capaz de interagir com o grafeno e permanecer ligada a esse até, pelo menos, o final do experimento.

Funcionalizar o grafeno é fixar nele um elemento químico que fará a ponte entre o grafeno e o agente biológico, neste caso, o antígeno, a proteína ou a enzima. Neste trabalho, utilizamos o PBSE (ácido 1-pirenobutanoico succinimidil éster) para a funcionalização, como já estabelecido na literatura [33]. Como o PBSE possui baixa solubilidade em água, uma solução padrão foi feita com DMF (N-N'-dimetilformamida), onde o PBSE estava na concentração de 10 mmol/L.

O PBSE tem em sua base três anéis aromáticos (pireno), que se ligam ao grafeno através de uma ligação do tipo empilhamento  $\pi$  e no topo possui uma terminação éster ligada à amina terciária do grupo succinimidil. A ligação entre o grafeno e o PBSE é não covalente e é estável [33]. A outra extremidade do PBSE

possui uma terminação éster que se liga à grupos amina de algumas proteínas [33]. A Figura 28 ilustra uma molécula de PBSE.

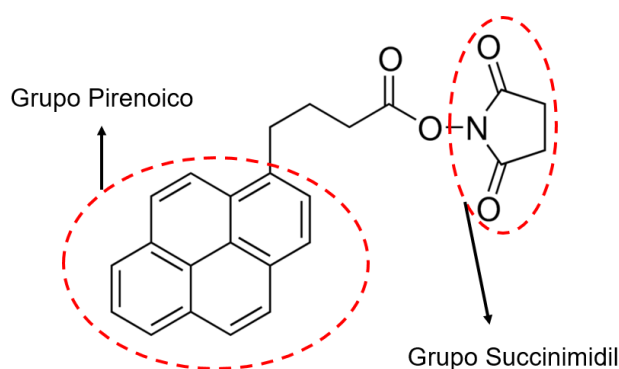


Figura 28: Estrutura do PBSE.

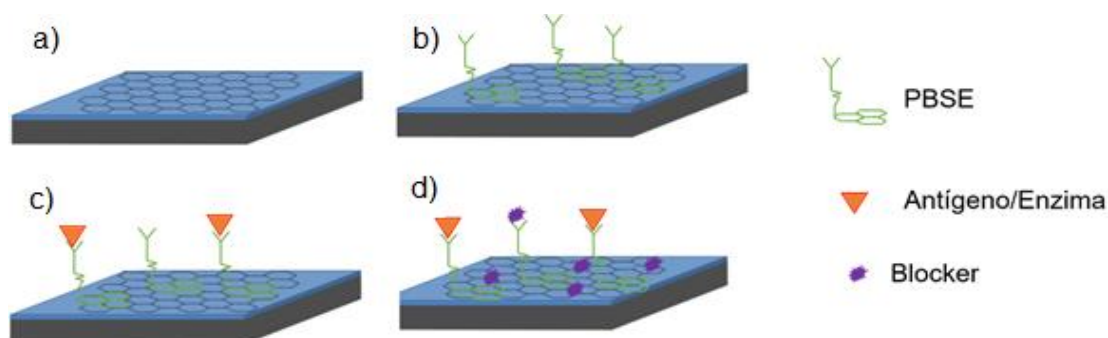
Devemos ressaltar que, no entanto, existem outras formas de realizar o ancoramento destas proteínas ao grafeno [34,33], utilizando outros elementos químicos, por exemplo a tionina. No entanto, a tionina além de promover uma significativa dopagem tipo-n, também gera uma diminuição da mobilidade dos portadores de carga no grafeno que influencia nas características do biossensor [35].

O procedimento para a funcionalização consiste em preencher o canal com a solução de DMF com PBSE por 40 minutos a fim de garantir que a ligação  $\pi$  ocorra entre o grafeno e o PBSE. Em seguida, uma solução de DMF é passada através do canal, afim de remover o excesso de PBSE que pode não ter se ligado ao grafeno. Após isso, lavamos novamente o canal com uma solução de PBS (tampão fosfato salino), que será o tampão utilizado com a proteína, com o objetivo de eliminar o DMF restante.

Com o PBSE ligado ao grafeno, preenchemos o canal com uma solução com o antígeno ou com a enzima, em uma concentração de 1-10 mmol/L para o antígeno escolhido (humana sérica, HSA) e 20-200  $\mu$ mol/L para a enzima (acetilcolinesterase) e deixamos por 18 horas em um refrigerador a 7 °C. Este tempo é suficiente para que a acetilcolinesterase ou ao antígeno, se liguem ao PBSE.

Uma solução *blocker*, uma solução que se liga facilmente ao grafeno e ao linker, é passada no canal, para que as regiões do grafeno ou do PBSE que ainda não estejam ligadas, ou seja, regiões expostas, sejam bloqueadas e assim evitamos que o anticorpo, ou outras moléculas, se liguem ali. Utilizamos, como o *blocker*, a

etanolamina, 10 mmol/L em PBS, deixamos por 30 minutos em repouso dentro do canal e lavamos com PBS novamente. Por fim, o grafeno está funcionalizado com os agentes desejados. A Figura 29 ilustra o processo.

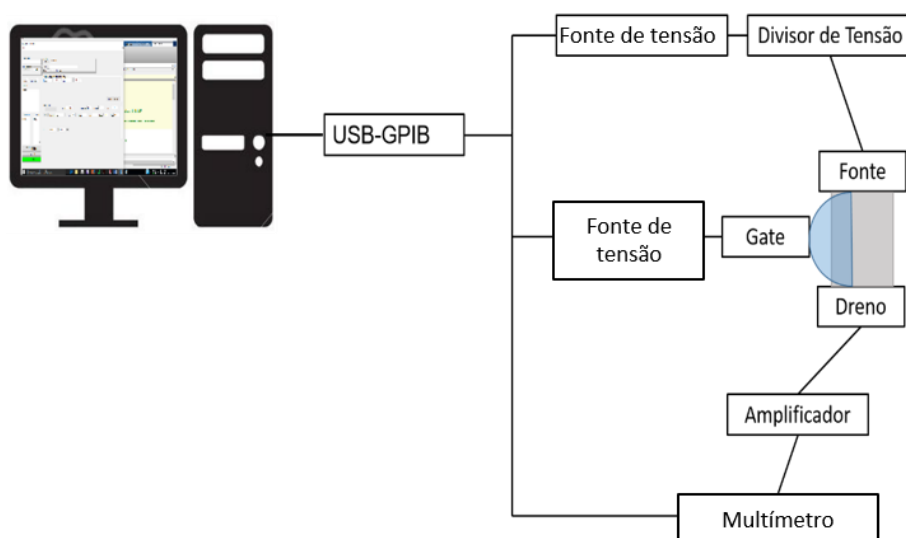


**Figura 29:** Processo de funcionalização do grafeno. (a) Grafeno limpo, pronto para ser funcionalizado. (b) grafeno com PBSE após o excesso de PBSE removido. (c) Grafeno com PBSE e com antígeno ou enzima ligado. (d) Partes ainda expostas do grafeno e do PBSE bloqueadas com blocker.

## 4.6 Montagem do Sistema de Medidas

Para realizar as medidas elétricas, utilizamos um sistema contendo os seguintes equipamentos: Uma fonte de tensão para o gate, uma fonte de tensão para aplicar tensão canal com grafeno, um multímetro como leitor da corrente no dreno e usamos um amplificador de corrente e um pré-amplificador para amplificar o sinal de dreno.

Os cabos que conectam os equipamentos à caixa de passagem são do modelo BNC. Um divisor de tensão é adicionado na saída DC da fonte de tensão (usada como fonte no canal), a fim de adicionar uma resolução no equipamento, pois este tem resolução de 1 mV apenas, com um divisor de tensão, por exemplo divisor de 100, aumentamos esta resolução para 0,01 mV. Uma caixa de passagem dos cabos BNC é usada, permitindo desligar ou aterrar algum equipamento ou contado. A Figura 30 ilustra a configuração esquemática. O dispositivo é soldado no porta-amostras e este conectado ao sistema de medida através de uma conexão SR 323.



**Figura 30: Configuração de medida, evidenciando em cinza o grafeno entre a Fonte e o Dreno, e o líquido em azul.**

O sistema de medidas é automatizado e controlado através do programa MatLab®, usando como a interface de comunicação um cabo USB para GPIB (National Instruments®).

Para obter um fluxo contínuo da solução através do canal de macrofluídica, uma seringa contendo a solução foi posicionada a uma altura de 30 cm acima do canal, com um tubo de silicone fazendo a conexão entre eles. Com esta altura obtemos um fluxo de aproximadamente 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , observando que na faixa de (10 a 30)  $\mu\text{L}/\text{min}$  os ruídos nas medidas são reduzidos.

O amplificador é ajustado para que amplifique o sinal, de forma a melhorar as medidas, uma vez que ruídos na medida são minimizados. Com os equipamentos devidamente calibrados e conectados ao computador iniciamos as medidas. O biossensor foi dividido em três categorias: sensor de pH, sensor de acetilcolina e sensor

de albumina humana sérica (HSA). Cada um destes biossensores foi estudado, os resultados obtidos expostos e discutidos no capítulo seguinte.

# Capítulo 5

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

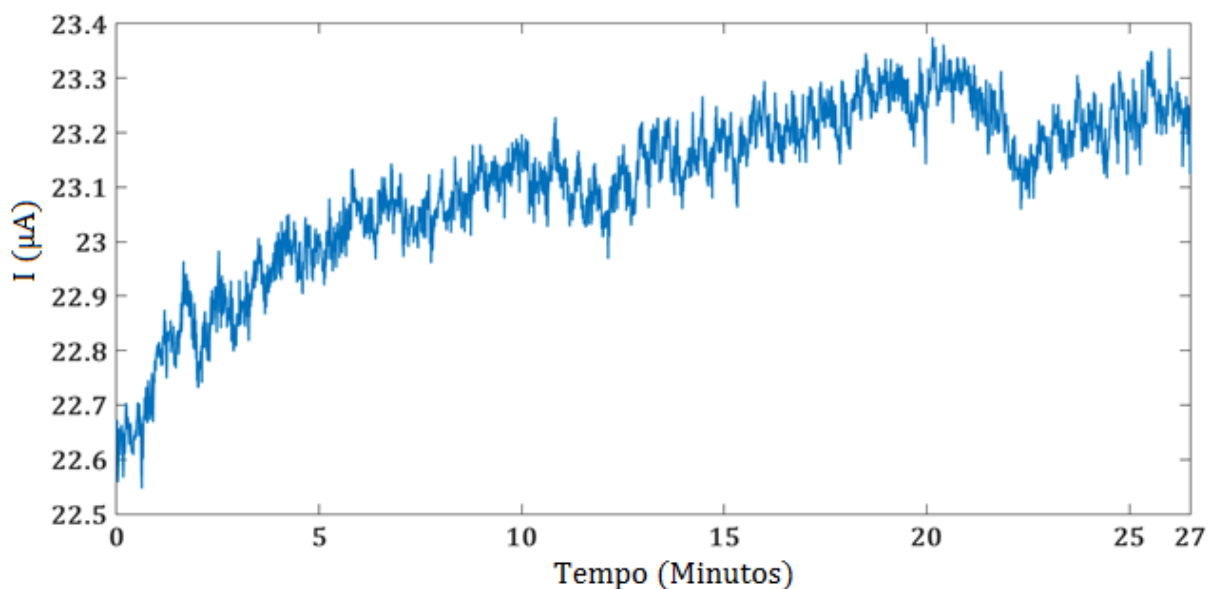
---

Neste capítulo, vamos expor e discutir os principais resultados obtidos durante este trabalho de mestrado. O capítulo contém uma seção que expõem os resultados e problemas enfrentados com o uso do PDMS no formato de piscina, cuja a solução era mantida em repouso sobre o grafeno. As 3 seções seguintes, contém os resultados dos três tipos de biossensores confeccionados com o PDMS na arquitetura de macrofluídica: sensor de pH, sensor de acetilcolinesterase e sensor de anti-HSA. Por fim, discutiremos as possíveis melhorias e objetivos futuros.

### 5.1 Uso do PDMS em Arquitetura de Piscina

Vários dispositivos foram fabricados usando a configuração ilustrada na Figura 20, contida no Capítulo 4. No entanto, apesar dessa arquitetura ser mais prática, uma vez que a solução de trabalho é mantida em repouso no dispositivo, todos os dispositivos com essa configuração apresentaram alguns problemas de instrumentação e medidas. Estes problemas serão expostos nesta seção.

Ao adicionar a solução de PBS dentro da piscina de PDMS e aplicar uma tensão  $V_{SD}$ , era necessário esperar um longo tempo para que a corrente,  $I_{SD}$ , se estabilizasse. A Figura 31 contém o resultado de uma dessas medidas.



**Figura 31: Resultado da medida desmostrando que a medida além de ruidosa leva um longo tempo para estabilizar.**

Observamos que, 27 minutos não foram suficientes para que a corrente  $I_{SD}$  se estabilizasse, além disto, notamos através das oscilações que a medida é ruidosa. Estes ruídos, somados ao tempo necessário para que a corrente  $I_{SD}$  estabilize, inviabilizam as medidas de detecção do biossensor pois, quando a molécula desejada for detectada no biossensor a variação da corrente será camuflada pelos ruídos e pelo tempo de estabilização de  $I_{SD}$ .

Um outro problema enfrentado ao utilizar esta arquitetura, foi: ao inserir a solução que contém a molécula a ser detectada no sistema, por exemplo ao gotear 10 µL de anti-HSA (10 mmol/L), o sistema era perturbado. Uma possível explicação é que a camada de cargas formada na interface grafeno/solução é perturbada e esta perturbação inseria um grande ruído na medida. A Figura 32 contém o resultado da medida e destaca o ruído no momento em que adicionamos as gotas de anti-HSA.

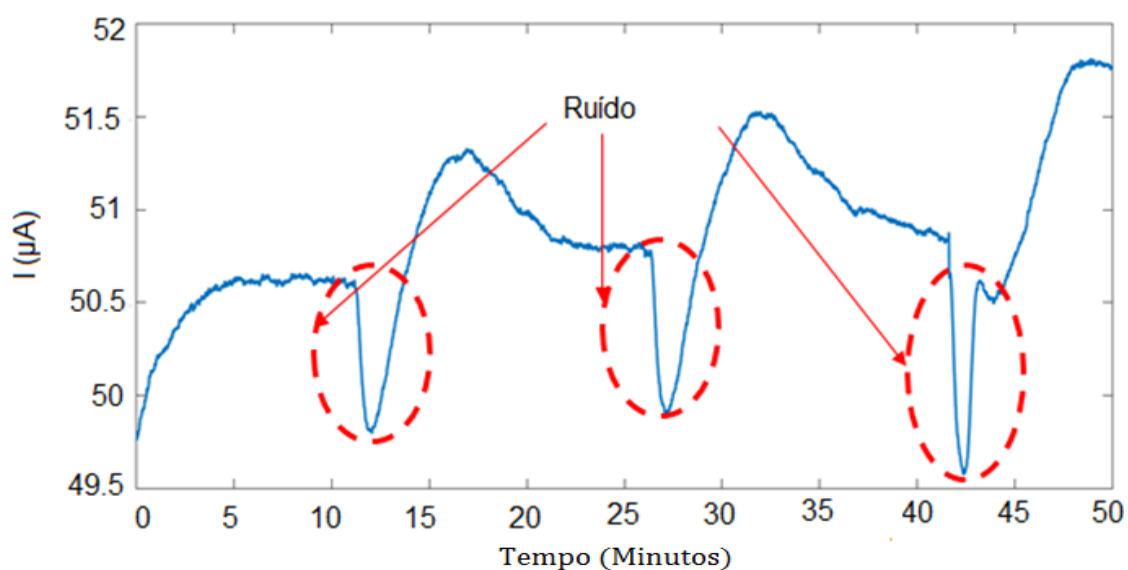


Figura 32: Resultado de uma medida usando a configuração de piscina. Em destaque os ruídos inseridos no sistema ao gotejar uma solução.

Diante destes problemas, essa arquitetura de piscina passou a não ser utilizada neste trabalho e para contornar tal problema o canal de macrofluídica, descrita no capítulo 4, foi desenvolvida para substituir a piscina. Nas seções seguintes vamos expor e discutir os resultados obtidos utilizando o canal de macrofluídica.

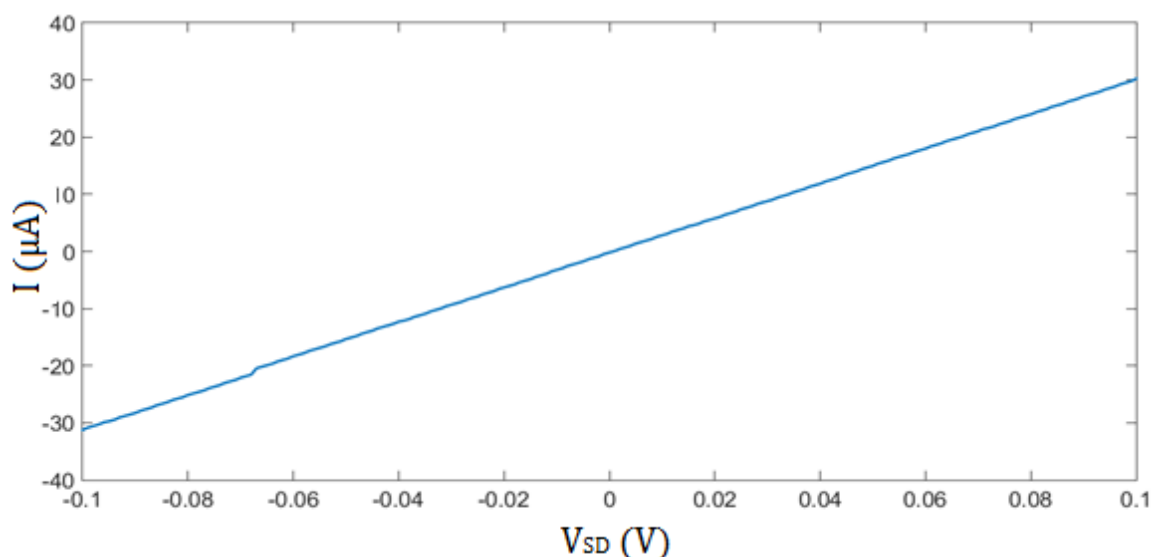
## 5.2 Grafeno como Sensor de pH

As medidas do sensor de pH fundamentam-se na verificação de como as curvas de *gate* do grafeno se comportam quando este está em um meio com diferentes pH. Para tanto, usamos uma solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com pH caracterizado.

Colocamos o PBS desejado na seringa e ajustamos para o fluxo desejado, e com o PBS fluindo pelo canal, medimos uma curva de *gate*. Em seguida, colocamos outro PBS com pH diferente e, novamente, é feita a medida, e assim sucessivamente, até medir todas as soluções com os pH desejados.



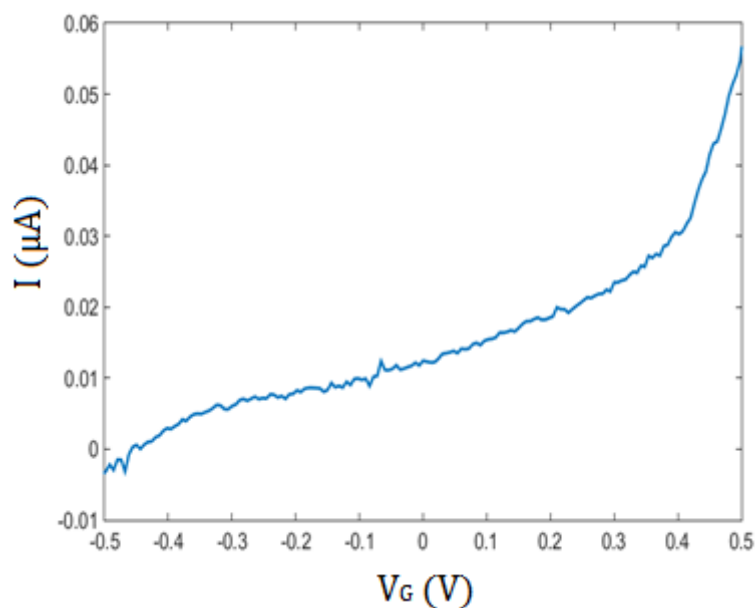
A primeira medida, tem o objetivo de verificar a resistência de contato grafeno/ouro, e se este contato é ôhmico. Para efetuar tal medida, não há fluxo de solução pelo canal. Variamos a tensão  $V_{sd}$  de -100 mV até 100 mV e o resultado obtido é mostrado Figura 33.



**Figura 33: Resultado da medida do comportamento resistivo do dispositivo. Curva ôhmica com resistência de 4,3 k $\Omega$ .**

Verifica-se, através do resultado obtido, que o contato é ôhmico e possui uma resistência de 4,3 k $\Omega$ . Ressaltamos que, as medidas de resistência de todos os dispositivos fabricados, inclusive os não incluídos neste trabalho, foram ôhmicas e tiveram valor entre 1,5 k $\Omega$  e 4,5 k $\Omega$ .

Após estabelecido as condições de contato do dispositivo, são feitas as medidas de fuga do sistema. As medidas de fuga são realizadas sem  $V_{SD}$  (o equipamento que aplica  $V_{SD}$  é desconectado do sistema), somente uma tensão  $V_G$  é aplicada e variada e, portanto, medimos a corrente de fuga entre o eletrodo de *gate* e o dreno através da solução,  $I_{Fuga}$ , a Figura 34 contém o resultado desta medida.



**Figura 34: Medida de uma corrente de fuga entre o eletrodo e o dreno do dispositivo.**

Esta curva mostra que, a corrente de fuga,  $I_{\text{Fuga}}$ , é muito menor que a corrente de medida, como veremos mais adiante, uma vez que está na segunda casa decimal (em  $\mu\text{A}$ ), ou seja, três ordens de grandeza menor. O aumento da corrente de fuga a partir  $0,4 \text{ V}$  é devido a reação de hidrólise da água e, portanto, não aplicamos  $V_G$  maiores que  $0,5 \text{ V}$  pois a partir deste ponto a corrente de fuga pode atrapalhar as medidas.

Estabelecidas as condições de contato e de fuga do dispositivo, são realizadas medidas de curva de *gate* com um fluxo de PBS, com diferentes pH, pelo canal. O fluxo de PBS foi ajustado em  $15 \mu\text{L}/\text{min}$ .

Escolhemos uma tensão  $V_{\text{SD}}$  de  $100 \text{ mV}$  e variamos a tensão de *gate*,  $V_G$ , de  $-200 \text{ mV}$  a  $200 \text{ mV}$ . Realizado tal procedimento para cada solução, foi executado um plote de todas as curvas de *gate* em uma mesma Figura 35.

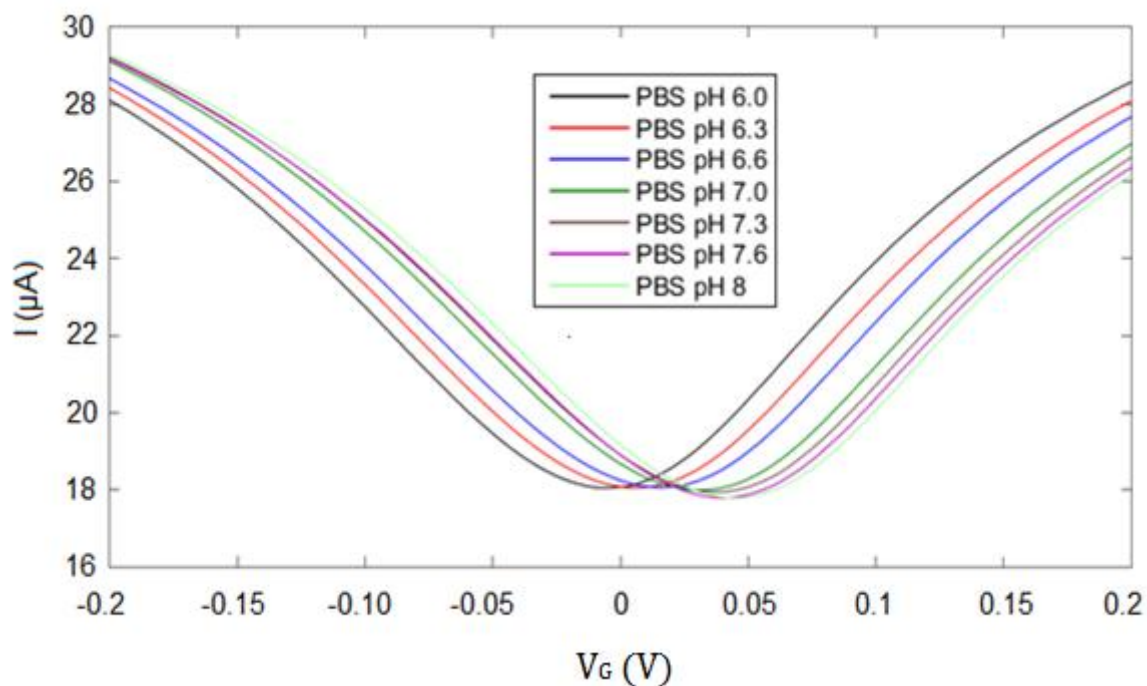


Figura 35: Curvas de Gate para PBS com diferentes pH.

Observamos que CNP das curvas de *gate* se deslocam para a direita com o aumento do pH da solução, indicando que o grafeno fica mais dopado tipo-p apontando uma transferência de cargas positivas para o grafeno, como explicado no Capítulo 3.

Notamos também, que não há uma mudança considerável no mínimo de condução e que a inclinação das curvas para região de condução tipo-p e tipo-n não muda. Isto indica que, a mudança de pH da solução não adiciona defeitos ou centros de espalhamento no grafeno [32], ou seja, não muda a mobilidade.

Para analisar o deslocamento horizontal das curvas de *gate*, construímos um gráfico contendo o mínimo de condutividade por pH, Figura 36.

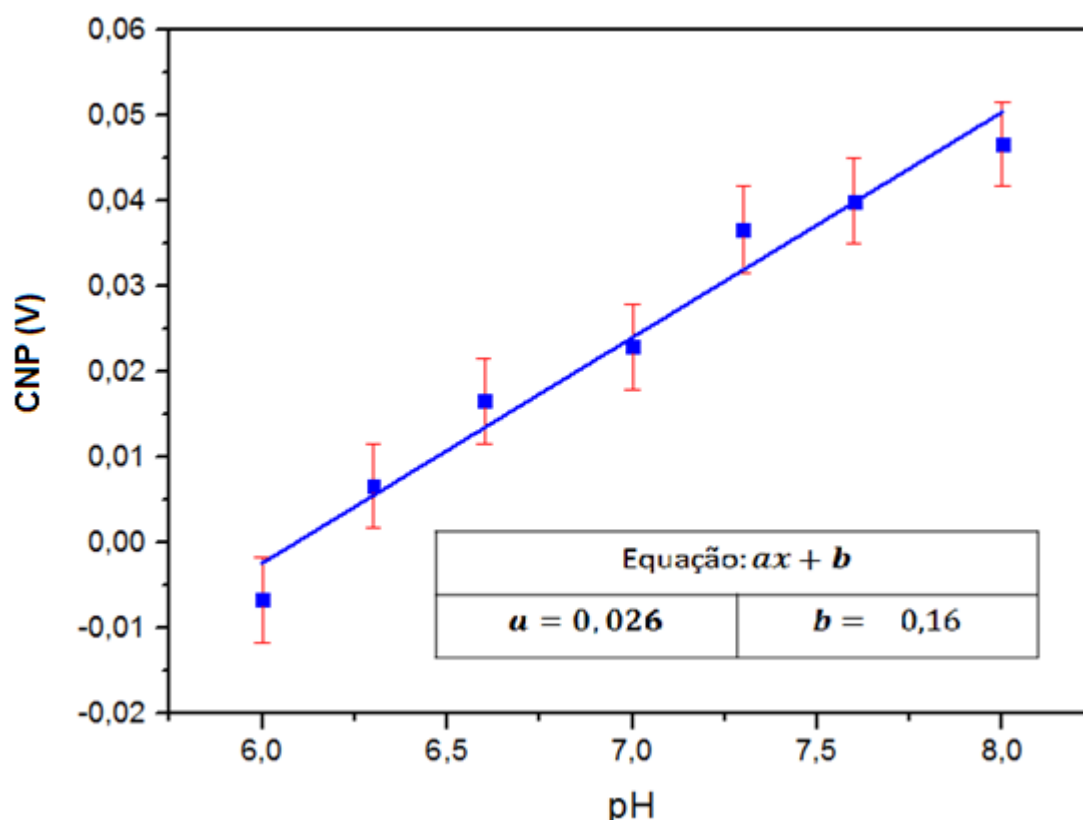
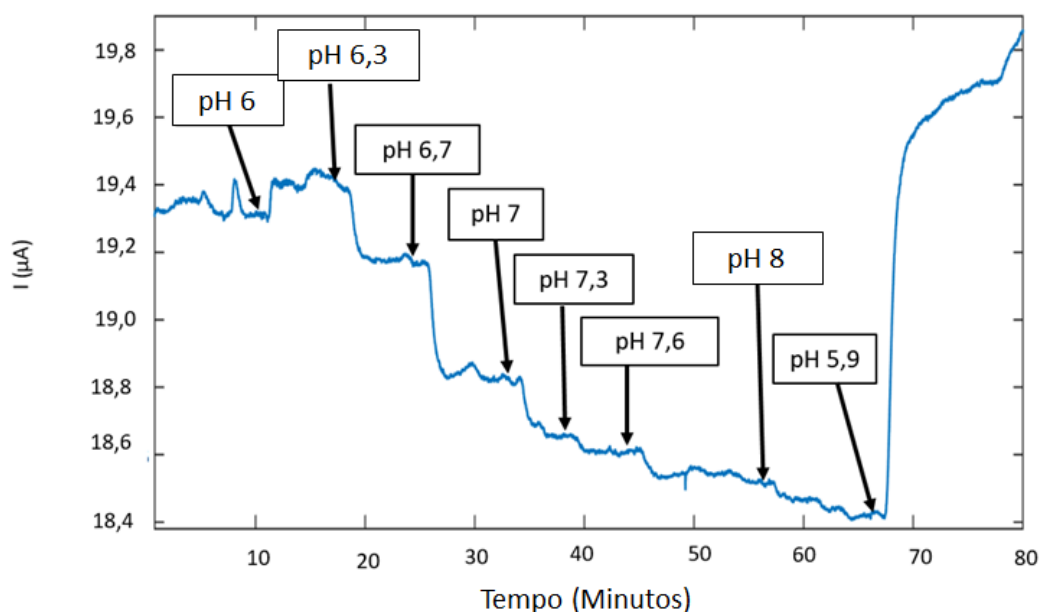


Figura 36: Valor da tensão de gate do mínimo de condutividade por pH da solução.

No inset da Figura 36, temos que o coeficiente angular da curva é 0,026, ou seja, 26 mV/pH um valor próximo ao encontrado na literatura [36],[37]. Em equipamento de medidas de pH, comerciais, a resolução pode chegar a 0,01 pH.

Em um segundo dispositivo, confeccionado para medir pH, escolhemos uma tensão  $V_{SD}$ , fixamos uma tensão  $V_G$  e monitoramos a corrente  $I_{SD}$  enquanto mudamos o pH das soluções no canal. Foi escolhido uma tensão  $V_{SD}$  de 100 mV, uma tensão  $V_G$  de 100 mV e o fluxo de solução ajustado em 15  $\mu\text{L}/\text{min}$ . No momento em que o PBS na seringa atingia um valor menor que 50  $\mu\text{L}$ , uma nova solução com pH diferente era adicionada. A Figura 37 contém o resultado da medida. As setas indicam o momento em que o PBS foi adicionado.



**Figura 37:** Gráfico contendo resultado da corrente para tensão de fonte e tensão de gate fixos. As setas indicam o momento em que um novo PBS com pH diferente é adicionado.

Observamos que este resultado está de acordo com os da curva de *gate*, pois, como escolhemos uma tensão  $V_G$  igual a 100 mV, estamos na região de condução por elétrons e nesta região a condutividade do grafeno diminui com o aumento do pH. Além disto, há um atraso, de 1 minuto 30 segundos entre a adição da solução de PBS e a mudança da corrente no dispositivo. Este atraso é o tempo que a solução leva para percorrer o tubo que liga a seringa ao canal no dispositivo.

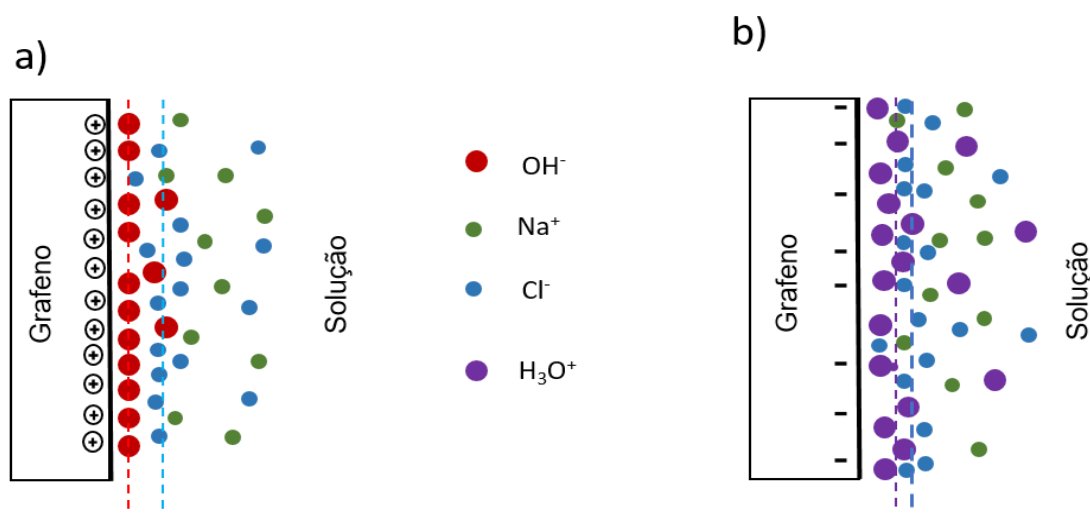
Concluimos, através da arquitetura e métodos empregados neste dispositivo, que o grafeno é sensível ao pH do meio e que o dispositivo é eficaz para medidas de pH. Observamos também que, o sistema é reversível, uma vez que ao inverter o pH da solução, a corrente retorna para os valores anteriores.

### 5.2.1 Discussão do Sensor de pH.

Alguns trabalhos vêm mostrando que o grafeno é sensível a mudanças de pH no ambiente aquoso no qual ele está imerso. Apesar de poucos trabalhos e estudos a respeito do grafeno como um sensor pH, avanços no entendimento deste

mecanismo têm sido alcançados. Nesta seção vamos mostrar a atual interpretação para este mecanismo.

Simulações computacionais [38] mostraram que, em solução aquosa, íons  $\text{OH}^-$  e íons de  $\text{H}_3\text{O}^+$  são mais localizados na interface hidrofóbica, que é o caso do grafeno/água [39], [40]. Adicionalmente foi mostrado também que a interação entre o dipolo permanente do  $\text{OH}^-$  e a superfície da água é o mecanismo dominante de adsorção em interfaces hidrofóbicas [41]. O acúmulo de  $\text{OH}^-$  ou  $\text{H}_3\text{O}^+$  faz com que alguns destes íons sejam adsorvidos na superfície do grafeno, levando à uma modulação dos portadores de cargas no canal, induzindo cargas no grafeno, Figura 38.



**Figura 38:** Formação da bicamada que induz cargas no grafeno devido a organização dos íons de  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$  na interface grafeno/solução. (a) Adsorção de  $\text{OH}^-$  induzindo buracos no grafeno, dopando-o tipo-p. (b) Adsorção de  $\text{H}_3\text{O}^+$  induzindo elétrons no grafeno, dopando-o tipo-n.

Têm-se especulado que íons de  $\text{OH}^-$  possuem uma melhor organização na interface e portanto induzem mais buracos no grafeno, devido à interação dos elétrons no orbital  $p_x$  do oxigênio no  $\text{OH}^-$  e o orbital  $p_z$  (orbitais  $\pi$ ) do grafeno [36].

Outros íons como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , por exemplo, não se organizam de tal forma na interface. O  $\text{Na}^+$  sofre solvatação pelas moléculas de água e ficam dispersos na solução. O  $\text{Cl}^-$  apesar de também se concentrar próximo a interface, permanece mais distante do mesmo em comparação com o  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$ . Desta forma o grafeno mais sensível às concentrações de  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}_3\text{O}^+$ , que são os íons que se concentram próximo a interface, veja Figura 39.

### 5.3 Caracterização da Funcionalização

A funcionalização, como visto no capítulo 4, consiste em imobilizar moléculas no grafeno. A fixação destes componentes, pode promover defeitos, transferir cargas para o grafeno e, portanto, mudar algumas de suas propriedades elétricas, por exemplo, o mínimo de condutividade e a mobilidade elétrica. Com a finalidade de estudar e caracterizar essas possíveis mudanças nas características do grafeno, medidas de curva de *gate* foram realizadas.

O processo de caracterização utilizado consiste em realizar uma curva de *gate* para cada etapa de funcionalização: grafeno sem funcionalização, grafeno + PBSE e grafeno + PBSE + HSA. Após a obtenção destas medidas, os resultados foram comparados. A Figura 39 contém o resultado destas medidas.

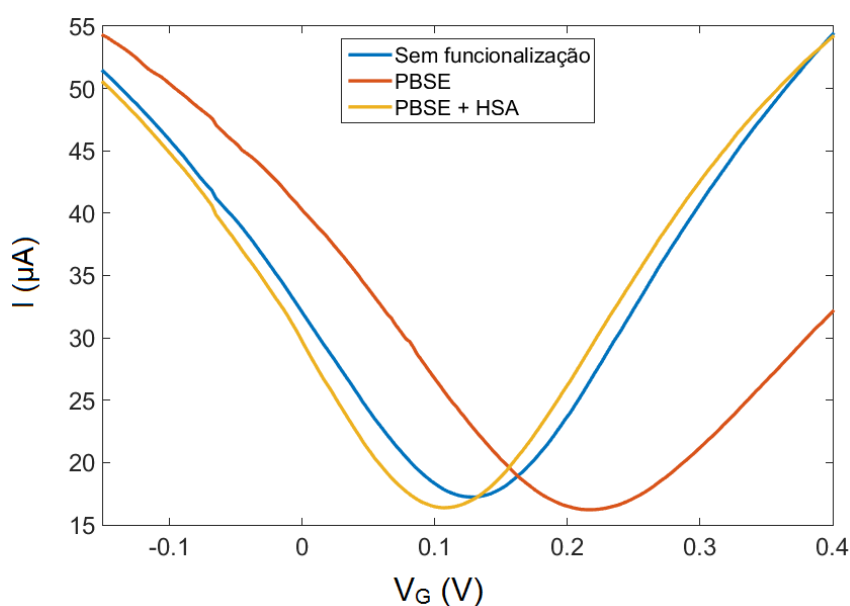


Figura 39: Comparação das curvas de *gate* em diferentes etapas da funcionalização.

Os resultados indicam que a funcionalização do grafeno com o PBSE promove uma dopagem tipo-p no grafeno, realizando pequenas alterações na mobilidade elétrica e no mínimo de condutividade. Este resultado indica o PBSE é um bom agente de funcionalização do grafeno.

Ao funcionalizar o grafeno com PBSE+HSA observamos que o HSA promove uma dopagem tipo-n no sistema, fazendo com que a mobilidade elétrica volte para valores próximos às do grafeno sem funcionalização.

Assim, podemos afirmar que a funcionalização do grafeno foi efetiva, pois demonstramos que estas moléculas de fato se ligaram ao grafeno sem grandes alterações em suas propriedades elétricas.

## 5.4 Sensor de Acetilcolina

O sensor de acetilcolina, consiste em utilizar o dispositivo funcionalizado com o linker (PBSE) e a enzima acetilcolinesterase ligada ao linker. A acetilcolinesterase, ao entrar em contato com a acetilcolina, consegue clivar a acetilcolina resultando nos produtos colina mais ácido acético, Figura 40, que reduz o pH da solução.

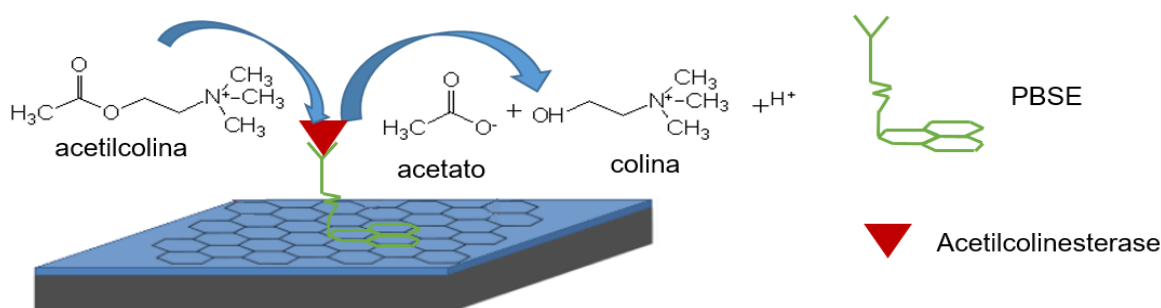


Figura 40: Clivagem da acetilcolina pela acetilcolinesterase.

Com o grafeno funcionalizado, da forma descrita na Figura 39, uma medida da resistência foi feita para averiguar as condições do contato grafeno/ouro. Uma tensão de  $V_{SD}$  foi aplicada, de -100 mV até 100 mV e novamente verificamos que o contato é ôhmico, agora com uma resistência de 4k $\Omega$ .

Assim, estabelecido as condições de contato, realizamos uma medida de *gate*, exibido na Figura 41, escolhemos uma tensão  $V_G$ , cuja a curva possui a maior inclinação, ou seja maior mobilidade dos portadores de carga. Esta escolha tem como



base, que neste ponto é onde a condutância é mais sensível às modificações de dopagem no grafeno, exemplificada no *inset* da Figura 41.

Iniciamos a medida para detectar a reação da acetilcolinesterase-acetilcolina. Para essa medida, ajustamos o fluxo de PBS em 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , escolhemos uma tensão  $V_{\text{SD}}$  em 10 mV e um tensão de *gate* de -50 mV (maior inclinação da curva de *gate*).

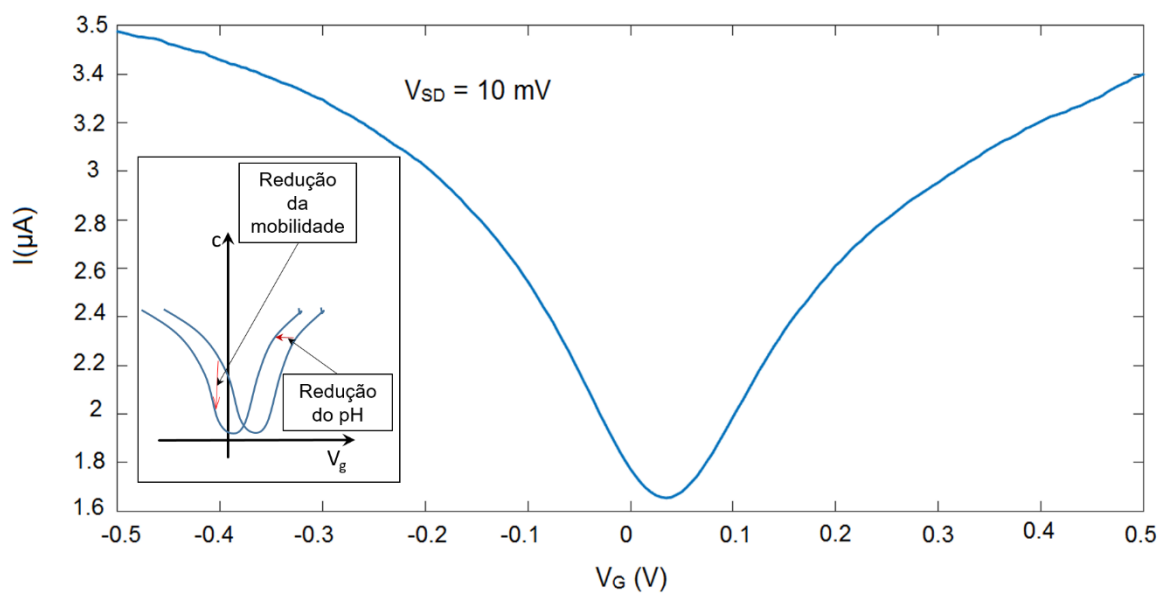


Figura 41: Curva de *gate*.

Em um determinado momento a solução de PBS foi substituída por PBS + acetilcolina em uma concentração de 3,33 mmol/L, em seguida esta solução foi substituída por PBS + acetilcolina em uma concentração de 6,66 mmol/L. O resultado é mostrado na Figura 42.

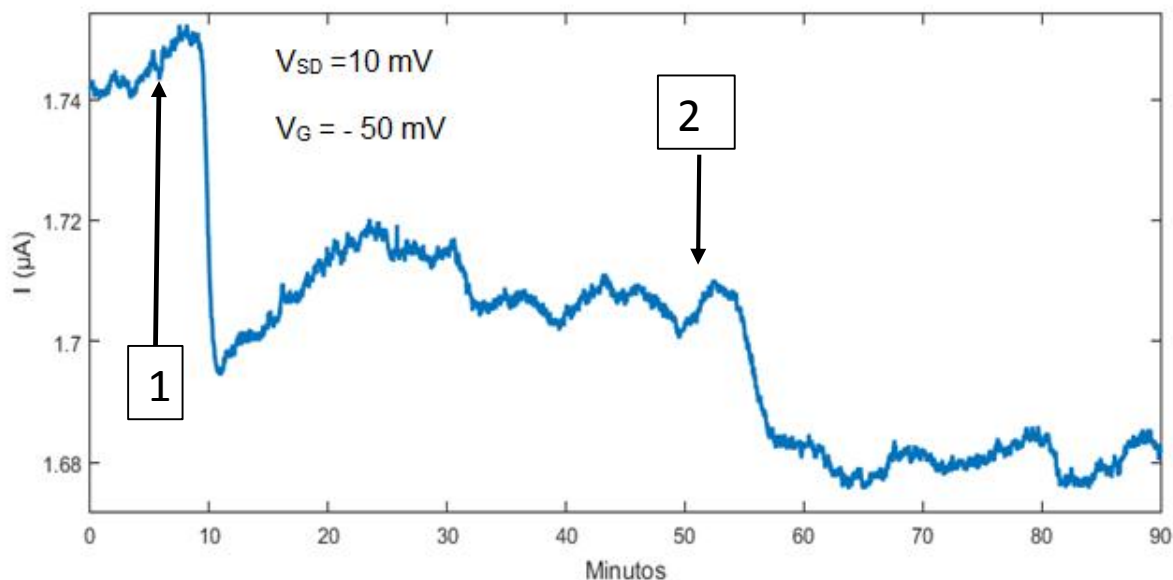


Figura 42: Gráfico de corrente por tempo indicando o momento em que ocorreu a primeira substituição e a segunda substituição.

Uma segunda medida, com a mesma configuração, foi realizada para verificar se a reação é reversível. Então, após adicionar a acetilcolina e o sistema atingir o equilíbrio, a solução, PBS + acetilcolina em uma concentração de 10 mmol/L, foi substituída por apenas PBS.

Observando o resultado, contido na Figura 43, que removendo a acetilcolina a corrente volta ao valor anterior. Indicando que o sistema é reversível.

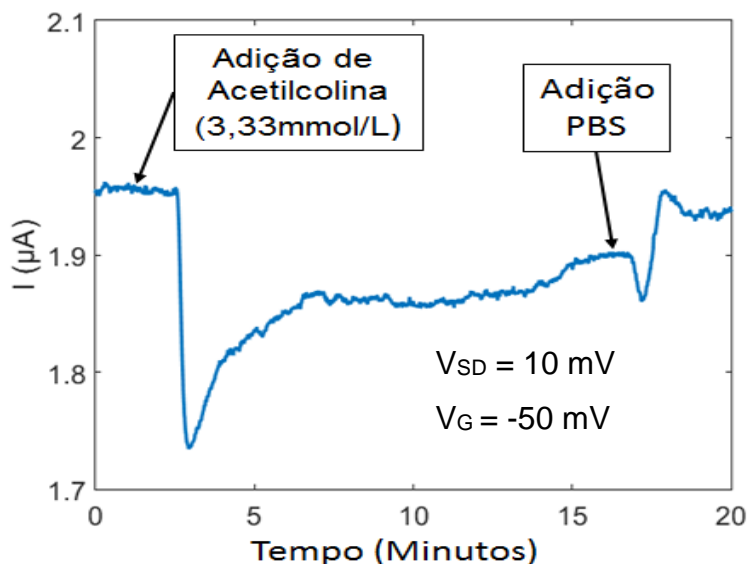


Figura 43: Gráfico indicando momento em que o PBS + acetilcolina foi inserida, e quando a solução de apenas PBS foi inserida.

Por último, averiguamos se o sistema é seletivo. Com o biossensor mantido na configuração anterior, foi adicionado no canal PBS + anti- HSA (3,33 mmol/L), proteína que em princípio não reage com acetilcolinesterase. Através da Figura 44, podemos notar que não é observado nenhuma mudança considerável na corrente no Dreno.

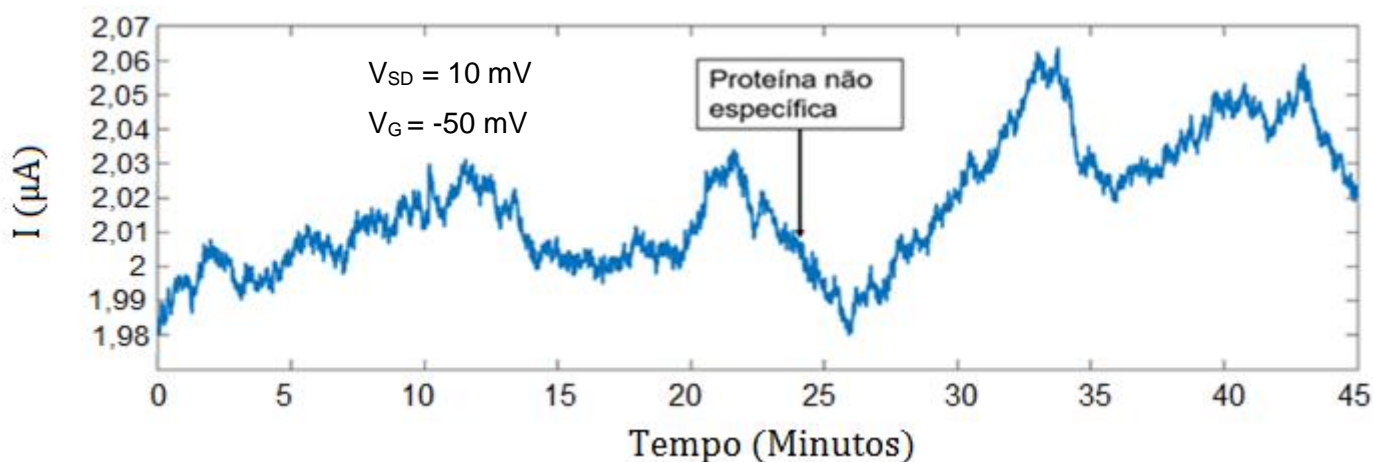


Figura 44: Gráfico indicando a adição da proteína não específica.

### 5.4.1 Discussão do Sensor de Acetilcolina

Sensores de efeitos da ação enzimática não são novidades na literatura [42]. Até sensores de acetilcolinesterase já foram explorados, porém com o uso de óxido de grafeno. No nosso caso, mostramos o mesmo efeito observado em grafeno CVD.

Os resultados obtidos mostram que a funcionalização do grafeno com PBSE e acetilcolinesterase é eficiente para o sensoriamento da acetilcolina. Devemos salientar que, este sensoriamento é feito indiretamente, pois medimos a mudança de pH da solução, induzida pela quebra da acetilcolina.

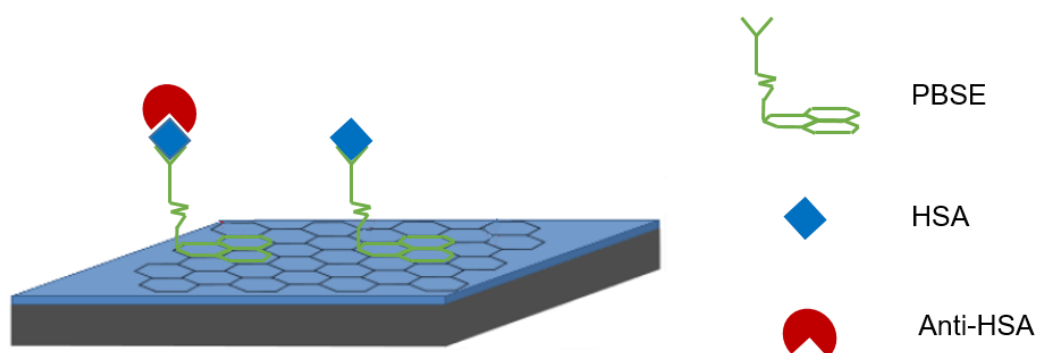
O efeito da ação enzimática pode ser visualizado pela formação de ácido acético (Figura 40), que é ionizado em pH 7,0, o qual foi utilizado em todos os experimentos com a enzima. Devemos ressaltar que apesar de ligada ao PBSE esta enzima continua ativa fazendo a quebra da acetilcolina. Com isso, há um aumento da concentração de íons  $H^+$ , que leva à diminuição do pH da solução, alterando a dopagem do grafeno, modificando o número de cargas que se localizam na interface do grafeno/solução, de forma similar à observada com a mudança de pH, o que corrobora o fato do grafeno ser um sensor de pH, veja o *inset* da Figura 41.

Pode-se presumir que a acetilcolinesterase, a enzima, está imobilizada ao grafeno pelo linker, com isso, os produtos formados pela quebra da acetilcolina (colina+acetato) se difundem pela solução. A partir dos pressupostos do estado-estacionário [43], toda enzima entra em uma fase estacionária, onde a velocidade de formação de produto se mantém constante ao longo do tempo, essa fase pode ser bem visualizada pelo platô observado logo após a adição contínua de acetilcolina. Com sucessivas adições de concentrações cada vez mais altas de acetilcolina, seria possível observar uma curva de velocidade  $\times$  concentração de substrato e, assim, determinar as constantes cinéticas da enzima, como  $k_{cat}$  e  $K_m$ .

Isso indica que a metodologia com grafeno pode ser bastante útil para estudar cinética enzimática e os efeitos que algumas substâncias podem ter de inibir a atividade enzimática. Isto abre a possibilidade de desenvolver um sensor de glifosato (N-(fosfometil) glicina), um herbicida, largamente usado na agricultura e muito nocivo à saúde humana.

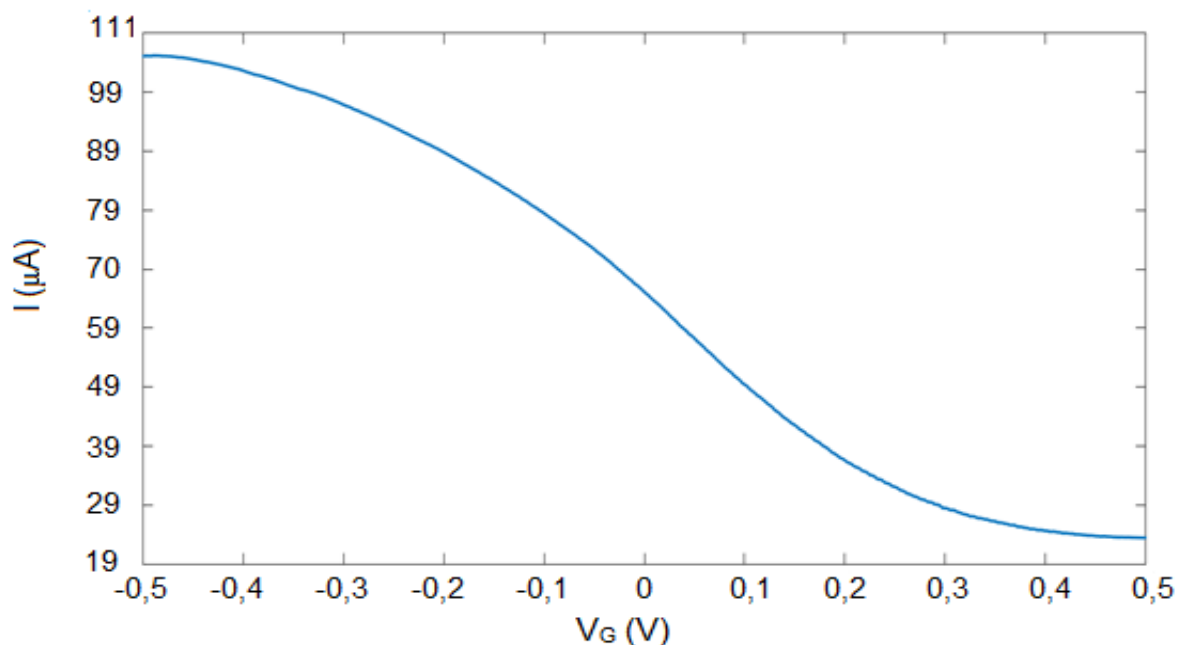
## 5.5 Sensor da Proteína Anti-HSA

Para este biossensor o grafeno, é funcionalizado com o linker e o antígeno HSA. O anti-HSA se liga ao HSA, e assim, modifica as propriedades da bicamada de cargas que se forma na interface grafeno/solução, ilustrado na Figura 45.



**Figura 45: Funcionalização do grafeno com PBSE + HSA e a ligação da anti-HSA ao HSA.**

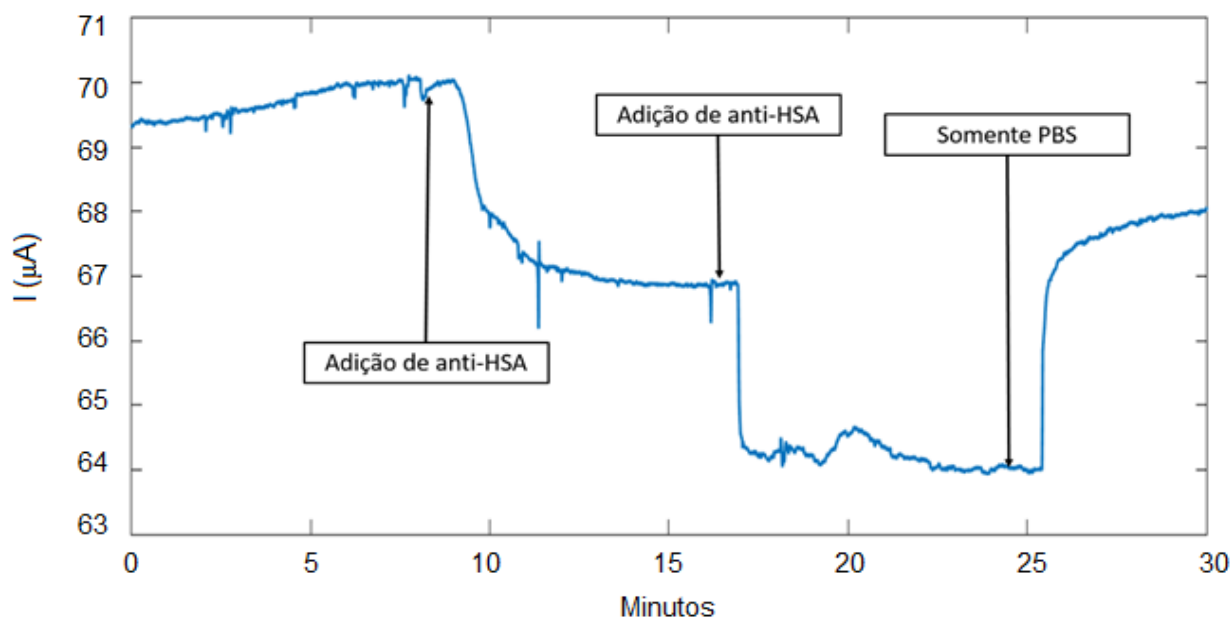
A primeira medida realizada, foi de caracterização do contato. Obtemos um contato ôhmico de resistência igual a 2.5 k $\Omega$ , em seguida uma medida de curva de *gate* onde a tensão  $V_{SD}$  foi fixada em 100 mV: Figura 46.



**Figura 46:** Gate para o dispositivo funcionalizado para detecção de anti-HSA.

Observamos que, o dispositivo estava altamente dopado tipo-p, possivelmente devido ao processo de transferência do grafeno para o substrato de Si/SiO<sub>2</sub> (descrito no apêndice A).

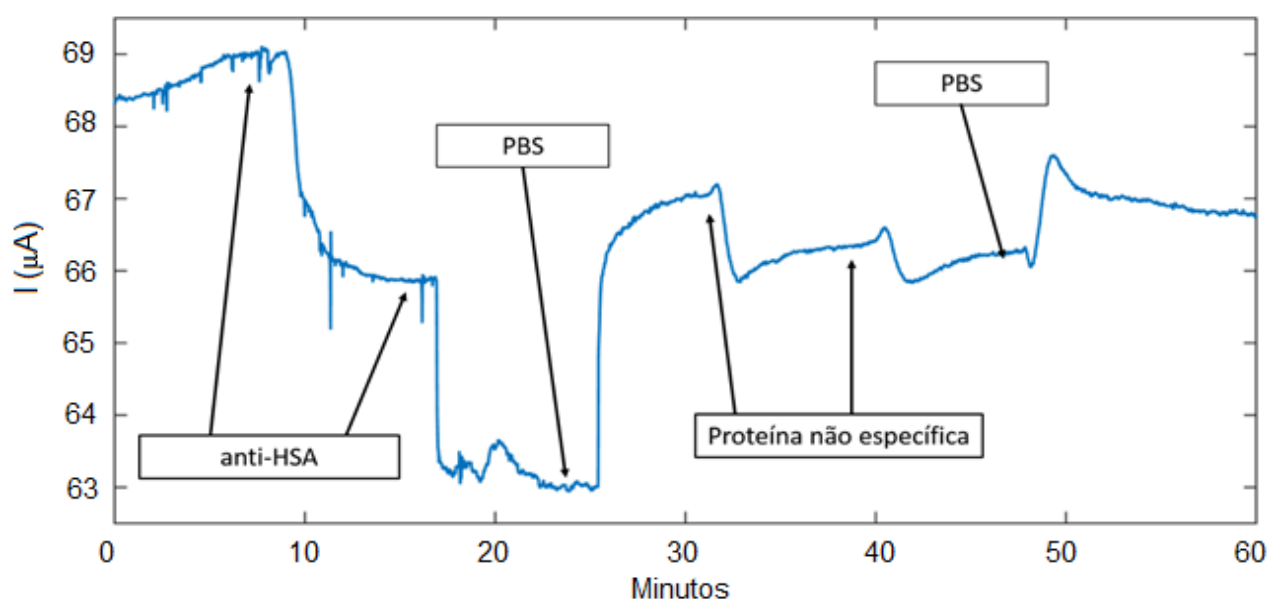
Para verificar se há detecção da proteína desejada (anti-HSA), um fluxo de PBS foi ajustado para 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ , a tensão de  $V_{SD}$  fixada em 100 mV, a tensão  $V_G$  em -75 mV e monitoramos a corrente no Dreno. Após 8 minutos, a solução de PBS foi substituída por PBS + anti-HSA, 3,33 mmol/L, esperamos estabilizar e novamente substituímos essa solução por PBS + anti-HSA, 6,66 mmol/L, em seguida voltamos somente a solução de PBS. O resultado obtido é exportado na Figura 47.



**Figura 47:** Gráfico obtido do sensor de anti-HSA. As setas indicam o momento em que a solução foi substituída na seringa.

Verificamos que, ao voltar para o PBS, a corrente não retorna ao valor anterior. Isto é devido ao fato de que o HSA se liga fortemente com a anti-HSA e esta ligação não é facilmente desfeita.

Também realizamos medidas para verificar se o dispositivo é seletivo. O procedimento é semelhante ao descrito anteriormente, porém no lugar de PBS+ anti-HSA foi adicionado PBS+ anti-G.A.M humano. A Figura 48 exibe o resultado.



**Figura 48:** Resultado da medida do biossensor, com as setas indicando o momento em que as soluções foram inseridas no sistema

Observamos que houve uma pequena mudança, mas ainda apreciável, na corrente  $I_{SD}$ , que indica uma possível interação da proteína anti-G.A.M humano com regiões ainda exposta do grafeno ou do PBSE, indicando que o procedimento de *blocker* pode não ter sido efetivo. Esta interação, anti-G.A.M humano com o grafeno, pode ter dopado o grafeno ou adicionados defeitos no mesmo, mudando sua condutividade.

### 5.5.1 Discussão de Sensor de Anti-HSA

Os resultados obtidos demonstram que, o dispositivo foi capaz de detectar a proteína desejada. Entretanto, tal dispositivo não pode ser reutilizado, pois a ligação HSA-anti-HSA não é facilmente desfeita. Observamos que, ao retornar o fluxo de PBS apenas, a corrente não volta a valores iniciais, indicando que este método de lavar não é eficiente. Os sítios de ligação continuam ocupados. Tal observação é importante para salientar a especificidade e seletividade do sistema para a detecção de uma molécula-alvo. Estudos anteriores demonstraram que a ligação entre a porção Fab de um anticorpo possui um baixo valor de  $K_d$ , indicando uma alta especificidade [44].



Devido a esta alta afinidade, somente o anticorpo específico se liga ao seu antígeno e, portanto, apenas esta ligação modifica a densidade de carga próximo a dupla camada de carga na interface, modificando a capacitância do sistema. Observando o gráfico contido na Figura 46, notamos que essa mudança na dupla camada de carga promove uma dopagem tipo-n no sistema, ilustrada na Figura 49, diminuindo a condutividade do sistema, que reforça a validade do resultado.

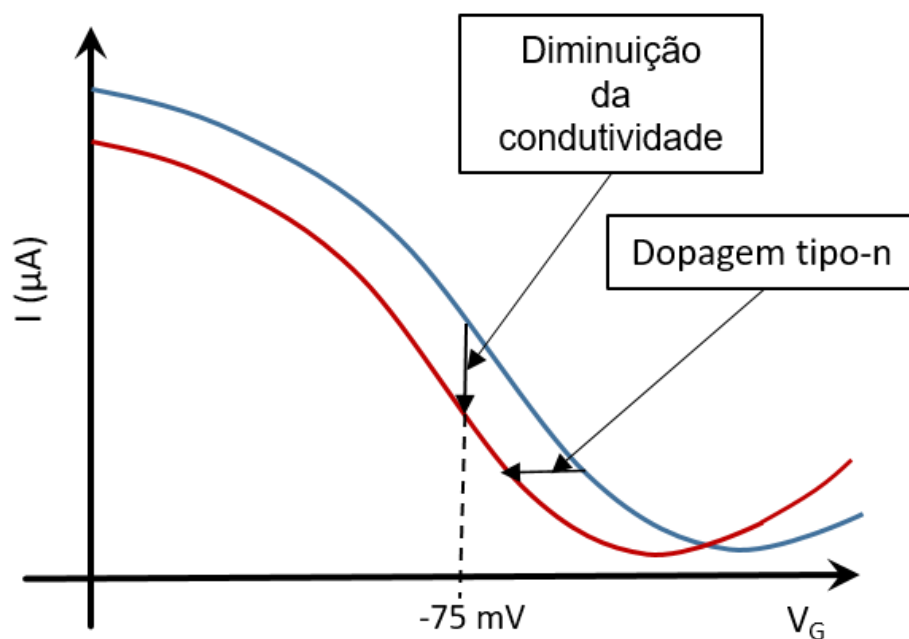


Figura 49: Figura ilustrativa da dopagem tipo-n, destacando a diminuição da condutividade para  $V_G$  igual a  $-75 \text{ mV}$  e o deslocamento devido a dopagem.

Esta seletividade é muito importante para uma plataforma de detecção de alta especificidade, não sofrendo grandes alterações na corrente na presença de uma proteína a qual não deveria haver interação entre o anticorpo anti-HSA, mas alterando a corrente na presença do antígeno específico, a HSA.

Observamos que, ao retornar o fluxo de PBS apenas, a corrente não volta a valores iniciais, indicando que este método de lavar não é eficiente. Os sítios de ligação ficam ocupados.

## 5.6 Conclusão

Considerado os resultados obtidos, podemos afirmar que a proposta e objetivos iniciais deste trabalho, de estudar e aplicar o grafeno como um sensor, foram alcançados: aplicamos o grafeno em 3 biossensores diferentes sendo eles o sensor de pH, o sensor de acetilcolina e o sensor de anti-HSA. Adicionalmente, através deste estudo, muito foi aprendido sobre técnicas de funcionalização e manipulação de componentes químicos, como o PBSE, acetilcolina, HSA e a interação destes com o grafeno.

Os resultados obtidos se mostraram sólidos e coerentes. Foi possível detectar variações 0,1 de pH da solução de PBS, sendo o tempo de resposta do dispositivo de um minuto e meio. Detectamos a reação de quebra da acetilcolina em acetato + colina em tempo real, utilizando um biossensor seletivo, funcionalizado com acetilcolinesterase e detectamos a acetilcolina em uma concentração de 3,33 mmol/L. Demonstramos que o grafeno funcionalizado com PBSE + HSA é capaz de detectar o anti-HSA, porém tal dispositivo também sofreu influencias de um anticorpo não específico do HSA. Concluimos que, apesar da necessidade aprimorar as técnicas descritas neste trabalho, é possível aplicar o grafeno em dispositivos biossensores.

Durante este trabalho, também foi possível aprender, relacionar-se e inteirar-se sobre procedimentos de medidas elétricas e técnicas fabricação de dispositivos como: litografia óptica; deposição de metais em Si/SiO<sub>2</sub>; crescimento, transferência, limpeza e corrosão de grafeno CVD; desenvolvimento de canais de macrofluída em PDMS e utilizar equipamentos para a realização de caracterização elétrica. Tal aprendizado, que é de grande importância para a formação profissional do aluno se deu de forma sólida e consistente.

## 5.7 Perspectivas

De posse dos resultados e conclusões anteriores, consideramos que, as perspectivas para futuros trabalhos são amplas. Vamos variar a metodologia de funcionalização do grafeno afim de obter uma melhor resposta na detecção. Aperfeiçoando a resolução de detecção. Funcionalizar o grafeno com uma variedade maior de proteínas, com intuito de detectar outros compostos, como o glifosato que é prejudicial à saúde e amplamente utilizado na agricultura.

Para aprimorar a qualidade das medidas e melhorar o controle do fluxo de líquido no dispositivo, o canal de macrofluidica poderá ser substituído por canal de microfluidica, com dimensões inferiores à  $(300 \times 200 \times 50) (\mu\text{m})^3$ . Esta modificação permite um controle maior da solução de trabalho no dispositivo, podendo trabalhar com concentrações e volumes menores de solução.

Implementar na plataforma de grafeno suspenso, confecções de biossensores com grafeno suspenso, eliminando possíveis interações com o substrato,  $\text{SiO}_2$ . Com esta implementação novas técnicas de funcionalização também poderá ser desenvolvida.

A longo prazo, pretendemos viabilizar estes biossensores para fabricação em larga escala e uso comercial.

# REFERÊNCIAS

---

- [1] A. Jorio, R. Saito, G. Dresselhaus, and M. S. Dresselhaus, *Raman Spectroscopy in Graphene Related Systems*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
- [2] B. Gharekhanlou and S. Khorasani, *Graphene: Properties Synthesis and Applications*. 2011.
- [3] I. D. Barcelos, "Crescimento de Grafeno por CVD em folhas de Cobre Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG Instituto de Ciências Exatas - ICEx Programa de Pós Graduação em Física Crescimento de Grafeno por CVD em folhas de Cobre .," Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- [4] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V Dubonos, I. V Grigorieva, A. A. Firsov, a. a. F. K.S. Novoselov<sup>1</sup>, A.K. Geim<sup>1</sup>, S.V. Morozov<sup>2</sup>, D. Jiang<sup>1</sup>, Y. Zhang<sup>1</sup>, S.V. Dubonos<sup>2</sup>, I.V.Grigorieva<sup>1</sup>, and K. Using, "Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films," *Science (80-. )*, vol. 306, no. 5696, pp. 666–669, 2004.
- [5] A. H. C. Neto, "Selected Topics in Graphene physics," 2010.
- [6] R. Saito, G. Dresselhaus, and M. Dresselhaus, *Physical Properties of Carbon Nanotubes*. 1998.
- [7] C. L. Kane and E. J. Mele, "Quantum Spin Hall Effect in Graphene," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 95, no. 22, p. 226801, Nov. 2005.
- [8] M. I. Katsnelson and K. S. Novoselov, "Graphene: New bridge between condensed matter physics and quantum electrodynamics," *Solid State Commun.*, vol. 143, no. 1–2, pp. 3–13, Jul. 2007.
- [9] J. K. Wassei and R. B. Kaner, "Graphene, a promising transparent conductor," *Mater. Today*, vol. 13, no. 3, pp. 52–59, Mar. 2010.
- [10] S.-J. Han, A. V. Garcia, S. Oida, K. A. Jenkins, and W. Haensch, "Graphene radio frequency receiver integrated circuit," *Nat Commun*, vol. 5, Jan. 2014.
- [11] K. R. Amin and A. Bid, "Graphene as a sensor," *Curr. Sci.*, vol. 107, pp. 430–436, 2014.
- [12] Y. Ohno, K. Maehashi, and K. Matsumoto, "Chemical and biological sensing applications based on graphene field-effect transistors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 4, pp. 1727–1730, 2010.
- [13] Y. Ohno, K. Maehashi, and K. Matsumoto, "&lt;title&gt;Graphene field-effect transistors for label-free chemical and biological sensors&lt;/title&gt;," vol. 8031, pp. 803121–803121–6, 2011.
- [14] L. H. Hess, M. Seifert, and J. a. Garrido, "Graphene transistors for bioelectronics," *Proc. IEEE*, vol. 101, no. 7, pp. 1780–1792, 2013.
- [15] Y. O. Ñ, S. Okamoto, K. Maehashi, and K. Matsumoto, "Direct Electrical Detection of DNA Hybridization Based on Electrolyte-Gated Graphene Field-Effect Transistor," vol. 52, pp. 1–4, 2013.
- [16] S. Viswanathan, T. N. Narayanan, K. Aran, K. D. Fink, J. Paredes, P. M. Ajayan, S. Filipek, P. Miszta, H. C. Tekin, F. Inci, U. Demirci, P. Li, K. I. Bolotin, D. Liepmann, and V. Renugopalakrishnan, "Graphene–protein field effect biosensors: glucose sensing," *Mater. Today*, vol. 18, no. 9, pp. 513–522, Nov.

- 2015.
- [17] A. P. Alivisatos, M. Chun, G. M. Church, R. J. Greenspan, M. L. Roukes, and R. Yuste, "The Brain Activity Map Project and the Challenge of Functional Connectomics," *Neuron*, vol. 74, no. 6, pp. 970–974, 2012.
  - [18] A. P. Alivisatos, A. M. Andrews, E. S. Boyden, M. Chun, G. M. Church, K. Deisseroth, J. P. Donoghue, S. E. Fraser, J. Lippincott-Schwartz, L. L. Looger, S. Masmanidis, P. L. McEuen, A. V. Nurmikko, H. Park, D. S. Peterka, C. Reid, M. L. Roukes, A. Scherer, M. Schnitzer, T. J. Sejnowski, K. L. Shepard, D. Tsao, G. Turrigiano, P. S. Weiss, C. Xu, R. Yuste, and X. Zhuang, "Nanotools for neuroscience and brain activity mapping.," *ACS Nano*, vol. 7, no. 3, pp. 1850–66, 2013.
  - [19] Q. Wei, H. Park, and C. M. Lieber, "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species," *Science (80-. )*, vol. 293, no. 5533, pp. 1289–1292, 2001.
  - [20] B. R. Goldsmith, J. G. Coroneus, a a Kane, G. a Weiss, and P. G. Collins, "Monitoring single molecule reactivity on a carbon nanotube," *Nano Lett.*, vol. 8, pp. 189–194, 2008.
  - [21] C. Yu, Y. Guo, H. Liu, N. Yan, Z. Xu, G. Yu, Y. Fang, and Y. Liu, "Ultrasensitive and selective sensing of heavy metal ions with modified graphene," *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 58, p. 6492, 2013.
  - [22] S. Okamoto, Y. Ohno, K. Maehashi, K. Inoue, and K. Matsumoto, "Fragment - Modified Graphene FET for Highly Sensitive Detection of Antigen - Antibody Reaction," *IMCS 2012 – 14th Int. Meet. Chem. Sensors*, pp. 519–522, 2012.
  - [23] C. A. Merchant, K. Healy, M. Wanunu, V. Ray, N. Peterman, J. Bartel, M. D. Fischbein, K. Venta, Z. Luo, A. T. C. Johnson, and M. Drndić, "DNA Translocation through Graphene Nanopores," *Nano Lett.*, vol. 10, no. 8, pp. 2915–2921, 2010.
  - [24] Y. Lu, B. R. Goldsmith, N. J. Kybert, and a. T. C. Johnson, "DNA-decorated graphene chemical sensors," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 97, no. 8, pp. 25–27, 2010.
  - [25] James Hedberg, "graphene-simple-sheet." 2011.
  - [26] "Aspectos eletrônicos e estruturais do grafeno e derivados : um estudo teórico e experimental.," 2010.
  - [27] A. H. C. Neto, F. Guinea, N. M. R. Peres, K. S. Novoselov, and A. K. Geim, "The electronic properties of graphene," 2007.
  - [28] R. Saito, A. Jorio, A. G. Souza Filho, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, and M. A. Pimenta, "Probing Phonon Dispersion Relations of Graphite by Double Resonance Raman Scattering," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 88, no. 2, p. 027401, Dec. 2001.
  - [29] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications, 2nd Edition*. Wiley Global Education, 2000.
  - [30] A. Dissertation, "Chemical and Biological Sensing With Carbon Nanotubes in Solution," no. January, 2008.
  - [31] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V Morozov, D. Jiang, M. I. Katsnelson, I. V Grigorieva, S. V Dubonos, and A. A. Firsov, "Two-dimensional gas of massless Dirac fermions in graphene," *Nature*, vol. 438, no. 7065, pp. 197–200, 2005.
  - [32] I. S. de Almeida, "Estudo Das Alterações Das Propriedades Elétricas e Morfológicas do Grafeno na Presença de Gases, Nanopartículas e Líquidos," Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
  - [33] A. Star, Y. Liu, K. Grant, L. Ridvan, J. F. Stoddart, D. W. Steuerman, M. R. Diehl, A. Boukai, and J. R. Heath, "Noncovalent side-wall functionalization of single-

- walled carbon nanotubes,” *Macromolecules*, vol. 36, no. 3, pp. 553–560, 2003.
- [34] C. Chen, W. Zhai, D. Lu, H. Zhang, and W. Zheng, “A facile method to prepare stable noncovalent functionalized graphene solution by using thionine,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 46, no. 4, pp. 583–587, 2011.
- [35] T. A. S. L. de Sousa, “Transistores de efeito de campo baseados em grafeno crescido por cvd como uma plataforma para biossensores,” Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- [36] P. K. Ang, W. Chen, A. T. S. Wee, and P. L. Kian, “Solution-gated epitaxial graphene as pH sensor,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 44, pp. 14392–14393, 2008.
- [37] I. Heller, S. Chatoor, J. Männik, M. a G. Zevenbergen, C. Dekker, and S. G. Lemay, “Influence of electrolyte composition on liquid-gated carbon nanotube and graphene transistors,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 48, pp. 17149–17156, 2010.
- [38] D. J. Cole, P. K. Ang, and K. P. Loh, “Ion Adsorption at the Graphene/Electrolyte Interface,” *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 2, no. 14, pp. 1799–1803, Jul. 2011.
- [39] M. Munz, C. E. Giusca, R. L. Myers-Ward, D. K. Gaskill, and O. Kazakova, “Thickness-Dependent Hydrophobicity of Epitaxial Graphene,” *ACS Nano*, vol. 9, no. 8, pp. 8401–8411, Aug. 2015.
- [40] K. N. Kudin and R. Car, “Why Are Water–Hydrophobic Interfaces Charged?,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 12, pp. 3915–3919, Mar. 2008.
- [41] R. Zangi and J. B. F. N. Engberts, “Physisorption of Hydroxide Ions from Aqueous Solution to a Hydrophobic Surface,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 7, pp. 2272–2276, Feb. 2005.
- [42] I.-Y. Sohn, D.-J. Kim, J.-H. Jung, O. J. Yoon, T. Nguyen Thanh, T. Tran Quang, and N.-E. Lee, “pH sensing characteristics and biosensing application of solution-gated reduced graphene oxide field-effect transistors,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 45, pp. 70–76, Jul. 2013.
- [43] S. Schnell, “Enzyme Kinetics at High Enzyme Concentration,” *Bull. Math. Biol.*, vol. 62, no. 3, pp. 483–499, 2000.
- [44] M. W. Steward and R. E. Petty, “The antigen-binding characteristics of antibody pools of different relative affinity,” *Immunology*, vol. 23, no. 6, pp. 881–7, 1972.
- [45] W. T. D. S. RAMOS, “A INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO DE HIDROGÊNIO NO CRESCIMENTO DE GRAFENO A BAIXAS PRESSÃO,” UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2013.
- [46] E. Y. Andrei, G. Li, and X. Du, “Electronic properties of graphene: a perspective from scanning tunneling microscopy and magneto-transport,” Apr. 2012.
- [47] P. M. Wojcik, “Fabrication and Characterization of a Label Free Graphene Field Effect Transistor Biosensor,” 2012.
- [48] G. W. Saltzgaber, “COMPARISON OF CARBON NANOTUBE AND GRAPHENE FIELDEFFECT TRANSISTOR BIOSENSORS,” Oregon State University, 2012.
- [49] a Dissertation, “Chemical and biological sensing with carbon nanotubes in solution,” *Herz*, no. January, 2008.
- [50] G. A. Ferrari, “Produção e Caracterização de Membranas Suspensas de Grafeno,” Universidade Federal de Minas Gerais.
- [51] Fvasconcellos, “255px-Antibody.” 2007.

# Apêndice A

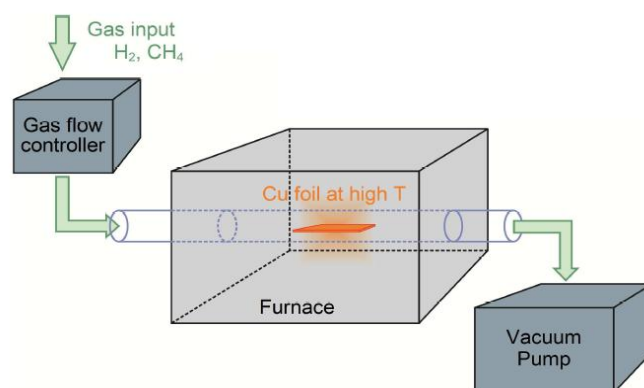
## GRAFENO CVD

---

O método de deposição química na fase vapor (CVD, *chemical vapor deposition*), é o método utilizado neste trabalho para a obtenção do grafeno. Este método é relativamente barato, reprodutível e produz grafeno em grandes áreas. O presente apêndice contém a receita de produção do grafeno CVD utilizado neste trabalho, assim como, a receita de transferência deste grafeno para o substrato desejado e a metodologia de limpeza do grafeno.

### Obtenção do Grafeno CVD

O sistema utilizado para o crescimento é exposto na Figura 50. Ele é composto por controladores de fluxo de gases, um forno, com o suporte para o tubo, que pode chegar a temperatura acima de 1000 °C e uma bomba de vácuo.



**Figura 50: Ilustração do sistema de crescimento de grafeno CVD. É ilustrada suas partes mais importantes: Controlador de gás, forno + tubo de quartzo e a bomba de vácuo. Retirada de [50].**

A primeira etapa é preparar a folha de cobre que serve como substrato para o crescimento do grafeno. O cobre é recortado de um rolo de cobre policristalino de alta pureza, com as dimensões  $(2 \times 10) \text{ cm}^2$  e colocado em banho de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) por uma hora, para a remoção do óxido de cobre nativo da superfície da folha. Em seguida, o cobre passa por um banho de água DI, seca com jato de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e é introduzida no sistema, posicionando-a no centro do tubo, como ilustrado na Figura 50.

Com a bomba de vácuo e um controlador de pressão (MFC), introduzimos no interior do tubo uma mistura de hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e metano ( $\text{CH}_4$ ), controlando a pressão e o fluxo como indicado no protocolo a seguir:

	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Gás	Fluxo (sccm)	Pressão (mTorr)
Aquecimento	$\sim 25 \rightarrow 1000$	25	$\text{H}_2$	$\sim 65$	760
Recozimento	1000	45	$\text{H}_2$	$\sim 65$	760
Crescimento	1000	150	$\text{H}_2$ e $\text{CH}_4$	$\sim 32$ e $16$	330
Resfriamento	$1000 \rightarrow \sim 25$	–	$\text{H}_2$ e $\text{CH}_4$	$\sim 32$ e $16$	330

**Tabela 1: Protocolo de crescimento do Grafeno.**

Ao fim do processo, as duas faces do cobre possuem um filme fechado de grafeno. A Figura 50, de (1) a (3), ilustra o procedimento descrito.

Para uma leitura mais detalhada sobre esse protocolo, sugerimos a leitura [45].

## **Transferência do Grafeno para o Substrato Desejado**

Para transferir o grafeno do cobre para o substrato desejado, usamos a técnica ilustrada na Figura 50, de (4) a (13) e descrita a seguir:

Iniciamos cobrindo umas das faces com polimetil-metacrilato (PMMA) com espessura de 250 nm. Além de proteger o grafeno de possíveis contaminações, o PMMA serve para dar sustentação e estabilidade para o mesmo após a remoção do



cobre abaixo dele. A outra face do cobre, sem PMMA, é exposta à um plasma de oxigênio por 5 segundos a uma pressão de 1 Torr removendo o grafeno dessa face.

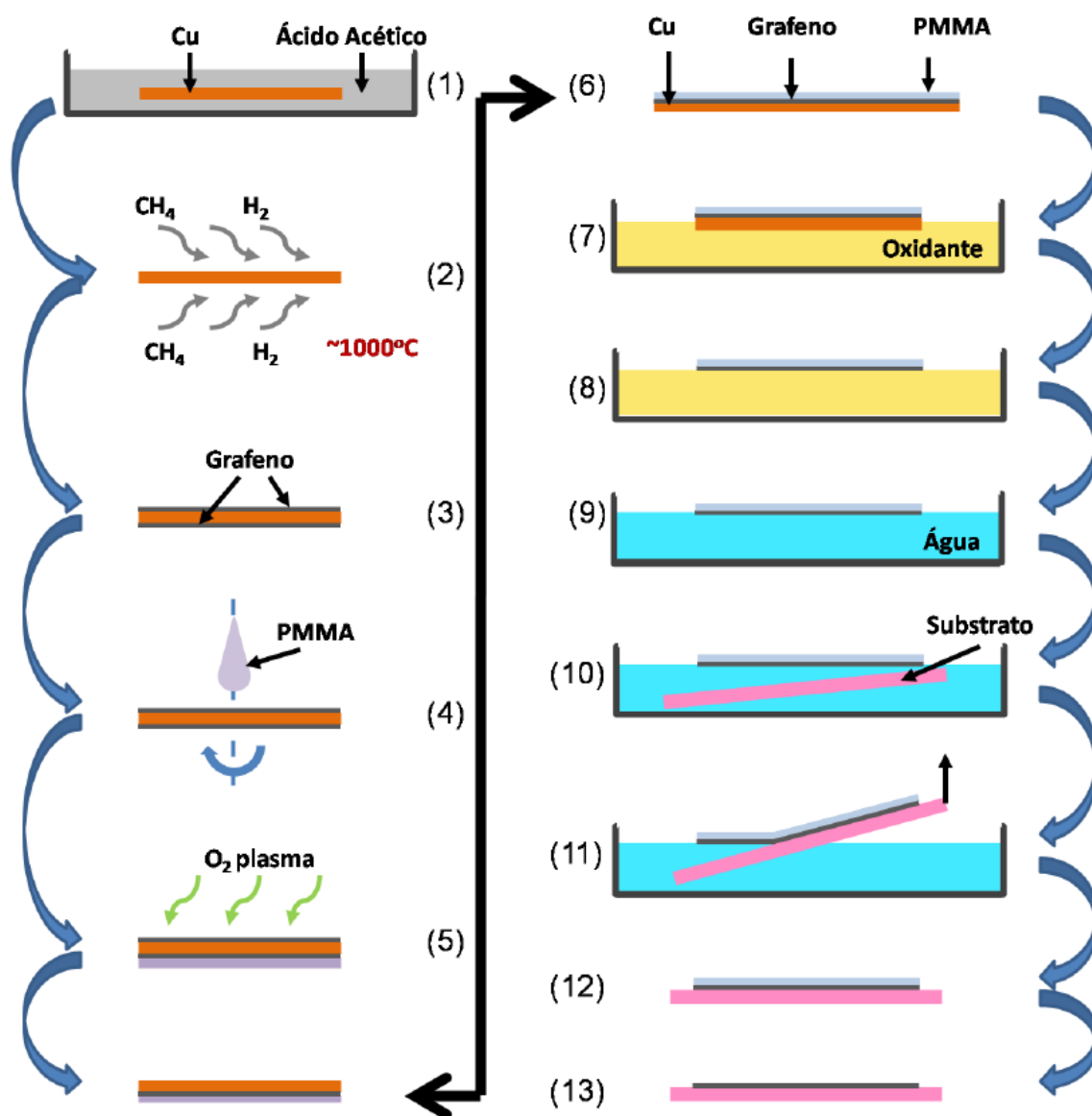


Figura 51: Fluxograma de Crescimento de grafeno sobre o cobre e transferencia para o substrato desejado. Retidado de [50].

O cobre é colocado boiando em uma solução de persulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) em uma concentração de 0.1 molar por 24 horas. Após este tempo, o cobre é completamente removido, ficando boiando na solução uma película composta por grafeno + PMMA.

A etapa seguinte consiste em “pescar” esta película (grafeno + PMMA) e coloca-la em um recipiente com água DI para remoção da solução, limpando o grafeno. Este banho é repetido seis vezes, cada um tendo duração de ao menos 30 minutos, a Figura 50 contém todas essas etapas. Com o substrato desejado, o grafeno é pescado e mantido em ambiente limpo até que fique seco. Ainda é necessário remover o PMMA da parte de cima do grafeno, portanto, o substrato é mergulhado em acetona por 24 horas, depois mergulhado em álcool isopropílico por 30 minutos e seco com jato de  $N_2$ , concluindo o processo.

# Apêndice B

## LITOGRAFIA E DEPOSIÇÃO DOS METAIS

---

O método de litografia ótica e deposição de cromo/outro é amplamente encontrado na literatura. Neste apêndice nos atemos somente em expor a receita utilizada, ou seja, as doses utilizadas nos dispositivos confeccionados neste trabalho.

### Litografia ótica

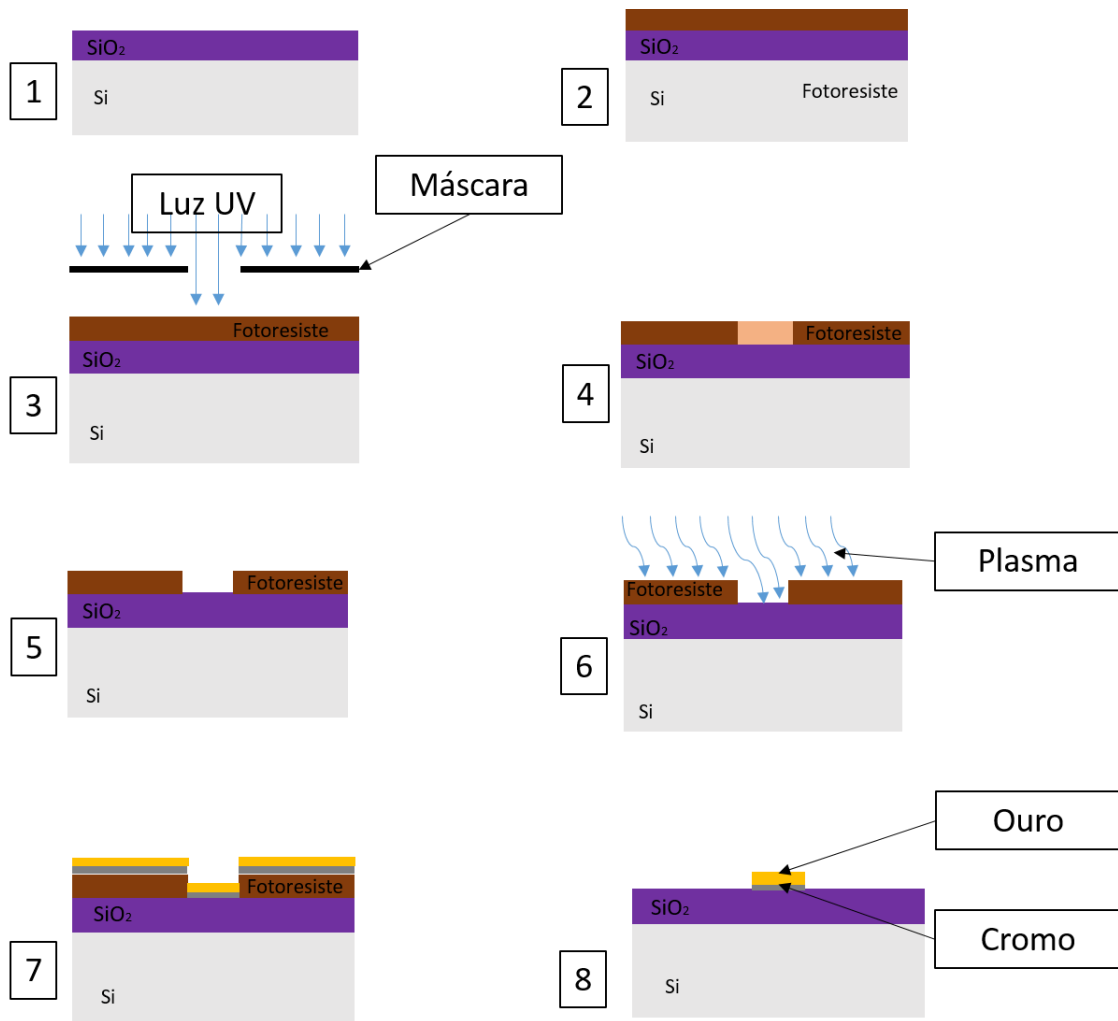
O primeiro passo consiste na limpeza do substrato, neste trabalho usamos o Si/SiO<sub>2</sub>, com direção cristalográfica 100, com 300 nm de SiO<sub>2</sub>, clivado com dimensões (18 × 18) mm<sup>2</sup>. Imergimos o substrato em acetona e levamos ao ultrassom por 5 minutos, e mais 5 minutos de ultrassom com isopropílico.

Depositamos o fotoresiste, S1813, e utilizamos a técnica de spin-coat. No *spin-coat* utilizamos 45 segundos a 3800 rpm com aceleração 1000 rpm/s, essa configuração nos fornece um filme de aproximadamente 1,5 μm de espessura. Logo em seguida, é feito um pré-bake de 90 segundos a 100 °C.

Já na foto-alinhadora, com a máscara devidamente alinhada sobre o substrato, ajustamos o tempo de exposição à luz UV em 14 segundos. Em seguida, utilizamos o revelador MF26A, empregando o tempo para revelação de 18 segundos. Logo em seguida, colocamos a amostra em água DI por 1 minutos e a secamos com jato de N<sub>2</sub>.

Antes de depositar os metais no dispositivo, é realizado um plasma utilizando ar no mesmo para que não tenha resíduos de fotoresiste. Usamos 1 Torr de pressão

por 10 segundos. Por fim, depositamos 5 nm de cromo e 35 nm de ouro. A Figura 52 a seguir ilustra o processo.



**Figura 52: Fluxograma com as etapas de litografia ótica: 1) Substrato limpo. 2) Substrato com foto resiste. 3) Exposição à luz UV. 4) e 5) Revelação com MF26A. 6) Limpeza com plasma. 7) Deposição dos Metais. 8) Lifit off.**

# Apêndice C

## CORROSÃO E LIMPEZA DO GRAFENO

---

### Corrosão do Grafeno

Após a transferência do grafeno para o substrato desejado, com os metais já depositados, precisamos remover o grafeno da região não desejada utilizando um plasma de  $O_2$ .

Uma nova etapa de litografia é realizada. Nesta etapa, um filme de PMMA com 250 nm é depositado sobre o grafeno, para tal, usamos a mesma receita do spin-coat citada no Apêndice B, e em seguida, um filme de fotoresiste S1830, com a mesma receita do Apêndice B. Manipulamos uma máscara de proteção para a litografia e usamos os mesmos parâmetros para exposição e revelação da litografia anterior. Após a revelação, temos a configuração exibida na Figura 53. (a):

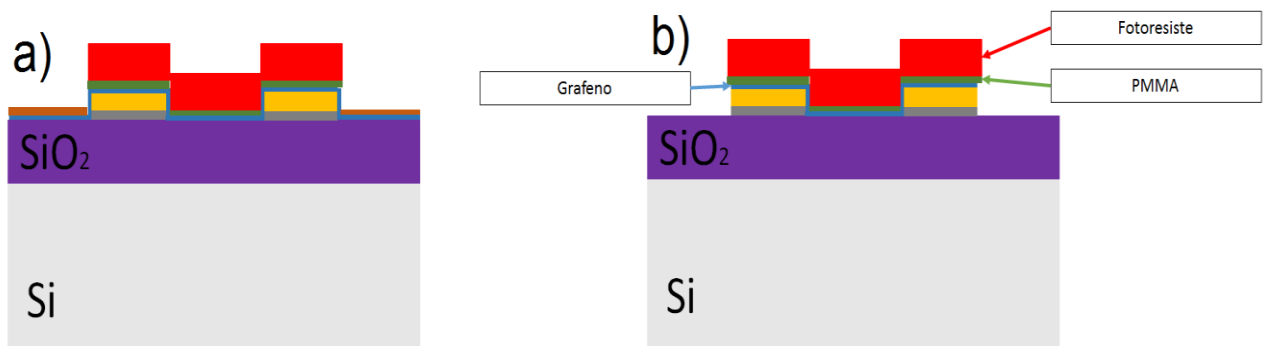


Figura 53: Proteção e corrosão do grafeno. a) Proteção do grafeno com PMMA e foto resiste. b) Corrosão do grafeno e do PMMA.

Ao término do processo de revelação, a corrosão é feita com plasma de  $O_2$ . O plasma é ajustado para o tempo de 16 minutos com 1 Torr de pressão. Posteriormente a corrosão temos a configuração exibida na Figura 53 (b). Por fim, o dispositivo é submerso em acetona por 24 horas, em seguida em isopropílico por 1 hora, e seco com jato de  $N_2$ .

## Limpeza do Grafeno

Para a limpeza do grafeno, remoção de resíduo de PMMA, o dispositivo é inserido em um tubo de quartzo e levado ao forno similar ao de crescimento do grafeno. Um fluxo dos gases Ar e  $H_2$  é inserido no tubo. A Tabela 2 contém o protocolo de limpeza.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Gás	Fluxo (sccm)
~ 25 → 350	60 minutos	$H_2$ e Ar	700 e 300
350	210 minutos	$H_2$ e Ar	700 e 300
350 → ~25	--	$H_2$ e Ar	700 e 300

**Tabela 2: Protocolo de limpeza do grafeno.**

Esta limpeza queima e expulsa o resíduo de polímero da superfície do grafeno.