



Julia Inês Pilan Zanoni **Desenvolvimento e caracterização de compósitos ZnO/grafeno induzido por laser para aplicação em biossensores**

Development and characterization of ZnO/laser-induced graphene composites for biosensing applications



Julia Inês Pilan Zanoni **Desenvolvimento e caracterização de compósitos ZnO/grafeno induzido por laser para aplicação em biossensores**

Development and characterization of ZnO/laser-induced graphene composites for biosensing applications

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Física, realizada sob a orientação científica da Doutora Joana Catarina Ferreira Rodrigues e coorientação da Professora Doutora Florinda Mendes Costa e Doutor Nuno Miguel Franco dos Santos.

O presente estudo foi realizado no âmbito dos projetos UID/CTM/50025/2019 e POCI-01-0145-FEDER-028755, financiados pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Dedico este trabalho à minha mãe e ao meu irmão mais velho pela ajuda prestada e todo esforço realizado para que eu chegasse até aqui.

o júri

presidente

Prof. Doutor Luis Miguel Rino Cerveira da Silva

Professor Auxiliar do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

orientadora

Doutora Joana Catarina Ferreira Rodrigues

Investigadora Doutorada do Departamento de Física da Universidade de Aveiro

arguente

Prof.^a Doutora Maria de Fátima Guimarães Cerqueira

Professora Auxiliar do Departamento de Física da Universidade do Minho

agradecimentos

Começo por agradecer à Doutora Joana Rodrigues pela excelente orientação, disponibilidade, paciência e sobretudo por nunca ter desistido de mim. O seu apoio e a sua dedicação foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Da mesma forma, à Professora Doutora Florinda Costa, ao Doutor Nuno Santos e à Doutora Sónia Pereira um enorme obrigada por todo conhecimento e tempo partilhado durante este percurso.

Agradeço ao Dr. António José Fernandes e ao Alexandre pela ajuda no laboratório.

Aos amigos que fiz no Departamento de Física um grande obrigada por me terem ajudado e acompanhado ao longo de todo o trabalho, mas principalmente por terem tornado os meus dias mais divertidos.

Quero agradecer às minhas colegas de casa e as funcionárias da residência do Crasto por transformarem a residência R3.2B no meu segundo lar e por todo o apoio emocional no decorrer destes 2 anos.

Um agradecimento especial à minha família por sempre estarem ao meu lado e proporcionarem todas as condições para a minha formação académica.

Ao José Ferreira pelo companheirismo mesmo nos momentos mais difíceis.

Por último, um grande obrigada aos amigos e professores do Brasil que mesmo de longe demonstraram muito carinho e apoio.

palavras-chave

Compósitos de óxido de zinco (ZnO) e grafeno induzido por laser (LIG); síntese simultânea; processamento a laser; transdução ótica e impedimétrica; imunossensor; antígeno específico da próstata (PSA);

resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos e caracterizados compósitos de óxido de zinco e grafeno induzido por laser (ZnO/LIG) produzidos simultaneamente por processamento a laser. Estes compósitos foram utilizados na preparação de biossensores com dupla transdução, ótica e impedimétrica, com o objetivo de detetar e discriminar diferentes concentrações do antígeno específico da próstata (PSA). Diferentes combinações dos parâmetros de processamento a laser foram testadas, bem como diferentes pastas precursoras de ZnO, de forma a determinar qual a combinação considerada mais adequada. Uma folha de poliimida (Kapton®) foi usada quer como precursor para a formação do LIG, quer como substrato flexível para os compósitos resultantes. Os compósitos de ZnO/LIG foram caracterizados através das técnicas de microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS), espectroscopia de Raman, fotoluminescência (PL), fotoluminescência de excitação (PLE), voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Após a determinação dos parâmetros considerados mais vantajosos para a aplicação pretendida, os compósitos de ZnO/LIG selecionados foram produzidos a partir da pasta precursora de ZnO, com os parâmetros de processamento: $v= 200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P= 21 \text{ W}$, $d= 0,1 \text{ mm}$, $h_{\text{laser}}= 2,1 \text{ cm}$. Réplicas desses compósitos foram produzidas e caracterizadas de forma a avaliar a sua reprodutibilidade. Posteriormente, o transdutor formado por esses compósitos foi funcionalizado pela técnica de adsorção física, utilizando anticorpos anti-PSA como elemento bioreceptor, seguido de um passo de passivação com albumina de soro bovino (BSA) para minimizar as interações não-específicas. Os biossensores e controlos produzidos foram testados para oito concentrações de PSA e a resposta do sinal do transdutor foi verificada através das técnicas de PL e EIS. No entanto, não foi possível observar uma tendência específica em função da concentração de PSA na resposta obtida por ambas as técnicas. Face a estes resultados, foram ainda avaliados alguns dos possíveis fatores que limitam o desempenho dos sensores desenvolvidos, recorrendo à análise por SEM, EDS e espectroscopia de Raman da superfície dos biossensores e controlos produzidos.

keywords

Zinc oxide / laser-induced graphene (ZnO/LIG) composites; direct laser writing (DLW); simultaneous synthesis; optical and impedimetric transduction; immunosensor; prostate-specific antigen (PSA);

abstract

In this work, zinc oxide (ZnO) decorated laser-induced graphene (LIG) was produced by a simultaneous laser processing approach. The produced ZnO/LIG composites were developed and characterized with the purpose to be used as transducer material in optical and impedimetric biosensors for the detection of prostate-specific antigen (PSA). Different laser processing conditions, as well as different precursors (Zn or ZnO), were explored in order to obtain composites with the desired properties. A polymeric substrate (e.g., Kapton®) was used as LIG precursor, as well as a flexible substrate for the composites. The ZnO/LIG composites were characterized by scanning electron microscopy (SEM), Raman spectroscopy and photoluminescence (PL), photoluminescence excitation (PLE), cyclic voltammograms (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). As a result, the ZnO/LIG composites were produced with ZnO precursor, as well as the processing parameters: $v=200\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, $P=21\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{\text{laser}}=2,1\text{ cm}$. The reproducibility of the composites was assessed through production and characterization of composite's replicas employing the same processing parameters. Afterward, the selected structures were functionalized by physical adsorption technique using antibodies anti-PSA as biorecognition element, followed by passivation with bovine serum albumin (BSA) in order to block the non-specific binding sites. The produced biosensors and controls were tested with 8 different PSA concentrations and the transducer's response signal was monitored by PL and EIS. However, the produced biosensors did not show a reproducible and reliable response with increasing analyte concentration for both transduction methods employed. Based on the obtained results, the identification of some possible factors that influenced the biosensor response was attempted, shedding some light on the limitations inherent to the materials and the procedure used for the preparation of the sensors.

Índice

<i>Índice</i>	<i>i</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de Símbolos e Acrónimos</i>	<i>ix</i>
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 Cancro da próstata.....	3
2.2 Biossensor: Princípio de funcionamento.....	5
Bioreceptor	5
Transdutor	7
Biossensor ótico.....	8
Biossensor eletroquímico	9
2.3 Materiais: Propriedades e aplicações.....	10
Nanocarbons	10
ZnO	12
Compósitos de ZnO/LIG	14
3. Procedimento experimental	15
3.1 Produção dos compósitos ZnO/LIG por síntese simultânea.....	15
3.2 Funcionalização dos compósitos	18
3.3 Técnicas de caracterização	19
Microscopia eletrónica de varrimento (SEM).....	20
Espectroscopia de Raman.....	21
Fotoluminescência	22
Voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)	25
3.4 Teste como biossensor ótico e eletroquímico	27
4. Resultados e discussão	29
4.1 Caracterização dos compósitos ZnO/LIG	29
4.2 Resposta do biossensor	39
4.3 Fatores limitativos do desempenho como sensor	43
5. Conclusões e trabalho futuro	47
6. Referências	49

Lista de Figuras

- Figura 2.1:** Esquema dos principais componentes de um biossensor. Adaptado de [12].5
- Figura 2.2:** Em (a.1) e (a.2) é ilustrada a imobilização por adsorção física e por ligação covalente, respetivamente. Em (b) está representado um esquema do anticorpo IgG e os dois fragmentos Fab onde se localiza o parátipo que interage com epítipo do antígeno e a região Fc. É importante notar que o parátipo é quimicamente formado para se ajustar perfeitamente ao epítipo do antígeno A, excluindo a ligação antígeno B. Adaptado de [25].6
- Figura 2.3:** Representação esquemática da simetria não-centrossimétrica do ZnO na estrutura da wurtzite, mostrando dois planos, o polar e o apolar. A coordenação tetraédrica sp^3 para o ZnO está também ilustrada. Adaptada de [58].12
- Figura 2.4:** Estrutura de bandas eletrónicas do ZnO obtida através do cálculo da *density functional theory*, utilizando o método semi-empírico GGA+U. Adaptado de [61].13
- Figura 3.1:** Esquema da preparação dos compósitos ZnO/LIG: (a) aplicação da pasta precursora da formação de ZnO (com zinco metálico ou óxido de zinco) no Kapton®; (b) espalhamento da pasta através da técnica de *Doctor Blade*; (c) tratamento térmico para secagem homogénea do precursor de ZnO; (d) processamento com laser de CO₂ e formação dos compósitos de ZnO/LIG; (e) esquema do resultado final das amostras.15
- Figura 3.2:** Esquema do processamento a laser para formar os compósitos de ZnO/LIG. O transdutor tinha dimensões de $8 \times 3 \text{ mm}^2$. v corresponde à velocidade de varrimento, d à distância entre as linhas de varrimento, na direção X , e h_{laser} é distância entre a cabeça do laser e o substrato.16
- Figura 3.3:** Imagem das três amostras processadas com a pasta de ZnO utilizando os parâmetros de processamento: $v=200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P=21 \text{ W}$, $d=0,1 \text{ mm}$, $h_{laser}=2,1 \text{ cm}$, onde os ângulos de contacto são: (1) $105,85^\circ$, (2) $107,47^\circ$ e (3) $95,23^\circ$17
- Figura 3.4:** Esquema da funcionalização por absorção física onde (a) corresponde à aplicação do anticorpo na superfície do transdutor e (b) à sua passivação com BSA.19
- Figura 3.5:** (a) Representação de alguns exemplos dos tipos de interações produzidas quando uma amostra é irradiada com um feixe de elétrons. Adaptado de [78]. (b) Imagem de SEM de um elétrodo de LIG produzido pelo grupo de Tour *et al.* a partir de um substrato de PI. Retirado de [53]. A barra presente na figura corresponde a uma escala de $20 \mu\text{m}$21
- Figura 3.6:** Diagrama esquemático dos processos de dispersão Rayleigh e Raman (anti-Stokes, Stokes e Raman ressoante), com m correspondendo ao estado vibracional de menor energia (fundamental) e n ao primeiro estado vibracional excitado. Adaptado de [79].22
- Figura 3.7:** Diagrama de coordenada configuracional representando o estado fundamental e o primeiro estado eletrónico excitado para um centro ótico. Adaptado de [82].23
- Figura 3.8:** Esquema das diferentes recombinações radiativas que podem ocorrer no processo de fotoluminescência. Em (1) está representado a recombinação banda a banda, em (2) a recombinação de excitações livres, em (3) a recombinação do excitão ligado a impurezas, em (4) a recombinação

entre elétron livre e um buraco de um nível aceitador, em (5) recombinação de um par dador-aceitador, e por fim, em (6) recombinação entre níveis de defeitos profundos. Adaptado de [81]...24

Figura 3.9: Representação esquemática das gamas de energia em que as várias transições do ZnO são geralmente observadas. Esquema adaptado da referência [57]. Na figura estão representados os excitões livres (FX), os excitões ligados a dadores neutros (D^0X), os excitões ligados a dadores ionizados (D^+X), os excitões ligados a aceitadores neutros (A^0X), a recombinação de pares dador-aceitador (DAP), as réplicas assistidas pelos fonões longitudinais óticos (LO), transições associadas a níveis eletrônicos profundos e ainda, *two-electron satellite* (TES). A representação de energias aqui esquematizada não é rigorosa e pretende apenas facilitar a interpretação dos espectros de PL apresentados no capítulo seguinte.....25

Figura 3.10: Em (a) está representada uma célula eletroquímica. A solução eletrolítica era composta por PBS e íons de $[Fe(CN)_6]^{-3/4}$. Em (b) estão ilustrados os principais elementos envolvidos na formação do elétrodo para as medidas eletroquímica. A área geométrica (A_g) tem dimensões $3 \times 3 \text{ mm}^2$26

Figura 3.11: (a) Representação de Nyquist para um biossensor impedimétrico faradaico, com o respetivo circuito equivalente, adaptado de [85]. (b) Ilustração da região da interface do elétrodo que interage com a solução eletrolítica, e os elementos que participam do sistema eletroquímico. Adaptado de [86].27

Figura 4.1: Imagens de SEM das superfícies das amostras (a) #1, com $v = 200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 20,1 \text{ W}$, $d = 0,1 \text{ mm}$, $h_{laser} = 2 \text{ cm}$ e o mapa de EDS para uma região que continha um aglomerado de partículas de ZnO; (b) #2, com $v = 200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 23 \text{ W}$, $d = 0,1 \text{ mm}$, $h_{laser} = 2 \text{ cm}$; (c) #3, com $v = 200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 24,6 \text{ W}$, $d = 0,1 \text{ mm}$, $h_{laser} = 2 \text{ cm}$; (d) #4, com $v = 150 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 21,2 \text{ W}$, $d = 0,1 \text{ mm}$, $h_{laser} = 2,1 \text{ cm}$; (e) #5, com $v = 150 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 22,1 \text{ W}$, $d = 0,2 \text{ mm}$, $h_{laser} = 2,1 \text{ cm}$ e (f) #25, com $v = 200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 21 \text{ W}$, $d = 0,1 \text{ mm}$, $h_{laser} = 2,1 \text{ cm}$. O precursor com Zn foi utilizado nas amostras de #1 a #5, e o precursor com ZnO na amostra #25.....30

Figura 4.2: (a) Imagem de microscopia ótica de uma amostra representativa das que foram analisadas por espectroscopia de Raman: (1) região contendo a pasta precursora de ZnO, (2) regiões dominadas pelo LIG (região escura), (3) regiões mais claras correspondendo a áreas que contém maior quantidade de ZnO. (b) Espectros de Raman obtidos para amostras selecionadas. A linha azul corresponde a espectros adquiridos nas regiões dominadas pelo LIG (região escura), enquanto a linha verde diz respeito ao sinal adquirido em regiões mais claras, correspondendo a áreas que contém maior quantidade de ZnO. As amostra #1 a #5 foram produzidas com o precursor com Zn e a amostra #25 foi produzida a partir do precursor contendo ZnO.31

Figura 4.3: (a) Espectros PL obtidos à temperatura ambiente, sob excitação com a linha 325 nm de um laser de He-Cd, para as amostras #4, #5, #25. (b) Espectros de PLE obtidos para a amostra #25 e monitorizados em dois comprimentos de onda diferentes, ambos na região da banda visível observada no espectro de PL da amostra correspondente.32

Figura 4.4: (a) Espectros de Raman obtidos para as réplicas da amostra #25. O espectro indicado como #LIG corresponde à amostra processada numa folha de Kapton® sem a pasta precursora e utilizando os parâmetros da amostra #25. As linhas azuis correspondem a regiões dominadas pela presença do LIG, enquanto as linhas verdes correspondem a dominadas pelas partículas de ZnO. (b)

Espectros PL obtidos a RT nas amostras #25.1 #25.2 #25.3 (excitação com o comprimento de onda 325 nm usando uma lâmpada de Xe de 450 W).36

Figura 4.5: (a) CVs das amostras de LIG e ZnO/LIG obtidos a 100 mV.s^{-1} . As linhas azul e verde correspondem a medidas feitas numa solução de PBS, enquanto as linhas preta e vermelha correspondem a medidas feitas numa solução de PBS com 1 mM ferrocianeto. Em (b) as representações de Nyquist para a amostra de LIG (símbolos em preto) e ZnO/LIG (símbolos em vermelho) e no topo o circuito equivalente.37

Figura 4.6: Espectros de PL em função da concentração de PSA: (a) biossensor em que a solução do anti - PSA esteve em contacto com a superfície do compósito durante 2 horas (S#1); (b) e (c) biossensor com incubação durante 24 horas (S#2 e S#3, respetivamente); (d) controlo (sem anti-PSA, C#1). (e) Resposta PL de para os sensores S#1, S#2 e S#3 e para o controlo C#1, monitorizando no máximo da NBE; (f) ampliação do gráfico anterior na região das concentrações de PSA entre $0-5 \text{ ng.ml}^{-1}$40

Figura 4.7: (a) CVs do controlo C#2 (linha vermelha) e do biossensor S#4 (linha azul) adquiridos com taxa de varrimento de 100 mV.s^{-1} ; (b) e (c) são as respostas EIS para o biossensor S#4 com anti-PSA incubado por 2 horas e para o controlo C#2, respetivamente; (d) representação de Nyquist do biossensor S#4 branco (símbolos pretos), com o seu respetivo circuito equivalente e com a curva de ajuste (linha vermelha); (e) comparação entre as respostas do controlo C#2 e o biossensor S#4; e (f) ampliação do gráfico anterior na região das concentrações de PSA entre $0-10 \text{ ng.ml}^{-1}$42

Figura 4.8: Imagens de SEM adquiridas para (a) o biossensor #5; e (b) para o controlo C#3, após os testes de PL para as oito concentrações de PSA. (c) Amostra S#6 contendo somente os compósitos de ZnO/LIG antes da funcionalização; (d) mesma amostra após a funcionalização e as sucessivas lavagens com PBS; (e) e (f) superfície do sensor S#7 antes e depois de ser mergulhado durante 3 horas numa solução de PBS, respetivamente.44

Figura 4.9: (a) Espectro de EDS da amostra S#6.2 após os testes. É possível observar a presença das espécies químicas de Zn, O, C, Na, P, Cl. Em (b) os espectros de Raman para as amostras #25, #S6.2 e #S7.2. Encontram-se representados os espectros de Raman para duas regiões distintas e aleatórias (linhas vermelhas e verdes escuro), onde † está associado à Na_2HPO_4 , * à KH_2PO_4 , ° à $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de referência para as diferentes concentrações de PSA com a correspondente escala de Gleason e a probabilidade de ocorrência de cancro da próstata (PCa) [22].	4
Tabela 2: Diferentes parâmetros de processamento testados para amostras com precursor de Zn onde v é a velocidade de varrimento do feixe laser, P é a potência de saída, d é a distância entre as linhas de varrimento (preferencialmente na direção X) e h_{laser} é a distância entre a cabeça do laser e o substrato. As amostras com * foram preparadas com duas camadas de pasta precursora de Zn.	18
Tabela 3: Parâmetros de processamento testados para as amostras com precursor de ZnO.	18
Tabela 4: Valores obtidos para as razões I_D/I_G e I_{2D}/I_G para os espectros adquiridos e representados na Figura 4.2 (b) .	34
Tabela 5: Valores obtidos para as razões I_D/I_G e I_{2D}/I_G a partir dos espectros das réplicas da amostra #25 e da amostra de LIG.	37
Tabela 6: Amostras e testes realizados para transdução via fotoluminescência e EIS.	39

Lista de Símbolos e Acrónimos

- AC - Corrente alternada
- A_g - Área geométrica
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- APTES - (3-amino-propil)triethoxysilane
- ARN - Ácido ribonucleico
- A^0X - Excitões ligados a aceptadores neutros
- A^+X - Excitões ligados a aceptadores ionizados
- BC - Banda de condução
- BSA - Albumina de soro bovino
- BV - Banda de valência
- BXs - Excitões ligados a defeitos/impurezas
- C_{dl} - Condensador que modela a capacitância da dupla camada
- CE - Contra elétrodo
- CPE - Elemento de fase constante
- CV - Voltametria cíclica
- CVD - Deposição química em fase vapor
- CNTs - Nanotubos de carbono
- d - Distância entre as linhas de varrimento
- DAP - Pares dador-aceitador
- D^0X - Excitões ligados a dadores neutros
- D^+X - Excitões ligados a dadores ionizados
- DC - Corrente contínua
- DLE - *Deep-level emission* (emissão de defeitos profundos)
- DLW - *Direct laser writing*
- DNT - Doenças crónicas não transmissíveis
- e - Carga do eletrão
- E - Potencial eléctrico
- EDS - Espectroscopia de raios-X por dispersão em energia
- EIS - Espectroscopia de impedância eletroquímica
- $E_{p, ano}$ - Potencial anódico
- $E_{p, cat}$ - Potencial catódico
- E_x - Energia do excitão

ΔE_p - Diferença entre os potenciais dos máximos anódico-catódico
 f - Frequência
F - Constante de Faraday
FX - Excitações livres
GL - Banda de luminescência na região espectral do verde
GO - Óxido de grafeno
 h_{laser} - Distância entre a cabeça do laser e o substrato.
IEP - Ponto isoelétrico
I e i - Corrente elétrica
I_D - Intensidade da banda D
I_{2D} - Intensidade da banda 2D
I_G - Intensidade da banda G
Igs - Imunoglobulinas
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada
KLKs - Calicreínas
LIG - Grafeno induzido por laser
LO - Fonões longitudinais óticos
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
 m_e - Massa do elétron
 n - Número quântico principal
 η - Número de elétrons
NBE - *Near band edge emission* (emissão próxima do extremo da BC)
NPs - Nanopartículas
NW - Nanofios
OD – Densidade ótica
P - Potência de saída
PBS - Solução tampão fosfato-salino
PCa - Cancro da próstata
PI - Poliimida
PL - Fotoluminescência
PLE - Fotoluminescência de excitação
PSA - Antígeno específico da próstata
 r - Distância entre as duas entidades

R - Constante dos gases
R_{ct} - Resistência à transferência de carga
RE - Elétrodo de referência
rGO - Óxido de grafeno reduzido
R_H - Constante de Rydberg para o átomo de hidrogénio
RL - Banda de luminescência na região espectral do laranja-vermelho
R_s - Resistência óhmica em série
RT e T - Temperatura ambiente
SEM - Microscopia eletrónica de varrimento
TES - *Two-electron satellite*
TPs - Tetrapodes
v - Velocidade de varrimento do feixe laser
W - Elemento de Warburg
WE - Elétrodo de trabalho
YL - Banda de luminescência na região espectral do amarelo
Z_{Im} - Parte imaginária da impedância
ZnO - Óxido de zinco
Z_{Re} - Parte real da impedância
Z_w - Impedância de Warburg

1. Introdução

Estima-se que as doenças crônicas não transmissíveis (DNT), nomeadamente cancro, diabetes, doenças cardiovasculares e respiratórios (DNT4) tenham sido responsáveis por cerca de 41 milhões (71%) entre 57 milhões dos casos de morte em 2016, segundo um estudo realizado em 2018 pela *World health statistics* [1]. Estas ocorrências são particularmente relevantes em países emergentes e com baixo nível socioeconómico, fazendo com que as DNT's sejam ainda um obstáculo para reduzir a disparidade na saúde e aumentar a expectativa de vida nesses países [2,3].

Entre as DNT4, o cancro tem um especial interesse devido à escala de complexidade e diversidade celular da doença, resultando numa grande heterogeneidade de tumores em diferentes órgãos e com diferentes taxas de incidência. Aproximadamente 14 milhões de casos desta doença são diagnosticados a cada ano, em todo mundo, sendo que se estima um aumento de cerca de 22 milhões até 2030 [1,4]. Para este aumento contribuem vários fatores de risco como, por exemplo, os maus hábitos alimentares, sedentarismo, idade ou o estilo de vida dos doentes. Relativamente aos tipos mais comuns, o cancro da mama e da próstata são responsáveis por cerca de 11,6% e 7,1% dos diagnósticos e casos de morte, respetivamente, com o cancro do pulmão em primeiro lugar em incidências para ambos os sexos [3]. Em 2009, a União Europeia investiu cerca de 126 mil milhões de euros na deteção e tratamento do cancro. Esse investimento em investigação e desenvolvimento incluiu o desenvolvimento de dispositivos que possibilitem a deteção precoce e precisa da doença, de forma a minimizar os custos elevados. Esses custos estão relacionados com os exames clínicos tradicionais, medicamentos, vacinas e simplificação dos procedimentos médicos que determinam o diagnóstico do paciente e tratamentos específicos para cada tipo de cancro [1,4,5].

No caso do cancro da próstata (PCa), os homens são submetidos a diferentes tipos de testes para detetar a doença, que muitas vezes são de grande desconforto para o paciente. Entre os vários tipos de testes, os menos invasivos utilizam biomarcadores para detetar o cancro em testes laboratoriais especializados. Os biomarcadores são substâncias que informam sobre os processos biológicos que ocorrem no organismo podendo ser indicadores de alguns tipos de cancro, possibilitando a sua deteção e monitorização através das alterações na sua concentração no sangue, na urina e no próprio tecido celular do tumor [6,7].

O principal biomarcador oncológico para o cancro da próstata é o antígeno específico da próstata (PSA), sendo naturalmente encontrado no plasma produzido por este órgão. Os testes relacionados com o PSA necessitam de laboratórios especializados, havendo, conseqüentemente, custos adicionais relativo à mão de obra especializada e a um aumento no tempo de espera para disponibilizar os resultados [6].

Com a finalidade de obter um diagnóstico rápido e preciso, nos últimos anos têm-se intensificado o desenvolvimento de sensores capazes de detetar diferentes elementos biológicos, transmitir e armazenar a informação relativa às mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem num organismo, de uma forma precisa, simples e de fácil acesso à população [8]. Como exemplo, destaca-se o sensor capaz de monitorizar a glicemia em tempo real que, além de criar resumos regulares dos níveis de glicose do utilizador, que são armazenados numa biblioteca virtual, permite avaliar as suas tendências e correlacioná-las com fatores externos [9]. Entre os vários tipos de sensores, os biossensores são capazes de detetar e converter o sinal biológico num sinal quantificável e processável, e são assim designados por possuírem um elemento biológico como elemento de bioreconhecimento [10]. Esse dispositivo é constituído pelo elemento bioreceptor (ou de bioreconhecimento), responsável pela interação específica com o analito, pelo elemento transdutor e por um sistema de análise que processa e disponibiliza as informações num formato acessível aos utilizadores [11]. O transdutor será o substrato físico onde são adicionados os restantes componentes do sensor, e as características e propriedades físicas da sua superfície serão determinantes para a construção e desempenho do sensor, condicionando a forma como os bioreceptores serão imobilizados na sua superfície. Os biossensores são desenvolvidos especificamente para cada tipo de

elemento biológico a ser detetado, e portanto, a escolha do elemento bioreceptor (enzimas, anticorpos ou aptâmeros), e do transdutor (ótico, eletroquímico, magnético, elétrico, entre outros) são fundamentais para o desempenho do dispositivo [12,13]. Relativamente ao transdutor, materiais à base de carbono [14] e/ou óxidos [15] são frequentemente estudados para aplicações nesta área como é o caso do grafeno e do óxido de zinco (ZnO), por exemplo [16]. Além disso, a combinação de ambos os materiais permite formar compósitos e/ou estruturas híbridas que se têm revelado muito promissoras para aumentar a eficiência do sensor através da contribuição das propriedades de cada material, bem como das novas propriedades funcionais que podem advir desta junção.

Este trabalho tem como principal objetivo a produção de compósitos de ZnO e grafeno induzido por laser (*laser-induced graphene*, LIG) através da sua síntese simultânea por ação direta de um feixe de laser (*direct laser writing*, DLW). Esses compósitos irão formar o elemento transdutor com vista à produção de um biossensor com dupla transdução, ótica e eletroquímica. No presente trabalho optou-se por utilizar o biomarcador PSA como analito de teste na avaliação da viabilidade destes materiais para o propósito mencionado. A possibilidade de incorporar os dois tipos de transdução (ótico e eletroquímico) num único sensor tem como objetivo minimizar a ocorrência de falsos positivos, muito comuns nas análises convencionais.

Esta tese está dividida em cinco capítulos, em que o primeiro corresponde à introdução, o segundo à revisão bibliográfica dos conceitos considerados relevantes para o desenvolvimento deste trabalho, com destaque para os materiais usados na produção dos transdutores, suas propriedades e aplicações. O segundo capítulo aborda ainda conceitos essenciais na compreensão do funcionamento dos biossensores e seus elementos, bem como aspetos relacionados com a deteção do cancro da próstata, em particular através da monitorização do PSA. O terceiro capítulo descreve o procedimento experimental empregue na produção dos compósitos, além das técnicas de caracterização morfológica, estrutural, ótica e eletroquímica utilizadas nos mesmos. No quarto capítulo é feita a análise e discussão dos resultados obtidos. Por fim, o quinto capítulo é dedicado às conclusões e perspetivas de trabalho futuro.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Cancro da próstata

O cancro é uma doença que se baseia numa anomalia genética nas células do organismo causada pela modificação de segmentos do ácido desoxirribonucleico (ADN), provocando mutações de uma forma irregular e descontrolada, podendo invadir diferentes tecidos e propagar-se por outros órgãos adjacentes, causando as chamadas metástases [17]. Estas mutações podem ocorrer devido a vários fatores, tanto ambientais, nomeadamente poluição do meio ambiente, como maus hábitos alimentares, hereditários, etc. O crescimento anormal das células conduz à formação de massa tumoral resistente à apoptose (morte celular programada) e aos mecanismos de defesa próprios do organismo. O agravamento deste quadro pode tornar o diagnóstico adverso [7,11].

Quando o cancro é originado em células epiteliais (as células epiteliais são as responsáveis pela constituição do epitélio, um dos tipos de tecido presente no ser humano) designa-se por carcinoma [17]. Entre os vários tipos de carcinomas, o cancro da próstata apresenta um especial interesse sendo considerado como a quinta principal causa de morte e o segundo tipo de cancro mais frequente entre os homens, tal como mencionado no capítulo anterior [3]. A idade média dos pacientes com cancro da próstata é de 72-74 anos e cerca de 85% são diagnosticados após os 65 anos, existindo no entanto casos de diagnóstico em idades inferiores a 50 anos [18]. A próstata é uma glândula no sistema genital masculino que desempenha a função de armazenar e produzir secreções prostáticas como o PSA [19]. O PSA é uma serina protease que pertence à família das calicreínas (KLKs) (grupo de proteases codificadas) que é produzido pela próstata e expelida no plasma seminal [19]. Além disso, o PSA é o principal biomarcador utilizado para detetar o cancro da próstata devido à relação entre sua concentração e as alterações que ocorrem na glândula. De forma a avaliar/despistar a possível presença de tumor na próstata, atualmente a análise mais comum consiste na determinação da concentração de PSA no sangue. Aquando a existência de níveis elevados de PSA e/ou da deteção de alguma anomalia deste órgão, os pacientes são tipicamente submetidos a uma biópsia. A biópsia permite a análise da anatomia patológica dos tecidos da próstata, sendo extraída uma pequena parte do tecido prostático para avaliar algumas propriedades, nomeadamente textura, consistência e aparecimento de nódulos. Podem ainda ser realizados exames de imagem através de ecografia transretal, que permite determinar o volume da próstata, bem como detetar modificações que possam ter ocorrido nesses tecidos [20]. A partir do resultado anátomo-patológico atribui-se um fator de acordo com a classificação de Gleason, numa escala de 6 a 10, a partir da comparação dos tecidos cancerosos com os tecidos normais da próstata. Deste modo, quanto maior for a diferença entre os tecidos, maior é o grau de classificação atribuído [21].

A avaliação da fase de desenvolvimento, ou estadio em que o cancro é diagnosticado é um fator determinante no prognóstico do paciente, pois existe uma melhor perceção do desenvolvimento da doença, bem como dos tratamentos mais adequados. É importante avaliar a existência de células tumorais e se a sua proliferação atingiu órgãos próximos [21]. Dependendo da dimensão do crescimento das células tumorais, o tumor maligno pode ser classificado segundo a categoria T, que apresenta uma escala de 1 a 4. Nesta escala, o fator 1 indica a presença do tumor por meio de biópsia e por concentrações de PSA elevadas, pois a massa tumoral não é palpável e nem pode ser visto nos testes de imagem. A classificação T1 corresponde ao **estadio I**. A próxima classificação T2 está associada ao **estadio II**. Nessa fase, o tumor é palpável e visto pelos exames de imagem, mas ainda não se espalhou para outros órgãos. À medida que este fator aumenta, aumenta também a probabilidade de desenvolvimento do cancro, bem como o aumento da probabilidade de as células tumorais se terem espalhado. No **estadio III**, as células tumorais já se desenvolveram o suficiente para alcançar tecidos adjacentes à próstata, recebendo a classificação de T3. Por fim, no **estadio IV** (classificação T4) o cancro já invadiu outros órgãos e gânglios linfáticos, dificultando os tratamentos para a cura da doença [21]. A **Tabela 1** mostra a correlação entre os valores

de concentração de PSA no sangue e o valor correspondente na escala de Gleason, assim como as respectivas probabilidades de ocorrência de cancro em função desses valores.

Tabela 1: Valores de referência para as diferentes concentrações de PSA com a correspondente escala de Gleason e a probabilidade de ocorrência de cancro da próstata (PCa) [22].

Concentração de PSA (ng.ml ⁻¹)	Escala de Gleason	PCa (%)
0,0 - 0,5	0,8	6,6
0,6 – 1,0	1,0	10,1
1,1 – 2,0	2,0	17,0
2,1 – 3,0	4,6	23,9
3,1 – 4,0	6,7	26,9

Contudo, os exames frequentemente utilizados, como o toque retal ou mesmo a ecografia, possuem taxas elevadas de falsos-positivos, uma vez que a avaliação do resultado é extremamente dependente do técnico que realiza e relata a análise, e também da localização do tumor [20].

Assim, o desenvolvimento de métodos que permitem a determinação dos níveis de PSA no sangue revolucionaram a detecção precoce do cancro da próstata nas últimas década [23]. A partir das amostras de sangue determina-se a concentração de PSA para obter informações sobre as características morfológicas da próstata, bem como possíveis traumas e inflamações. Deste modo, quanto maior for a concentração de PSA no plasma ou no sangue, maior será o risco da próstata apresentar esse tipo de cancro (valores abaixo de 4,0 ng.ml⁻¹ são considerados normais, enquanto que entre 4,0 e 10,0 ng.ml⁻¹ ou acima indicam uma probabilidade de até 67% de existência do cancro) [24]. Essa concentração pode ser obtida através da técnica ELISA, que consiste em revestir uma superfície com o anticorpo de interesse (anticorpo primário), numa concentração conhecida, para que possa estabelecer as ligações específicas e capturar os antígenos presentes no plasma do paciente. De seguida, são adicionados anticorpos secundários responsáveis pelo reconhecimento do antígeno. Esse anticorpo secundário contém uma enzima acoplada que se liga aos marcadores fluorescentes presentes numa solução adicionada na última etapa do teste [25]. O produto da reação da catálise é medido em termos da transmitância. O sinal resultante da reação antígeno-anticorpo pode ser visto a olho nu pela variação da coloração da solução ou quantificada usando um espectrofotómetro, com comprimentos de onda específicos para cada cor produzida [26].

Os biomarcadores são avaliados e medidos como indicadores de processos biológicos que envolvam ADN, ARN, proteínas e suas modificações. No caso dos biomarcadores tumorais, essas macromoléculas estão presentes nos tumores, nos fluidos corporais, no sangue, pelo que através das suas concentrações é possível monitorizar as reações biológicas que ocorrem nos órgãos devido à presença do tumor. No entanto, estes marcadores podem estar presentes no organismo sem que haja de facto uma anomalia maligna presente. A análise do PSA para detecção de cancro da próstata generalizou-se de tal forma que neste momento é um teste amplamente utilizado como teste de despiste mesmo quando não existem sintomas. Consequentemente, a percentagem de homens com metástases derivadas deste tipo de cancro diminuiu consideravelmente. Contudo, muitos homens com anomalias não associadas a tumores, como por exemplo inflamação da próstata ou hiperplasia, apresentam também valores elevados de PSA no sangue. Estima-se que até 50% dos novos diagnósticos de cancro da próstata através da avaliação dos níveis de PSA não resultarão num tumor maligno, expondo os pacientes a exames e mesmo tratamentos considerados desnecessários [27]. Assim, embora a detecção das concentrações de PSA seja de extrema importância, o acompanhamento com outras técnicas de diagnóstico complementares deverá ser sempre uma realidade.

2.2 Biossensor: Princípio de funcionamento

Um biossensor é definido como um dispositivo que utiliza elementos biológicos como elemento de bioreconhecimento capaz de reagir de uma forma específica com os analitos desejados, convertendo essa reação num sinal físico que possa ser quantificado. Tipicamente, é composto por dois elementos principais: uma camada de bioreconhecimento, que reage com a biomolécula a detetar (analito); o transdutor, que mede e converte a resposta da interação entre o analito e o bioreceptor num sinal físico mensurável. E por fim a parte de tratamento do sinal, incluindo amplificadores, filtros, etc, bem como um *software* que interpreta, armazena e exibe os resultados. Através destes componentes, os biossensores podem ser classificados de acordo com os elementos biológicos envolvidos no sistema de deteção, bem como pelo tipo de mecanismo de transdução [12]. A **Figura 2.1** esquematiza os diferentes componentes e alguns exemplos de analitos, bioreceptores e métodos de transdução.

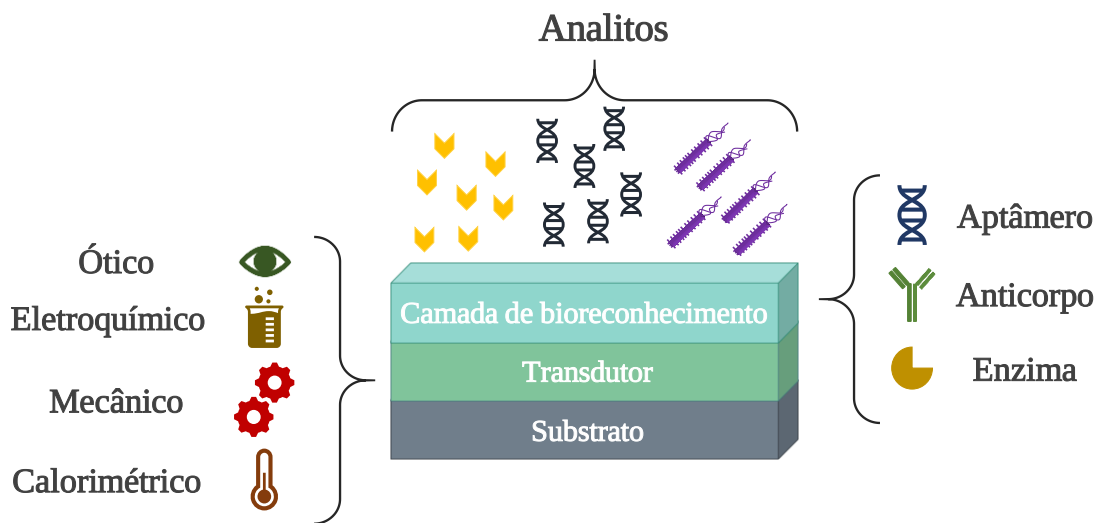


Figura 2.1: Esquema dos principais componentes de um biossensor. Adaptado de [12].

Bioreceptor

O elemento de bioreconhecimento, ou bioreceptor, é um dos componentes mais importantes de um biossensor, pois é com ele que o analito reage e é detetado. Além disso, é esse o elemento que confere sensibilidade e seletividade ao sistema. Enzimas, anticorpos, e aptâmeros são alguns exemplos de bioreceptores comumente utilizados em biossensores, constituindo uma das formas de diferenciação deste tipo de dispositivos. Assim, os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de elemento de bioreconhecimento, por exemplo, o enzimático (enzimas como bioreceptor), o imunossensor (anticorpos) e o aptasensor (aptâmeros), entre outros [28]. Os biossensores enzimáticos são baseados na **biocatálise** proveniente das enzimas quando em contacto com o respetivo substrato. A enzima captura e converte cataliticamente o analito alvo num subproduto, cuja interação com o transdutor conduz a um sinal mensurável. Como principal exemplo, destaca-se o primeiro biossensor com transdução eletroquímica desenvolvido por Clark e Lyons, em 1962, com intuito de monitorizar as concentrações de glicemia existentes em amostras de sangue. Neste sensor, o bioreceptor era a enzima glicose oxidase, responsável pelas reações catalíticas de oxidação da glicose, dando origem à libertação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), permitindo determinar os níveis glicémicos dos pacientes através da monitorização da sua concentração [28,29]. Já os imunossensores baseiam-se na **bioafinidade** entre anticorpo-antígeno. Estes elementos biológicos têm ligações extremamente específicas entre si, uma vez que os anticorpos se ligam

especificamente aos patogênicos ou toxinas que deverão combater no sistema imunitário do hospedeiro, o que torna este tipo de sensor extremamente seletivo e sensível [30].

Um dos principais obstáculos no desenvolvimento dos biossensores está relacionado com a imobilização, orientação e a conservação das propriedades do bioreceptor e do analito sobre a superfície do transdutor [31]. A escolha da técnica de imobilização tem de ter em consideração o tipo de material utilizado para o transdutor, a natureza do bioreceptor e do analito, bem como as condições de temperatura e pH a que serão submetidos, para assim obter o máximo de desempenho da camada de bioreconhecimento. Entre os vários tipos de técnicas de imobilização, o presente trabalho discutirá essencialmente adsorção física e a ligação covalente. A mais simples, a adsorção física, consiste em incorporar os bioreceptores na superfície transdutora através de interações eletrostáticas e de Van der Waals, sendo a sua orientação aleatória em relação à superfície. Em contrapartida, a imobilização por ligação covalente é realizada por meio de agentes intermediários (ligantes), como por exemplo, o 3- amino- propil- triethoxysilane (APTES) que contém um grupo silano capaz de se ligar com diversos substratos, e um grupo amina que forma ligações covalentes com grupo carboxílico na base dos anticorpos, garantindo assim o seu correto alinhamento em relação à superfície do transdutor e deixando livres os grupos amina do anticorpo para reagirem com o respetivo antígeno. Nas **Figura 2.2 (a.1)** e **Figura 2.1 (a.2)** estão ilustradas as duas técnicas de imobilização descritas anteriormente.

Relativamente à conceção do biossensor, neste trabalho optou-se por tirar partido da bioafinidade entre anticorpo-antígeno, utilizando assim anticorpos anti-PSA para formar a camada de bioreconhecimento, que estabelecem ligações específicas com o antígeno de interesse, neste caso o PSA.

O anticorpo é uma glicoproteína produzida pelo sistema imunitário em resposta à presença de antígenos como agentes patogênicos (*e.g.* vírus, bactérias) ou qualquer substância nociva ao organismo. Na sua forma cristalina, o anticorpo possui dimensões de aproximadamente $142 \text{ \AA} \times 85 \text{ \AA} \times 38 \text{ \AA}$ [32]. Uma das principais características dos anticorpos é que cada um deles é sintetizado de maneira a terem especificidade elevada para um único tipo de antígeno. Assim, o anticorpo interage quimicamente e estabelece ligações com apenas um antígeno específico, para então, neutralizá-lo e removê-lo do organismo. Existem cinco classes de anticorpos (*e.g.* imunoglobulinas, Igs): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Geralmente, a camada de bioreconhecimento dos biossensores é formada pelos anticorpos da classe IgG, que possuem uma forma de Y composta por dois fragmentos idênticos, Fabs, e uma base, Fc, como mostra a **Figura 2.2 (b)**.

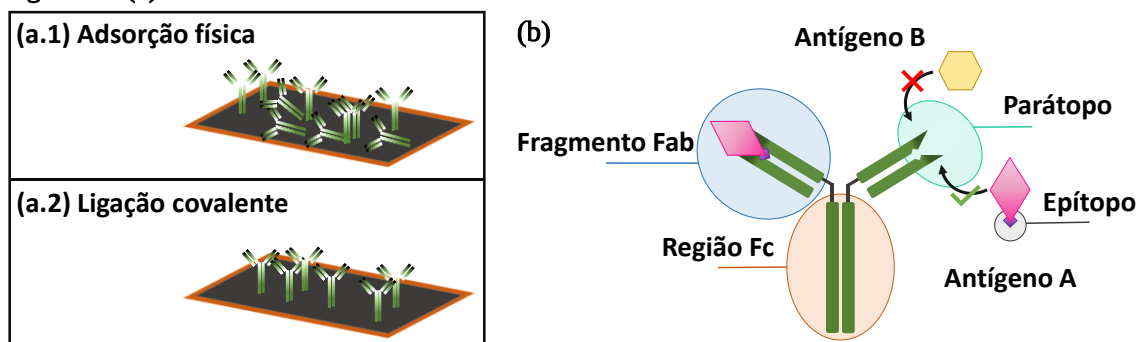


Figura 2.2: Em (a.1) e (a.2) é ilustrada a imobilização por adsorção física e por ligação covalente, respetivamente. Em (b) está representado um esquema do anticorpo IgG e os dois fragmentos Fab onde se localiza o parátopo que interage com epítopo do antígeno e a região Fc. É importante notar que o parátopo é quimicamente formado para se ajustar perfeitamente ao epítopo do antígeno A, excluindo a ligação antígeno B. Adaptado de [25].

A região Fc é a base do anticorpo e através da qual ele se liga com outras células do sistema imunitário, além de ser o local que deve interagir com a superfície transdutora do biossensor. O fragmento Fab é a parte do anticorpo que interage com o antígeno. A ligação é estabelecida entre a extremidade do fragmento

Fab, parátopo, e o elemento de reconhecimento do antígeno, epítopo. A ligação anticorpo-antígeno ocorre através de interações químicas específicas (*e.g.* dipolo-dipolo, Van der Waals, ligação de hidrogénio). Essa reação é tão específica que pequenas alterações na ligação, como uma alteração de um aminoácido no local da interação, pode enfraquecer ou anular a conexão anticorpo-antígeno [25].

A superfície transdutora do biossensor proposto neste trabalho é composta por compósitos de ZnO/LIG. O ZnO é um excelente candidato para ser utilizado em biossensores por possuir um ponto isoelétrico elevado (IEP), biocompatibilidade e ser quimicamente estável. O ponto isoelétrico do ZnO é de aproximadamente de 9,5, superior aos valores tipicamente reportados para as biomoléculas de interesse (por exemplo, enzima glicose oxidase tem o IEP \sim 4,2 [33]). Portanto, em teoria, as superfícies que contém o ZnO formam uma matriz ideal para a imobilização dos bioreceptores sem necessidade de procedimentos complexos. Em condições de pH fisiológico, as biomoléculas têm IEP baixo (no caso da anti-PSA o IEP é de cerca de 6,8-7,5 [34]), e assim poderão ser facilmente imobilizadas por interações eletrostáticas com a superfície do ZnO. Devido a este fenómeno, a técnica de imobilização escolhida para este trabalho foi a adsorção física. Deste modo, ao adicionar o anticorpo à superfície transdutora, o ZnO estabelecerá a ligação com bioreceptor, não sendo preciso recorrer a técnica por ligação covalente [35]. No entanto, esta aproximação tem a desvantagem de não garantir a adequada orientação do anticorpo, tal como mencionado acima, disponibilizando assim menos pontos de interação com o antígeno.

Transdutor

O transdutor é o elemento do biossensor responsável pela conversão do produto da interação entre bioreceptor e o analito alvo num sinal detetável e mensurável, podendo esse sinal ser expresso em termos de variação da corrente elétrica, do potencial, da impedância, da luminescência, da temperatura, entre outros [30]. Assim, os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de mecanismo de transdução, como por exemplo:

- **Biossensor ótico:** são avaliadas as alterações nas propriedades óticas da superfície do transdutor aquando a interação entre o analito e o bioreceptor, nomeadamente na absorvância, luminescência, refletância, entre outros [11].
- **Biossensor eletroquímico:** utiliza como elemento transdutor materiais que geram um sinal elétrico e que sejam sensíveis as mudanças que ocorram na superfície do eletrodo, devido ao produto das reações químicas e interações que ocorrem entre o bioreceptor e o analito [12].
- **Biossensor mecânico (*e.g.* piezoelétrico):** o elemento principal é um pequeno cantiliver sensível à biomolécula de interesse. Como exemplo, os biossensores piezoelétricos são construídos de forma semelhante à microbalança piezoelétrica de quartzo onde o cristal é revestido com a camada de bioreconhecimento e está situado entre dois eletrodos que aplicam uma tensão AC. Isto faz com que o cristal vibre com uma frequência de ressonância específica, cuja alteração está ligada à variação da massa devido à ligação entre analito e bioreceptor [36].
- **Biossensor calorimétrico (termométrico):** mede as reações exotérmicas resultantes de reações químicas envolvendo o analito. Como exemplo, as reações enzimáticas geram calor, e alterações neste parâmetro são proporcionais à concentração de analito. As reações são monitorizadas pelas mudanças na entalpia, indiretamente fornecendo informação sobre a concentração de analito na superfície do transdutor [11].

Para determinar as características do biossensor, a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) estabeleceu algumas figuras de méritos que permitem a validação dos processos e a comparação entre diferentes sensores de forma quantitativa. A escolha dos componentes do sensor mencionados acima confere as seguintes figuras de mérito, cuja combinação permite caracterizar o desempenho do sensor [37,39]:

- **Sensibilidade:** está associada com as variações no sinal físico do transdutor que ocorrem com as mudanças na concentração do analito. Pequenas mudanças na concentração do analito devem conduzir a grandes mudanças no sinal do transdutor. A sensibilidade é normalmente traduzida pela curva de calibração do sistema. Na gama de resposta linear, esta grandeza é definida pela razão entre o sinal de saída e sua correspondente concentração, ou seja, o declive da reta de calibração.
- **Seletividade:** mostra a capacidade do sensor em diferenciar o sinal proveniente do analito alvo, permitindo quantificar adequadamente a concentração do analito mesmo na presença de interferentes. A seletividade expressa-se pela razão entre os declives das retas de calibração do analito de interesse e de uma determinada interferência.
- **Gama linear:** é o intervalo de valores de concentração de analito para qual a função de calibração é linear.
- **Gama dinâmica:** estabelece o limite absoluto da concentração do analito que pode ser determinada.
- **Limite de detecção (LOD):** está relacionado com a concentração mínima que o sensor é capaz de detectar, isto é, corresponde ao valor mínimo da concentração do analito para que o sinal de saída seja distinguível do sinal gerado sem o analito.
- **Limite de quantificação (LOQ):** é a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra de forma fiável.
- **Reprodutibilidade:** concordância entre medidas sucessivas do mesmo parâmetro, realizadas em condições diferentes (*e.g.* diferentes utilizadores ou equipamentos experimentais).
- **Repetibilidade:** concordância entre medidas sucessivas do mesmo parâmetro, realizadas nas mesmas condições de medida.

Assim, neste trabalho, para a transdução explorou-se uma combinação de detecção ótica e eletroquímica, para assim aumentar a sensibilidade e fiabilidade do sensor, pois permite a obtenção de dois sinais distintos no mesmo dispositivo, contribuindo assim para evitar a ocorrência de falsos-positivos.

Biossensor ótico

Os biossensores baseados na transdução ótica são considerados promissores para a próxima geração de sensores para monitorização de diversos parâmetros biológicos [40]. Neste tipo de dispositivo, a interação entre o bioreceptor e o analito deverá provocar uma alteração no sinal ótico, nomeadamente de absorvância, luminescência ou refletância, por exemplo [11]. É essa alteração no sinal ótico do transdutor, em função da concentração do analito presente, que vai permitir efetuar a calibração do sistema e possibilitar uma correlação entre o sinal medido e a concentração de analito. Essa informação é posteriormente convertida num sinal elétrico/digital, cujo *software* de análise possibilitará a leitura dos resultados pelo utilizador. Geralmente, os biossensores óticos são classificados de acordo com o tipo de detecção, direta ou indireta. No caso em que se mede o sinal gerado pela superfície do transdutor, como por exemplo os biossensores baseados na ressonância do plasmão ou luminescência, a detecção é classificada como direta. Já a detecção indireta requer marcadores (como corantes fluorescentes) que indicam e auxiliam no processo de detecção dos analitos alvo [40].

Neste trabalho, tal como mencionado anteriormente, é de interesse desenvolver biossensores baseados nas propriedades de luminescência dos materiais transdutores, sendo, portanto, classificados como de detecção direta. Um **biossensor baseado em fotoluminescência (PL)** deverá ser capaz de detectar a variação do sinal de PL gerado pelo transdutor na presença de eventos de bioreconhecimento entre o analito e o bioreceptor. A PL é uma técnica de caracterização muito útil na avaliação das propriedades da superfície e/ou interfaces dos materiais, apresentando assim um elevado potencial como mecanismo de detecção. Tipicamente, o sinal de PL é extremamente sensível a pequenas variações na superfície dos materiais, nomeadamente no que diz respeito à concentração e tipo de espécies químicas e/ou biológicas que aí se

possam encontrar. Desta forma, sensores baseados neste tipo de transdução permitem uma elevada sensibilidade e seletividade. Neste caso, o sinal ótico produzido pela interação entre os fótons da fonte de excitação com a superfície do transdutor é medido antes e depois da imobilização da camada de bioreconhecimento, bem como depois do analito ser adicionado. Deste modo, estuda-se a variação do sinal de PL em função da interação do bioreceptor com as diferentes concentrações de analito. Idealmente, a mudança no sinal (*e.g.*, intensidade relativa dos centros óticos) no sistema transdutor já com a camada de bioreconhecimento deverá ser proporcional à concentração de analito na sua superfície, de forma a poder ser traçada uma curva de calibração. Como exemplo, o grupo de Viter *et al.* utilizou nanobastonetes de ZnO como material transdutor para detetar a presença de *Salmonella*, testando concentrações 10^1 - 10^6 cel.ml⁻¹. A camada de bioreconhecimento era composta por anticorpos anti-*Salmonella* e foi também imobilizada na superfície do transdutor através de adsorção física. Monitorizando as intensidades máximas das bandas presentes nos espectros de PL, estes autores verificaram que com a adição da camada de bioreconhecimento se observava um aumento na intensidade da luminescência. Contudo, após adicionarem a *Salmonella*, a intensidade de PL diminuiu proporcionalmente com o aumento da sua concentração. O biossensor produzido apresentava resposta mensurável e distinguível, no intervalo de concentração entre 10^2 - 10^5 cel.ml⁻¹, saturando para concentrações superiores a 10^5 cel.ml⁻¹ e não sendo estável para concentrações inferiores a 10 cel.ml⁻¹. Este resultados põem em evidência a viabilidade de utilizar o sinal de fotoluminescência como mecanismo de transdução em imunossensores [40,41].

Biossensor eletroquímico

Os biossensores eletroquímicos são os mais comercializados e difundidos atualmente devido à sua elevada sensibilidade e seletividade, reprodutibilidade, facilidade de manuseamento, assim como custos reduzidos de produção e operação [42,43]. Até à data, tais dispositivos têm permitido desenvolver sensores capazes de detetar os níveis de glicose no sangue, para monitorar doenças como diabetes, ou mesmo concentrações de marcadores tumorais associados a diversos tipos de cancro [8]. Os biossensores baseados na transdução eletroquímica geram uma resposta elétrica (*e.g.* corrente elétrica ou diferença de potencial) aquando da reação que se pretende monitorizar [12]. Ou seja, medem as mudanças originadas pelas ligações químicas entre o analito e bioreceptor estabelecendo uma correlação entre a resposta eletroquímica e a concentração de analitos presentes. Uma vez que estas reações ocorrem geralmente na região próxima da superfície do eléctrodo usado como transdutor, estes desempenham um papel fundamental na deteção. Relativamente ao tipo de resposta, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com a técnica utilizada para aceder ao sinal, assim podemos ter sensores amperométricos, potenciométricos, impedimétricos, entre outros [44]. Os sistemas eletroquímicos requerem essencialmente três tipos de eléctrodos: eléctrodo de trabalho (WE), eléctrodo de referência (RE) e contra eléctrodo (CE) que, geralmente, estão incorporados numa solução eletrolítica responsável pelas medidas eletroquímicas e por integrar todos os componentes. O eléctrodo de trabalho é utilizado como elemento transdutor e onde as reações vão ocorrer, possuindo por isso a camada de bioreconhecimento. Já o eléctrodo de referência é responsável por fornecer um valor de potencial conhecido e estável em relação ao qual os potenciais de outras reações de interesse podem ser medidos. O eléctrodo de referência está posicionado o mais próximo possível do eléctrodo de trabalho, de forma a minimizar as perdas óhmicas na solução. Não existe corrente a fluir por este eléctrodo. Por fim, o contra eléctrodo estabelece uma ligação com a solução eletrolítica de forma a fechar o circuito da célula eletroquímica. Tanto o eléctrodo de trabalho como o contra eléctrodo devem possuir uma elevada condutividade elétrica e serem quimicamente estáveis [12,31].

O **biossensor impedimétrico** é capaz de monitorizar a interação entre o analito e bioreceptor através da variação da capacitância ou da resistência à transferência de carga num sistema eletroquímico. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é a técnica utilizada na transdução do biossensor impedimétrico, conferindo-lhe sensibilidade elevada e a capacidade de caracterizar diferentes entidades

biológicas. Esse biossensor permite medir os analitos de interesse, sem a necessidade de marcadores enzimáticos. A impedância é definida por um vetor complexo, constituído pelas componentes real (resistência) e imaginária (reactância), que pode ser correlacionado diretamente com o analito ligado à superfície transdutora. Assim, num biossensor impedimétrico, uma variação na concentração do analito leva à uma alteração na impedância do transdutor. Devido a estas características, o biossensor com transdução dupla proposto neste trabalho utilizará também a transdução impedimétrica como meio de deteção do analito.

2.3 Materiais: Propriedades e aplicações

A escolha do material para a fabricação do transdutor é de extrema importância para o desempenho do sensor. Nesta perspectiva, os nanomateriais têm-se revelado bastante promissores devido à possibilidade de controlar e modificar propriedades como a sua dimensão, forma (nanopartículas (NPs), nanotubos, nanofios, etc). Além disso, os materiais à nano escala apresentam uma elevada área de superfície específica, oferecendo mais pontos de ancoragem para os bioreceptores e, conseqüentemente para a interação com o analito. Esta propriedade é essencial na produção de biossensores, uma vez que as reações que se pretendem monitorizar ocorrem maioritariamente nessa região [13,45].

Nanopartículas metálicas (*e.g.*, Ni, Cu, Au, Ag), de materiais óxidos (*e.g.*, ZnO, SnO₂, Fe₂O₃) e outros semicondutores (*e.g.*, Si, InP, GaN), bem como materiais à base de carbono (*e.g.*, nanotubos, grafeno), são alguns exemplos de materiais que se têm revelado atrativos devido à possibilidade de controlar algumas das suas propriedades, como por exemplo, a sua morfologia, de forma a maximizar a sua razão superfície/volume. São ainda materiais que podem ser produzidos em larga escala, a custos relativamente reduzidos, apresentando boa estabilidade química e biológica, bem como biocompatibilidade. Assim, estes materiais não deverão ter qualquer efeito nos elementos biológicos usados tanto como bioreceptor como nos analitos. Todos estes fatores são determinantes para a sua aplicação em biossensores [14,15].

Além das propriedades acima citadas, importantes para a formação da camada de bioreconhecimento, estes materiais desempenham ainda funções fundamentais no biossensor, uma vez que são eles que dão origem ao sinal que será monitorizado na deteção. Assim, deverão ainda ter boas propriedades óticas, nomeadamente propriedades luminescentes, elevada condutividade elétrica, caso seja necessário aplicar e/ou medir correntes elétricas ou diferenças de potencial, elevadas taxas de transferência de carga, importantes nos processos eletroquímicos, entre outras propriedades adequada à transdução.

Nanocarbonos

Os nanomateriais à base de carbono (nanocarbonos) são extremamente atrativos para serem usados como elemento transdutor na construção de sensores eletroquímicos devido à elevada razão área/volume que a maioria destes materiais apresenta, bem com à sua condutividade elétrica elevada (*e.g.*, 10^6 - 10^7 S.m⁻¹ para nanotubos de carbono puro e 10^8 S.m⁻¹ para grafeno puro [46]), estabilidade química, biocompatibilidade, além de permitirem uma elevada sensibilidade e baixo limite de deteção [45].

O grafeno foi produzido pela primeira vez em laboratório em 2004 e desde então tem sido um dos materiais de carbono mais exploradas devido às suas excelentes propriedades, nomeadamente a elevada área superficial (263 m².g⁻¹), módulo de Young (~1 TPa), elevada mobilidade eletrónica à temperatura ambiente (~10 000 cm².V⁻¹s⁻¹) e excelente condutividade térmica (3000-500 W.m⁻¹K⁻¹) [14]. Algumas destas propriedades apresentam-se como ideais para a sua aplicação em biossensores, bem como noutros dispositivos (*e.g.*, células solares, díodos emissores de luz, etc) [47]. Este material é constituído por 2 átomos de carbono por célula unitária, com hibridização sp², que se ligam para formar uma rede 2D tipo favo de mel. Esta “folha” de carbono pode ser vista como a base para outros tipos de estruturas de carbono com diferentes dimensões, como a grafite (3D), os CNTs (1D) ou os fulerenos (0D) [13]. Por ter essa

configuração, o grafeno possui 6 modos normais de vibração no centro da zona de Brillouin, onde seu grupo pontual é D_{6h} com a representação $\Gamma = A_{2u} + B_{2g} + E_{1u} + E_{2g}$. Somente o fonão E_{2g} é ativo em Raman, enquanto que não há modos ativos no infravermelho [48,49].

A primeira síntese de grafeno foi realizada por meio de esfoliação mecânica, utilizando uma fita cola específica para destacar folhas de grafeno a partir de grafite. Esta técnica produz grafeno de excelente qualidade, porém com dimensões reduzidas e pouco controle no processo de síntese. Portanto, outros métodos de produção têm sido explorados, como por exemplo, o crescimento epitaxial em substrato de carboneto de silício (SiC), ou de cobre por deposição química em fase vapor (CVD), entre outras. Num processo de CVD é possível produzir uma ou várias camadas de grafeno através da decomposição de um gás ou líquido (como etanol, isopropanol, etileno, etc.) compostos por átomos de carbono. Em condições de temperatura elevada e à pressão atmosférica, estes átomos de carbono são depositados num substrato, geralmente, de cobre (Cu) ou silício (Si). A técnica de CVD é simples e produz camadas de grafeno de elevada qualidade [14]. A produção em larga escala deste material continua a ser um obstáculo para a implementação à escala industrial [13]. Uma alternativa para contornar este problema tem sido produzir grafeno a partir de grafite. Neste processo ocorre oxidação da grafite e recorrendo à técnica de esfoliação térmica ou química, é possível obter o óxido de grafeno (GO), o qual é definido como um grafeno quimicamente modificado contendo grupos funcionais como carboxilo e hidroxilo [50]. De forma a minimizar a presença dos grupos funcionais contendo oxigénio e outros defeitos na rede, o óxido de grafeno pode ser reduzido, por via térmica, química ou eletroquímica, obtendo-se o óxido de grafeno reduzido, rGO. Além disso é importante referir que os grupos funcionais remanescentes podem contribuir para a imobilização das biomoléculas na superfície do grafeno, facilitando a sua funcionalização e consequentemente a imobilização do analito durante os eventos bioreconhecimento [51]. Contudo, as técnicas de redução exigem frequentemente a utilização de reagente tóxicos e temperaturas elevadas. Deste modo, surgiu a necessidade de utilizar técnicas mais eficientes para produzir grafeno e que permita funcionalizar o material com as condições desejadas.

Recentemente, o processamento a laser, designado por DLW, mostrou ser capaz de produzir estruturas complexas de grafeno a partir de polímeros (e outros materiais como têxteis ou mesmo alimentos [52]), tal como foi largamente demonstrado e estudado pelo grupo de Tour *et al.* desde 2014 [53,54]. Para formar os materiais à base de grafeno a partir de DLW é necessário irradiar a superfície de um polímero (*e.g.*, poliimida (PI)) com energia suficiente para provocar a vibração dos átomos da rede, usando, por exemplo um feixe laser (*e.g.* CO_2), em condições normais de temperatura e pressão. Neste processo ocorre aquecimento local do substrato, conduzindo a um efeito fototérmico que provoca a quebra e rearranjo das ligações dos átomos da rede [53]. No processo de recombinação, os anéis aromáticos do polímero rearranjam-se de modo a formar a nova rede de átomos, havendo conversão de carbono sp^3 em sp^2 . De seguida, os átomos residuais são liberados na forma de gases e contribuem para a formação de uma estrutura porosa, semelhante a uma espuma 3D de grafeno, designada por LIG [54]. Este processo é rápido e eficiente, não necessitando de máscaras ou catalisadores, além de não ser tóxico e possibilitar a formação de macro, micro e nano estruturas de grafeno aptas para a produção em série de dispositivos flexíveis e de baixo custo [53]. O LIG tem sido aplicado na fabricação de diversos dispositivos em áreas como a microfluídica, optoelectrónica, supercondensadores, sensores, catálise ou mesmo na área da saúde [52,54]. Como exemplo, o grupo de Fenzl *et al.* desenvolveu um biossensor eletroquímico do tipo amperométrico à base de LIG que utiliza aptâmeros como bioreceptor para detetar a trombina, uma enzima proteolítica responsável pelo processo de coagulação do sangue e associada a problemas vasculares, como a trombose. O biossensor desenvolvido por este grupo tinha LOD de 1 pM, numa solução tampão fosfatossalino (PBS) e 5 pM, numa matriz complexa de plasma [55].

ZnO

O ZnO é um material versátil muito utilizado em várias aplicações, como por exemplo, em dispositivos piezoelétricos, emissores de luz ou sensores de gás [56]. Este semiconductor do grupo II-VI possui propriedades como a biocompatibilidade, ser piezoelétrico, piroelétrico, e apresentar mobilidade eletrônica de $\sim 200 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e hiato energético direto de 3,37 eV (à temperatura ambiente) [57]. Apresenta ainda elevada energia de ligação do excitão livre (60 meV), o que o torna interessante para aplicações em fotônica [58]. Em termos de propriedade luminescentes, tipicamente, quando analisados à temperatura ambiente, os cristais de ZnO exibem uma emissão estreita na região do ultravioleta (NBE, *near band edge emission*), com máximo de emissão em 375 nm ($\sim 3,30 \text{ eV}$) e uma banda de emissão larga com máximo de emissão na gama do visível (DLE, *deep-level emission*), podendo ir desde a região espectral do azul até ao vermelho (e mesmo infravermelho próximo) [41]. Geralmente, o ZnO apresenta a estrutura hexagonal wurtzite, no entanto pode também ser encontrado noutras formas menos frequentes como a blenda de zinco (T^2_d), ou a estrutura do cloreto de sódio (O^5_h). A estrutura de blenda de zinco pode ser estabilizada pelo crescimento em substratos cúbicos adequados, enquanto que a estrutura de cloreto de sódio pode ser obtida em condições de pressão elevada [58]. Relativamente à estrutura wurtzite, esta é constituída por duas sub-redes hcp interpenetradas com parâmetros de rede, $a = b = 0,325 \text{ nm}$ e $c = 0,512 \text{ nm}$, como mostra a **Figura 2.3**. Os átomos de zinco estabelecem uma coordenação tetraédrica com quatro átomos de oxigénio, formando orbitais híbridas entre os eletrões d do zinco e os eletrões p do oxigénio. As propriedades piezoelétricas e piroelétricas, já mencionadas, estão associadas ao facto da estrutura ser não-centrossimétrica, que advém desta coordenação tetraédrica. As superfícies polares do ZnO (sendo a mais comum o plano basal) contêm iões de cargas opostas, com superfícies terminadas em Zn-(0001), com carga positiva, e superfícies terminadas em O-(000 $\bar{1}$), com carga negativa. Consequentemente, o ZnO tem um momento dipolar intrínseco, bem como uma polarização espontânea ao longo do eixo c [58].

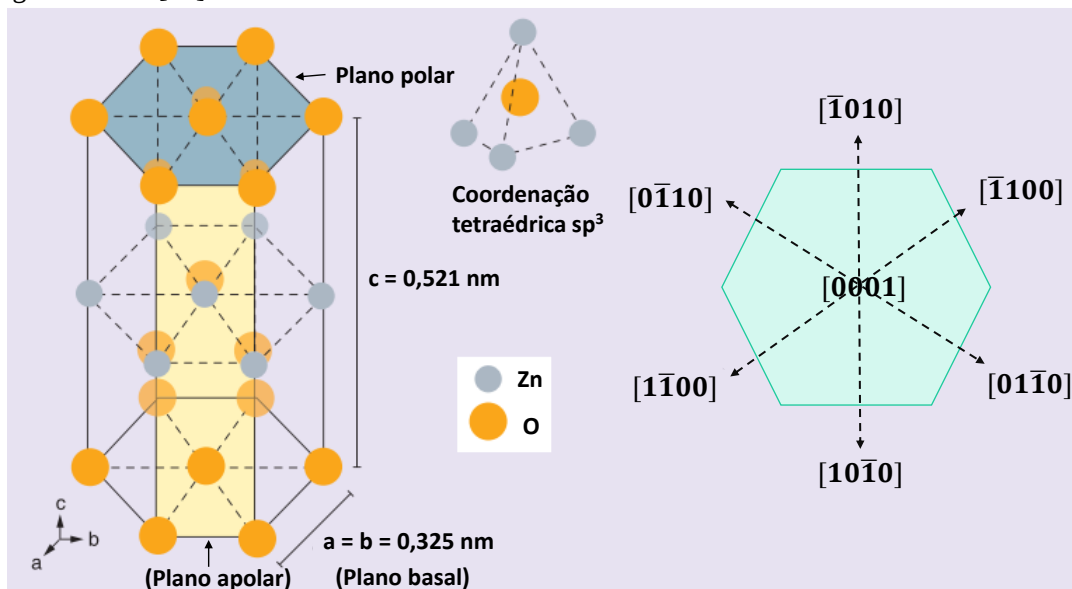


Figura 2.3: Representação esquemática da simetria não-centrossimétrica do ZnO na estrutura da wurtzite, mostrando dois planos, o polar e o apolar. A coordenação tetraédrica sp^3 para o ZnO está também ilustrada. Adaptada de [58].

A wurtzite pertence ao grupo pontual C^4_{6v} e grupo espacial $P6_3mc$ (sem centro de inversão), para esse caso, a teoria de grupos estabelece a representação irredutível $\Gamma = \Gamma_{ac} + \Gamma_{opt} = 2A_1 + 2E_1 + 2B_1 + 2E_2$ (Γ_{ac} e Γ_{opt} são modos acústicos e óticos, respetivamente) [58,59]. Para o ZnO, a estrutura wurtzite possui quatro átomos por célula primitiva que resultam em 12 modos de vibração ($3 \times 4 = 12$), 9 óticos e 3 acústicos, onde

1 fonão é longitudinal-acústico (LA), 2 são transversais-acústicos (TA), 3 são longitudinais-óticos (LO) e 6 transversais-óticos (TO). Um modo A_1 e outro E_1 correspondem aos fonões acústicos, enquanto que os modos restantes estão associados aos fonões óticos, $\Gamma_{opt} = A_1 + E_1 + 2B_1 + 2E_2$. Entre esses modos de vibração, A_1 e E_1 são ativos em Raman e em infravermelho, E_2 são somente ativos em Raman, e por fim, B_1 são considerados modos ‘silenciosos’, pois são inativos tanto em Raman como no infravermelho [58].

Os semicondutores de hiato direto, como é o caso do ZnO, possuem o máximo da banda de valência (BV) e o mínimo da banda de condução (BC) no mesmo valor k no espaço recíproco (\vec{k} é o vetor de onda), ou seja, os extremos das duas bandas estão em $k=0$, que corresponde ao ponto Γ (ponto de maior simetria) da primeira zona de Brillouin, como mostra a **Figura 2.4**. Como consequência, quando ocorre excitação do semiconductor (através da irradiação com fótons, por exemplo), um elétron é excitado do máximo da BV para o mínimo da BC, sem necessidade de criação ou aniquilação de fonões da rede, tornando a probabilidade de transição maior para materiais de hiato direto do que no caso dos de hiato indireto (em que os extremos das bandas estão situados em diferentes pontos no espaço recíproco, sendo necessária a criação de fonões para assistir a recombinação radiativa) [60].

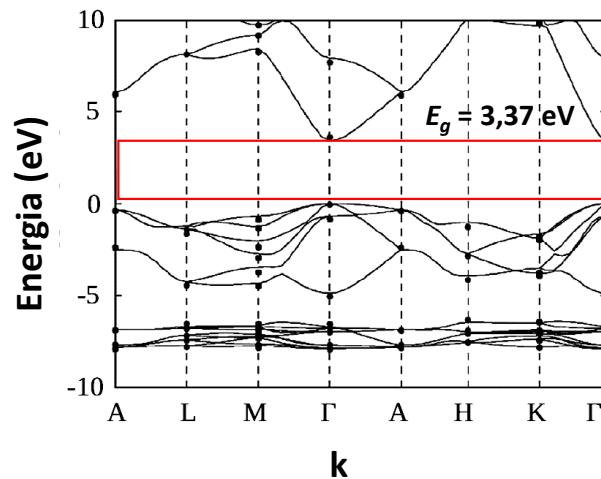


Figura 2.4: Estrutura de bandas eletrônicas do ZnO obtida através do cálculo da *density functional theory*, utilizando o método semi-empírico GGA+U. Adaptado de [61].

A versatilidade do ZnO tem origem, não só nas suas propriedades físicas, mas também na grande variedade de morfologias (nanofios (NW), tetrapodes (TPs), nanopartículas (NPs), entre outras) que este material pode adquirir, podendo as suas dimensões ser também controladas (desde micro até em nanômetros) por métodos relativamente simples e económicos. Além disso, este semiconductor tem também a facilidade em formar compósitos com outros tipos de materiais, como é o caso de alguns polímeros [15], nanopartículas metálicas [62], ou materiais à base de carbono [63]. Estruturas de compósitos baseados em ZnO têm sido utilizadas em várias aplicações. A título de exemplo, é de destacar o trabalho do grupo de Lupan *et al.* [64] que desenvolveu um sensor para detetar gases de H_2 e vapor de CH_4 através de uma matriz híbrida composta por tetrapodes de ZnO (ZnO-T) com outros óxidos de metais ou ligas por eles formadas, Me_xO_y ou $Zn_xMe_{1-x}O$ (Me: Fe, Cu, Al). Nesse estudo, as matrizes híbridas de ZnO-T- Fe_2O_3 e ZnO-T-CuO apresentaram uma resposta elevada para CH_4 , enquanto que as matrizes híbridas de ZnO-T- $ZnAl_2O_4$ tinham uma seletividade elevada para H_2 . Este resultados colocaram ainda em evidência a possibilidade de controlar a seletividade dos transdutores a diferentes gases, dependendo do tipo de compósitos que foi formado [64,65].

Compósitos de ZnO/LIG

O desenvolvimento de compósitos de ZnO com outros materiais permite combinar as propriedades de ambos os componentes, ou até mesmo melhorá-las, possibilitando assim obter características mais vantajosas para o desempenho dos dispositivos. Por exemplo, no caso dos biossensores, além de melhorar propriedades como seletividade e sensibilidade, pode ainda possibilitar mais que um tipo de transdução no mesmo dispositivo [66]. Como já mencionando anteriormente, os materiais de carbono possuem características interessantes para a implementação em vários tipos de aplicações, mas também para formar compósitos com semicondutores, nomeadamente com o ZnO. As propriedades de alguns compósitos de ZnO com materiais de carbono têm sido estudadas pelo grupo de investigação no qual se insere este trabalho [62,63]. Um ponto comum entre os diferentes compósitos de ZnO/carbono estudados é a preservação das propriedades de luminescência do ZnO, mesmo quando presentes em quantidades inferiores às dos materiais de carbono. No caso das estruturas de ZnO depositadas no topo de CNTs alinhados verticalmente, verificou-se um aumento da intensidade do sinal de luminescência, mantendo, no entanto, a mesma forma espectral [63]. Já nos compósitos de ZnO embebidos numa membrana de CNT emaranhados (*buckypaper*), observaram-se algumas alterações na forma espectral do sinal de luminescência obtido a 14 K, nomeadamente o aumento da emissão associada a defeitos de superfície. Por outro lado, as propriedades de condução elétrica dos compósitos mostraram ser semelhantes às dos *buckypapers* compostos apenas por CNTs, evidenciando que desta forma é possível combinar as propriedades de luminescência do ZnO, exibindo ao mesmo tempo as propriedades elétricas associadas ao nanotubo de carbono [62]. Destacam-se, neste caso, o trabalho de Zhao *et al.* [67] que desenvolveu um biossensor para medir a concentração de glicose. Nesse estudo, a camada transdutora era composta por heteroestruturas de ZnO/grafeno e a camada de bioreconhecimento era formada por enzimas de glicose oxidase. As estruturas de ZnO foram crescidas sob um filme de grafeno quimicamente reduzido. Este biossensor era linearmente proporcional à concentração de glicose, na gama entre 0,2-1,6 mM com sensibilidade elevada de $17,65 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}$.

O processamento deste tipo de compósitos tipicamente requer diversas etapas para produzir os dois componentes separadamente e sua subsequente junção num único material. Geralmente, o ZnO e os materiais de carbono são produzidos separadamente com a morfologia e tamanho desejado, e só depois são postos em contacto utilizando técnicas como banho químico, *drop casting*, *spin coating*, entre outras [68]. Além disso, antes desse processo, é ainda frequente ser necessário submeter um dos componentes (ou ambos) a tratamentos adicionais de forma a modificar a sua superfície, de modo que seja possível estabelecer uma ligação entre eles, seja do tipo covalente, não covalente ou eletrostática, resultando assim em procedimentos complexos [69]. Outra abordagem é a síntese direta de um dos componentes na presença do outro já processado previamente, como é o caso da deposição eletroquímica, permitindo assim uma maior interação entre os dois materiais [63]. Ainda assim, embora exija menos etapas de processamento, são necessários vários passos para alcançar o compósito desejado [63]. Para simplificar estes processos, o presente trabalho apresenta a síntese do compósito de ZnO/LIG, numa única etapa de processamento, através da irradiação de um laser de CO₂ na superfície de um substrato de PI (Kapton®) revestido com uma camada de precursor para a formação do ZnO. Esta síntese simultânea apresenta vantagens face às restantes abordagens, não só pela simplicidade e rapidez do processo, mas também pela promoção de uma maior adesão e interação entre o ZnO e o LIG, bem como a produção em larga escala dos compósitos de ZnO/ LIG em substratos flexíveis, com possível interesse industrial.

3. Procedimento experimental

3.1 Produção dos compósitos ZnO/LIG por síntese simultânea

Para o trabalho aqui proposto foram desenvolvidos compósitos de ZnO/LIG para serem aplicados como transdutores/eléttodos para integrar um biossensor com transdução ótica (fotoluminescência) e eletroquímica (impedimétrica) simultânea. Para isso, estes compósitos foram produzidos por processamento a laser através do método de DLW. Neste caso, um laser contínuo de CO₂ (*Redsail M500*), com comprimento de onda de 10,6 μm, potência máxima de 50 W e diâmetro do feixe na ordem de ~100 μm, foi utilizado como fonte de aquecimento. Os compósitos foram formados ao irradiar uma folha de Kapton® (*HN500*) contendo uma camada de pós comerciais de Zn metálico ou ZnO, embebidos numa pasta viscosa. A pasta foi utilizada para promover uma melhor adesão deste precursor à folha de Kapton®, evitando perdas do mesmo durante o processamento a laser. Desta forma, o Kapton® age como precursor para formar o LIG, enquanto a pasta de Zn/ZnO é o precursor para a formação das estruturas de ZnO. Todos os precursores foram preparados seguindo o mesmo procedimento: espalhou-se 1 ml de pasta utilizando uma lâmina de vidro, via *Doctor Blade*, numa área definida de Kapton®, 4×4 cm². De seguida, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico durante 1 hora a 100°C para promover uma secagem mais homogénea e garantir que a camada precursora se mantenha com uma boa aderência ao polímero durante e após o processamento a laser. Este passo de tratamento térmico foi adicionado uma vez que as amostras produzidas sem ele apresentavam alguns problemas, nomeadamente demasiado tempo para secar ao ar (podendo chegar a dias) e, quando não completamente secas, o jato de ar proveniente do sistema acoplado ao laser fazia com que a pasta fosse removida do Kapton®, ou mesmo após o processamento a laser a pasta não processada espalhava-se para a zona das amostras processadas. A **Figura 3.1** mostra uma representação esquemática de todo o processo de preparação dos compósitos.

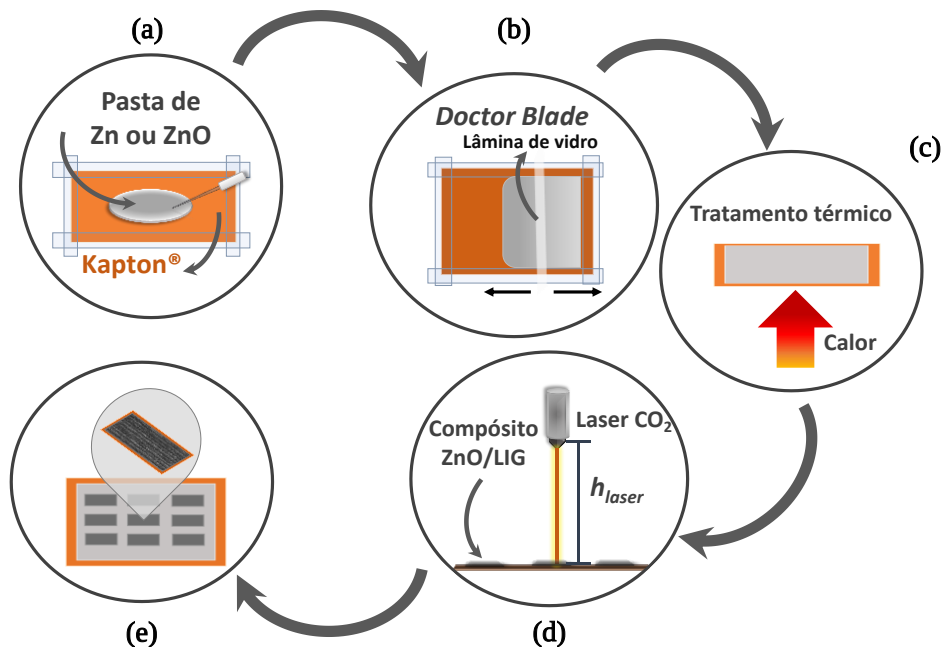


Figura 3.1: Esquema da preparação dos compósitos ZnO/LIG: (a) aplicação da pasta precursora da formação de ZnO (com zinco metálico ou óxido de zinco) no Kapton®; (b) espalhamento da pasta através da técnica de *Doctor Blade*; (c) tratamento térmico para secagem homogénea do precursor de ZnO; (d) processamento com laser de CO₂ e formação dos compósitos de ZnO/LIG; (e) esquema do resultado final das amostras.

Ao longo deste trabalho foram preparadas várias pastas, utilizando diferentes proporções dos compostos orgânicos que as constituem, bem como dos pós precursores para a formação de ZnO, nomeadamente utilizando pós comerciais de zinco metálico (*Sigma-Aldrich, purum*) ou de óxido de zinco (AnalaR, 99.7%), com o intuito de melhorar a homogeneidade desta camada na superfície do Kapton®, quer em termos de espessura, quer em termos de distribuição de ZnO, bem como de promover a formação de uma maior quantidade de estruturas de ZnO. Após alguns ensaios utilizando as diferentes pastas, a abordagem selecionada foi uma pasta contendo: 2 g de pó precursor (Zn ou ZnO), 4 ml de etanol, 1 g etilcelulose (*Sigma-Aldrich*) e 8 g de terpineol (*Sigma-Aldrich*). Esta mistura foi colocada durante cerca de 1 hora em banho de ultrassons e mais 30 minutos em agitação magnética, para que todos os elementos da pasta fossem incorporados de forma homogênea. Após a deposição e secagem desta pasta nos substratos de Kapton®, estudou-se o efeito de diferentes parâmetros de processamento, nomeadamente velocidade de varrimento do feixe laser v (100-350 mm.s⁻¹), potência de saída P (com valores entre 18 a 28 W), distância entre as linhas de varrimento d (0,075-2 mm, na direção X), distância entre a cabeça do laser e o substrato h_{laser} (1,8-2,4 cm), onde 1,8 cm corresponde à distância de foco do laser. O processo de varrimento a laser para síntese simultânea dos compósitos ZnO/LIG por DLW está representado em mais detalhe na **Figura 3.2**. Nesse processo, tanto o LIG como o ZnO são produzidos num único passo. Todos os transdutores produzidos tinham as mesmas dimensões, 8×3 mm². Estes parâmetros permitiram a síntese simultânea tanto do LIG como do ZnO, preservando uma fina camada de Kapton® que atua como substrato flexível para os compósitos. Além disso, amostras contendo somente LIG foram também produzidas com as mesmas condições, de forma a servirem como referência, especialmente importante no caso da caracterização eletroquímica.

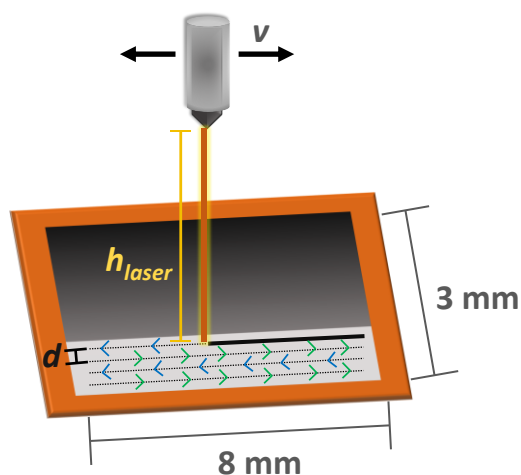


Figura 3.2: Esquema do processamento a laser para formar os compósitos de ZnO/LIG. O transdutor tinha dimensões de 8×3 mm². v corresponde à velocidade de varrimento, d à distância entre as linhas de varrimento, na direção X, e h_{laser} é distância entre a cabeça do laser e o substrato.

Como já mencionado, o LIG é formado a partir do efeito fototérmico aquando da interação do feixe do laser com a superfície do Kapton®. Alguns dos produtos formados no processamento são gases resultantes da decomposição do polímero, nomeadamente CO₂, H₂O e CO [70], responsáveis por criar os poros presentes no LIG durante a sua libertação, além de poderem também desempenhar um papel importante na forma como as partículas de ZnO se espalham na sua superfície. Dependendo dos parâmetros de processamento escolhidos, a estrutura do LIG pode apresentar mais ou menos poros, de diferentes dimensões, e até mesmo fibras de carbono, quando são aplicadas potências mais elevadas [71]. Além disso, a atmosfera onde o LIG é processado pode influenciar nas propriedades de molhabilidade, como foi estudado pelo grupo de Tour *et al.* [72]. Neste estudo verificou-se que a superfície do LIG era superhidrofílica quando o procedimento era realizado numa atmosfera de O₂ ou ar (ângulo de contacto

$\sim 0^\circ$, maior molhabilidade), enquanto que a superfície se tornava superhidrofóbica numa atmosfera de Ar ou H_2 (ângulo de contacto $>150^\circ$, menor molhabilidade). No caso deste trabalho, todas as amostras foram processadas ao ar, no entanto a interação com os componentes da pasta precursora para a formação de ZnO poderá também afetar esse parâmetro. Na **Figura 3.3** está representada a imagem de três amostras processadas por DLW com a pasta de ZnO e com os mesmos parâmetros de processamento. Nessas amostras foi adicionada uma gota de 20 μl de uma solução contendo anti-PSA diluído em PBS (pH= 7,4; *Fisher BioReagents*) para a realização da funcionalização. Ao aplicar a gota, essa permanece com uma forma semiesférica na superfície do material, formando um ângulo de contacto que varia entre $\sim 95^\circ$ a $\sim 107^\circ$. Isto indica que a superfície da amostra tem a tendência para ser hidrofóbica e, portanto, apresenta uma fraca molhabilidade, mesmo sendo processada numa atmosfera de ar. Para as medidas dos ângulos de contacto foi utilizado o *software* ImageJ [73].



Figura 3.3: Imagem das três amostras processadas com a pasta de ZnO utilizando os parâmetros de processamento: $v=200\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, $P=21\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{laser}=2,1\text{ cm}$, onde os ângulos de contacto são: (1) $105,85^\circ$, (2) $107,47^\circ$ e (3) $95,23^\circ$.

Simultaneamente à formação do LIG, ocorre a produção de partículas de ZnO originadas pela oxidação térmica do pó de Zn (no caso do precursor com Zn metálico) numa atmosfera de ar. O aquecimento local induzido pelo laser de CO_2 promove a transformação/oxidação do Zn em ZnO. Uma vez que as temperaturas atingidas nesse processo são mais elevadas que o ponto de fusão do Zn metálico ($420\text{ }^\circ\text{C}$ [74]), durante o processamento a laser poderão ocorrer simultaneamente fusão parcial e evaporação do Zn. A superfície externa das gotículas de Zn formadas aquando a sua fusão poderá reagir com o oxigénio presente na atmosfera para originar os núcleos de ZnO que irão crescer devido à continua condensação e difusão das espécies de Zn e oxigénio na fase vapor, até que as condições de processamento sejam favoráveis a que esse processo prossiga, assim formando as partículas de ZnO. Considerando uma fonte continua de oxigénio, o tamanho das estruturas de ZnO depende fortemente da temperatura local e da pressão parcial de vapor do Zn. Assim, tanto a temperatura elevada como a grande quantidade de Zn levam a um rápido crescimento das estruturas, enquanto que o oposto resulta numa redução das taxas de nucleação/crescimento. No caso das amostras com o precursor de ZnO, a formação das partículas de ZnO deverá ser essencialmente baseada num processo de evaporação térmica, à semelhança do reportado na referência [63]. Como o precursor de Zn/ZnO está incorporado numa mistura com compostos orgânicos, também é importante mencionar que, a essas temperaturas, é esperado que esses compostos sejam completamente decompostos durante o processamento a laser (para etilcelulose, a decomposição entre $230\text{ }^\circ\text{C}$ e $320\text{ }^\circ\text{C}$ [75] e o ponto de ebulição para o terpineol é cerca de $221,1\text{ }^\circ\text{C}$ [76]).

Após vários testes com combinações diferentes dos parâmetros mencionados, foram determinadas as condições que deram origem a compósitos com propriedades consideradas mais interessantes para a aplicação pretendida e foram essas que se usaram posteriormente nos passos de funcionalização. Os principais parâmetros de processamento testados quer para o precursor de Zn, quer para o de ZnO estão representados na **Tabela 2** e **Tabela 3**, respetivamente.

Tabela 2: Diferentes parâmetros de processamento testados para amostras com precursor de Zn onde v é a velocidade de varrimento do feixe laser, P é a potência de saída, d é a distância entre as linhas de varrimento (preferencialmente na direção X) e h_{laser} é a distância entre a cabeça do laser e o substrato. As amostras com * foram preparadas com duas camadas de pasta precursora de Zn.

Amostra (precursor Zn)	v (mm.s ⁻¹)	P (W)	d (mm)	h_{laser} (cm)
1	200	20,1	0,1	2
2	200	23,0	0,1	2
3	200	24,6	0,1	2
4*	150	21,2	0,1	2,1
5	150	22,1	0,2	2,1
6	150	18,0	0,1	2,1
7	200	18,0	0,1	2,1
8*	150	22,1	0,1	2,1
9	200	22,1	0,1	2,1
10*	150	22,1	0,05	2,1
11*	150	18,0	0,05	2,1
12*	150	22,7	0,05	2,1
13	150	18,0	0,1	1,8
14	100	22,1	0,2	2,1
15	200	22,1	0,1	1,8
16	85	22,7	0,2	1,8
17	150	23,0	0,1	2,1
18*	85	22,7	0,1	2,1
19	200	17,2	0,1	2,4
20	150	18,0	0,1	2,4

Tabela 3: Parâmetros de processamento testados para as amostras com precursor de ZnO.

Amostra (precursor ZnO)	v (mm.s ⁻¹)	P (W)	d (mm, na direção X)	h_{laser} (cm)
21	150	21,2	0,1	2,1
22	200	24,4	0,1	2,1
23	200	28,0	0,2	2,1
24	150	24,4	0,1	2,1
25	200	21,0	0,1	2,1

3.2 Funcionalização dos compósitos

O primeiro passo da funcionalização é estabelecer uma ligação entre elemento de bioreconhecimento, neste caso o anticorpo, e a superfície do transdutor. Neste trabalho, apesar de a imobilização do bioreceptor por ligação covalente ter sido também testada, os principais resultados foram obtidos utilizando o método simples de adsorção física, sendo este o procedimento que será detalhado nesta secção.

A funcionalização por adsorção física consiste em duas etapas: imobilizar diretamente o anticorpo na superfície do eléctrodo através da adição de uma gota da solução contendo o anticorpo e subsequente passivação, como mostra a **Figura 3.4**. Antes de se iniciarem os testes de deteção do antígeno, é necessário fazer a passivação da superfície do eléctrodo para que o analito interaja exclusivamente com o anticorpo, minimizando interações não específicas entre o antígeno e a superfície do compósito ZnO/LIG, excluindo a possibilidade de o analito ser adsorvido por regiões do eléctrodo que não estejam funcionalizadas.

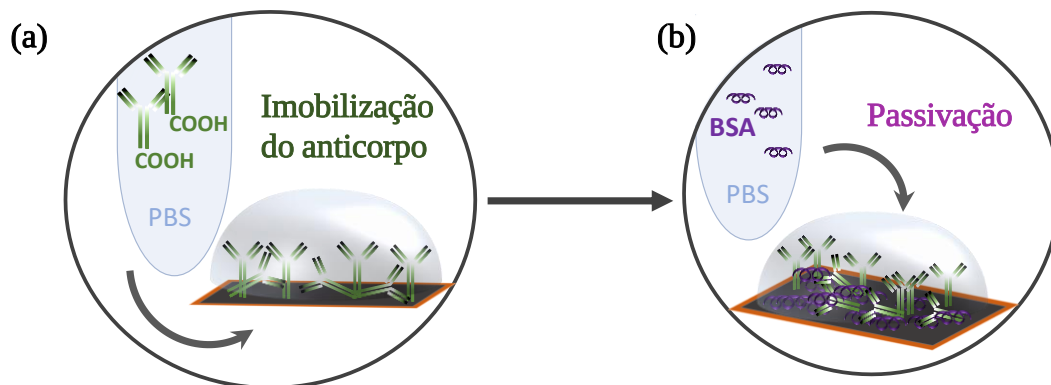


Figura 3.4: Esquema da funcionalização por absorção física onde (a) corresponde à aplicação do anticorpo na superfície do transdutor e (b) à sua passivação com BSA.

Assim, começou-se por adicionar uma gota com $20 \mu\text{l}$ de $0,025 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de anti-PSA (*Sigma-Aldrich*) (diluído em PBS), estando a gota em contacto com a superfície da amostra durante cerca de 2 horas. Também foram testados transdutores com 24 horas de incubação com anti-PSA. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com PBS e secas com um baixo fluxo de N_2 . Para a passivação, foram adicionados $20 \mu\text{l}$ de $0,010 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de albumina de soro bovino (BSA) à superfície da amostra previamente funcionalizada com anti-PSA, estando a gota em contacto com a amostra durante 30 minutos. Logo após a passivação foi realizado o mesmo procedimento de lavagem e secagem descrito anteriormente. As amostras foram mantidas no frigorífico (a cerca de $4 \text{ }^\circ\text{C}$) até à sua utilização nos testes de deteção.

3.3 Técnicas de caracterização

O desempenho do biossensor proposto nesse trabalho depende fortemente das propriedades do elemento transdutor, particularmente da sua morfologia, estrutura e propriedades óticas e eletroquímicas. Portanto, é de extrema importância caracterizar os compósitos de ZnO/LIG utilizando diferentes técnicas que permitam aceder a essa informação.

De forma a obter informação referente à sua morfologia, as amostras foram analisadas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Para as medidas de SEM utilizou-se um equipamento da TESCAN Vega3 SBH com um sistema de espectroscopia de raios-X por dispersão em energia (EDS, *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) acoplado ao microscópio. Desta forma, foi possível a análise da superfície dos compósitos através da obtenção de imagens com diferentes ampliações e ainda a identificação dos elementos químicos presentes.

A estrutura dos compósitos foi avaliada através de espectroscopia de Raman, as propriedades óticas por espectroscopia de fotoluminescência e as propriedades eletroquímica por voltamétrica cíclica e espectroscopia de impedância.

Para as amostras estudadas neste trabalho por espectroscopia de Raman utilizou-se um espectrómetro Horiba Jobin Yvon HR800, equipado com uma rede de difração de $600 \text{ linhas}\cdot\text{mm}^{-1}$, objetiva de $50\times$ e a linha 442 nm de um laser de He-Cd (*Kimmon IK Series*) como fonte de excitação. Cada aquisição foi registada na gama entre os 100 e 3500 cm^{-1} , à temperatura ambiente e com filtro de densidade neutra ND 0,6 (corte de 75% da intensidade inicial).

As medidas de fotoluminescência foram realizadas à temperatura ambiente sob excitação continua de um laser de He-Cd (*Kimmon IK Series*), com comprimento de onda 325 nm ($3,81 \text{ eV}$), com aproximadamente $0,6 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ de densidade de excitação. A luz foi depois direcionada através de um sistema de lentes para um espectrómetro SPEX 1704 (com distancia focal de 1 m e rede de difração de $1200 \text{ linhas}\cdot\text{mm}^{-1}$), acoplado a um fotomultiplicador Hamamatsu R928 com sistema de arrefecimento.

Todas as amostras foram medidas com as mesmas condições de excitação e detecção, além de que o sinal da intensidade da emissão foi maximizado em todas as medidas com intuito de obter o máximo de cada amostra antes e depois da funcionalização, bem como após a adição das diferentes concentrações de PSA. Para além da fotoluminescência, também foram realizadas medidas de fotoluminescência de excitação (PLE) num sistema Fluorolog®-3 da Horiba Scientific com uma lâmpada de Xe de 450 W como fonte de excitação. Os espectros de PLE apresentados foram adquiridos numa geometria *Front Face* e foram corrigidos pela resposta espectral da lâmpada, pela ótica do sistema e ao detetor. Para as medidas de PLE, o sistema utiliza dois monocromadores, um para a excitação (Gemini 180, 2×180 mm, 120 linhas.mm⁻¹) e outro para a emissão (iHR550, 1200 linha.mm⁻¹ e 550 mm). A técnica de PLE fornece informações complementares à técnica de PL, nomeadamente a localização energética dos estados eletrónicos excitados que contribuem para a emissão de um dado centro ótico e os mecanismos de excitação do mesmo. Numa medida de PLE, o monocromador de emissão está fixo num dos máximos de emissão que se pretende analisar, enquanto o monocromador de excitação percorre um intervalo de comprimentos de onda, geralmente inferiores (energias superiores) ao que está a ser monitorizado para a emissão. Deste modo, é possível detetar qual a energia preferencial dos eletrões que povoam os níveis eletrónicos que dão origem à emissão. Ao contrário da PLE, na PL, o monocromador de emissão percorre um intervalo de comprimentos de onda, geralmente superiores aos de excitação (energias inferiores), enquanto o monocromador de excitação está fixo num comprimento de onda definido. Assim, o espectro gerado pelo sistema exibe os valores da intensidade da luz que a amostra emite quando é excitada por um determinado comprimento de onda.

As medidas de voltametria cíclica (CV) e EIS foram realizadas numa estação eletroquímica Versastat3 (*Princeton Applied Research*), numa configuração de três elétrodos, onde o compósito de ZnO/LIG corresponde ao elétrodo de trabalho (como já mencionado), Ag/AgCl (1 M KCl) (*CH Instrument, Inc*) é o elétrodo de referência (RE) e o contra elétrodo (CE) é composto por um fio de platina (Pt). Os elétrodos foram mergulhados em 50 ml de uma solução eletrolítica composta por 10 mM de PBS e 1 mM de ferro/ferricianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆] e K₃[Fe(CN)₆], respetivamente). Na solução, o ferro/ferricianeto de potássio é dissolvido em iões de [Fe(CN)₆]⁴⁻ e [Fe(CN)₆]³⁻, respetivamente, que serão as espécies redox ativas. Antes de ser adicionado o ferro/ferricianeto de potássio, a solução eletrolítica foi submetida a um pré-tratamento que consistiu em borbulhar a solução com um fluxo de N₂ durante cerca de 30 minutos, à temperatura ambiente, para minimizar o oxigénio presente na solução. Para o CV utilizou-se um potencial DC de -0,2 a 0,6 V, com taxa de varrimento de 100 mV.s⁻¹ e sem agitação magnética. Para a caracterização por EIS a solução esteve sob constante agitação magnética (500 rpm), antes e durante as medidas, de forma a favorecer um meio homogéneo e estável para o sistema. Para além disso, o sistema foi submetido a pequenas perturbações AC de 5 mV, numa gama de 1 - 10⁴ Hz. Todos os ajustes foram realizados com o *software EIS Spectrum Analyser 1.0*[77].

De seguida, é feita uma breve exposição dos conceitos principais associados às diferentes técnicas mencionadas.

Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica que permite o estudo da morfologia e da topografia de materiais à micro e nano escala. O SEM baseia-se na incidência de um feixe de eletrões na superfície da amostra em estudo, e subsequente detecção dos sinais emitidos pelo alvo. Para isto, o feixe de eletrões é acelerado sob uma tensão entre 0,1 - 30 kV até atingir a região de interesse. A interação entre o feixe de eletrões e a superfície da amostra produz eletrões secundários (além de outros tipos de eletrões como os de Auger e retrodispersos) e raios-X característicos, como mostra a **Figura 3.5 (a)**. O mapeamento da intensidade dos eletrões secundários fornece informações sobre a morfologia da superfície da amostra, enquanto que os raios-X são utilizados em EDS para identificar a composição química de uma região

específica da amostra [78]. Na **Figura 3.5 (b)** está representada uma imagem de SEM de um elétron de LIG produzido pelo grupo de Tour *et al.* [53] a partir de um substrato de PI.

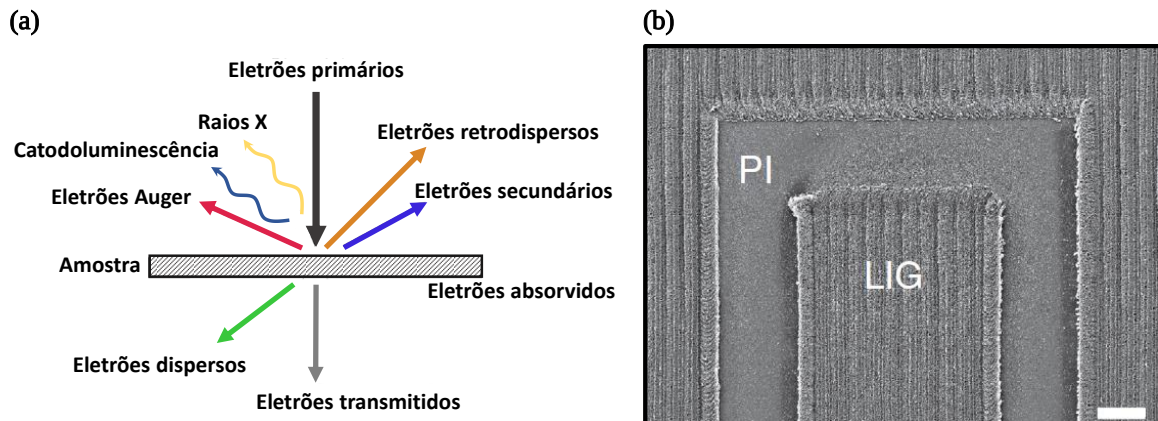


Figura 3.5: (a) Representação de alguns exemplos dos tipos de interações produzidas quando uma amostra é irradiada com um feixe de elétrons. Adaptado de [78]. (b) Imagem de SEM de um elétron de LIG produzido pelo grupo de Tour *et al.* a partir de um substrato de PI. Retirado de [53]. A barra presente na figura corresponde a uma escala de 20 μm .

Espectroscopia de Raman

A espectroscopia de Raman é uma técnica de caracterização ótica que permite obter informação estrutural dos materiais, e inferir sobre a sua composição, estrutura cristalina, orientação cristalográfica, estados de tensão na rede cristalina ou mesmo a presença de defeitos, no caso de materiais sólidos [79]. A espectroscopia de Raman corresponde a uma assinatura única da estrutura do material, como uma “impressão digital”, fornecendo informações importantes para a sua caracterização de uma forma não destrutiva.

De uma forma simples, esta técnica baseia-se na irradiação do material com radiação monocromática, tipicamente proveniente de uma fonte laser [80]. Desta interação, parte da radiação é refletida, absorvida, transmitida ou dispersa. Nesse último caso, dois fenômenos podem ocorrer: dispersão elástica ou inelástica. Na dispersão elástica, conhecida como dispersão de Rayleigh (na **Figura 3.6** está representada pela transição **(b)**), o material é excitado com um fóton de energia $\hbar\omega_i$ para um estado virtual (estado não estacionário do cristal), e, ao regressar ao estado fundamental inicial, é emitido um fóton com energia igual à de excitação. Já na dispersão inelástica, a frequência do fóton é alterada devido à sua interação com os fonões acústicos, dispersão de Brillouin, ou óticos, dispersão de Raman, que compõem a rede cristalina do material.

A dispersão de Raman está relacionada com as alterações do estado vibracional do cristal quando a interação. Quando o sistema se encontra no nível vibracional fundamental (m), o fóton incidente fornece energia $\hbar\omega_i$ à rede cristalina, promovendo a excitação de um elétron para um estado virtual de energia superior. Ao voltar ao estado eletrónico fundamental, o sistema pode ficar num nível vibracional de energia superior, resultando na emissão de um fóton com energia inferior à do fóton incidente, correspondendo essa diferença a uma vibração fundamental da rede, ou um fonão ($\hbar\omega_0$). Assim, o fóton é emitido com energia $\hbar\omega_s = \hbar\omega_i - \hbar\omega_0$. Este tipo de dispersão designa-se por Stokes, representada por **(c)** na **Figura 3.6**. No segundo processo, designado por anti-Stokes **(a)**, a transição tem origem num estado vibracional excitado (n), deixando o cristal num estado de menor energia vibracional, ou seja, a dispersão produz uma emissão com fótons mais energéticos ao regressar ao estado fundamental, com energia $\hbar\omega_s = \hbar\omega_i + \hbar\omega_0$. Esta última tem uma menor probabilidade de ocorrer, tendo por isso uma menor intensidade de sinal. Assim, é a dispersão de Stokes que mais frequentemente é monitorizada. Por fim,

em casos em que a excitação possibilita a transição para um estado eletrônico excitado do cristal, o processo denomina-se de Raman ressonante, (d) na Figura 3.6.

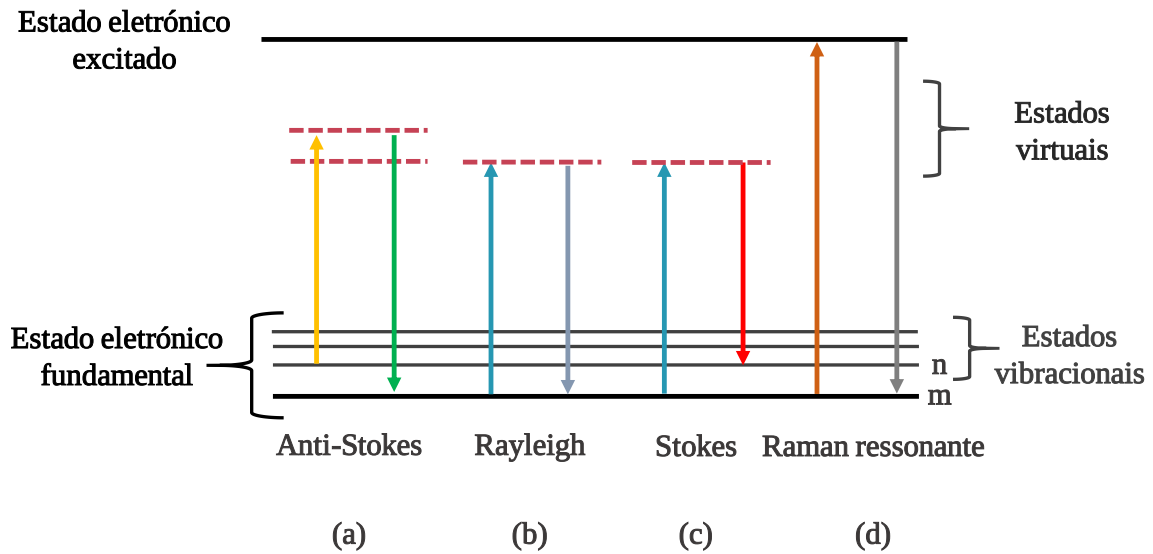


Figura 3.6: Diagrama esquemático dos processos de dispersão Rayleigh e Raman (anti-Stokes, Stokes e Raman ressonante), com m correspondendo ao estado vibracional de menor energia (fundamental) e n ao primeiro estado vibracional excitado. Adaptado de [79].

Fotoluminescência

A fotoluminescência é uma ferramenta extremamente útil na caracterização ótica de materiais, dos quais se destacam os semicondutores, como é o caso do ZnO. Essa é também uma técnica não destrutiva que pode fornecer informação sobre os diferentes tipos de defeitos ou impurezas existentes no material estudado (desde que opticamente ativos), avaliar processos de recombinação radiativa e não radiativa, processos de transferência de carga, entre outros [81].

Para compreender o fenômeno da fotoluminescência é importante introduzir o conceito de diagrama das coordenadas configuracionais, como está representado na Figura 3.7. Esse diagrama é uma alternativa para entender os processos assistidos por fonões que podem originar várias transições radiativas. Os princípios físicos que regem a fotoluminescência em estado estacionário têm a origem na excitação por meio da incidência de fótons, sendo a excitação com energia igual ou superior ao hiato energético do material estudado a mais frequentemente utilizada [82]. Isto faz com que os elétrons do estado fundamental da banda de valência sejam promovidos para níveis desocupados na banda de condução, deixando um buraco (ausência de elétron) na banda de valência (transição de **A** para **B** representa o processo da absorção). Após a excitação, o sistema rapidamente relaxa para um estado excitado de menor energia (condição **C**). Nesse processo, o elétron excitado perde parte da sua energia não radiativamente, nomeadamente na forma de fonões. Ao voltar ao estado fundamental (transição de **C** para **D**), o sistema emite fonões (recombinação radiativa) com uma energia inferior à do fóton absorvido. Caso esse decaimento não seja para o estado vibracional de menor energia, o elétron relaxa novamente, emitindo um fonão, para então alcançar a condição **A**. Durante a transição de **C** para **D**, o elétron recombina com o buraco deixado anteriormente, emitindo um fóton cuja energia depende da localização dos níveis de energias entre os quais se dá a recombinação. Essas etapas seguem o princípio de Franck-Condon, onde as transições eletrônicas ocorrem tão rapidamente que os núcleos dos átomos não se movem significativamente durante a transição (de acordo com a aproximação de Born Oppenheimer). Essa é a razão pela qual as transições óticas são representadas por setas verticais no diagrama de coordenadas configuracionais [82].

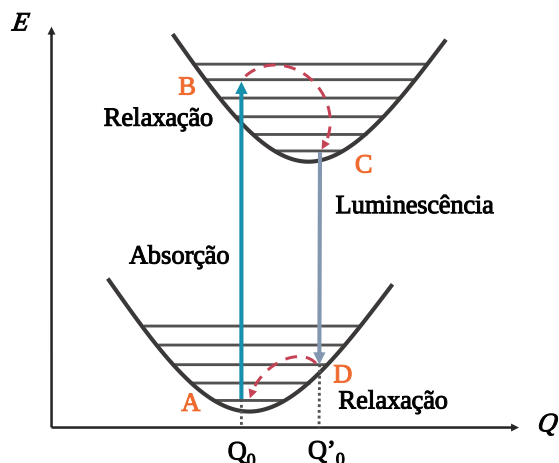


Figura 3.7: Diagrama de coordenada configuracional representando o estado fundamental e o primeiro estado eletrônico excitado para um centro ótico. Adaptado de [82].

Durante a excitação, os elétrons excitados e os buracos por eles deixados podem interagir entre si, criando pares elétron-buraco que se podem atrair mutuamente através da interação Coulomb. Esses pares são comumente designados de excitões (no caso dos semicondutores, são os excitões de Wannier-Mott [83]). Essas entidades podem ser comparadas a um pseudo-átomo de hidrogénio, modeladas pela teoria da massa efetiva reduzida (μ^*) e pela constante dielétrica do material (ϵ_r), criando níveis de energia discretos dentro do hiato do material [82]. Devido à analogia com o átomo de hidrogénio é possível expressar os níveis de energia do excitão (E_x) em função da constante de Rydberg (R_H) para o átomo de hidrogénio (13,6 eV)

$$E_x = -\frac{\mu^* R_H}{m_e \epsilon_r^2 n^2} \quad (\text{eq.3.1})$$

onde m_e é massa do elétron e n o número quântico principal que fornece a informação sobre o estado eletrônico do excitão. Deste modo, $n=1$ corresponde ao estado fundamental do excitão onde a energia associada é igual à energia de ligação do excitão, na ordem dos meV. O estado fundamental é o que apresenta a condição com maior energia de ligação, e, portanto, menor distância de ligação entre elétron-buraco. Para $n > 1$, o par tem uma ligação mais fraca e a distância entre elétron-buraco é maior.

O excitão pode mover-se livremente pelo cristal (excitão livre), sem qualquer transporte de carga, pois, neste caso, o elétron e o buraco deslocam-se em conjunto. Os níveis de energia dos FXs estão situados a energias inferiores ao mínimo da BC. Para os semicondutores de hiato direto, a energia do fóton emitido aquando a recombinação de um FX é expressa por

$$\hbar\omega = E_g - E_{xb} \quad (\text{eq.3.2})$$

onde E_g é a energia de hiato e E_{xb} a energia de ligação do excitão, que corresponde à energia necessária para o dissociar [81]. Para um semiconductor de hiato indireto, a energia do fóton envolvido na transição deve ser considerada e subtraída à expressão acima, para garantir a conservação do momento do cristal. Quando o semiconductor contém dadores ou aceitadores, os excitões sentem a presença do campo local e podem ser atraídos por essas impurezas ou defeitos por meio das interações de Coulomb ou Van der Waals [83]. Esse efeito de atração diminui a energia do excitão, quando ocorre a interação entre excitão e impurezas/defeitos específicos, e assim, formam-se os excitões ligados a defeitos/impurezas (BXs). Os BXs podem ser divididos em DX e AX, conforme o excitão se liga a um dador ou a um aceitador, respetivamente. A energia do fóton emitido na recombinação de um BX será

$$\hbar\omega = E_g - E_{xb} - E_{loc} \quad (\text{eq.3.3})$$

onde E_{loc} é a energia de localização do excitão no defeito/impureza [83].

A presença de dadores e aceitadores em simultâneo é frequente nos semicondutores. Nesse caso, diz-se que o semicondutor é compensado uma vez que, em condições de equilíbrio, elétrons dos dadores podem ser capturados pelos aceitadores. Então, dadores (D^+) e aceitadores (A^-) ionizados podem estar presentes. Quando os portadores são capturados por dadores/aceitadores, esses centros tornam-se neutros (D^0, A^0) [83]. Um elétron em um D^0 pode recombinar com um buraco em um A^0 , levando à recombinação de um par dador-aceitador (DAP). A emissão resultante da recombinação DAP tem energia

$$\hbar\omega = E_g - (E_A + E_D) + \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r} \quad (\text{eq.3.4})$$

onde E_A e E_D são as energias de ligação do aceitador e do dador, respetivamente. O último termo da equação 3.4 descreve a interação de Coulomb entre aceitador e dador, com r sendo a distância entre as duas entidades, e a carga do elétron e ϵ_0 a permissividade do vácuo [81]. Além das mencionadas anteriormente, podem ainda ser observadas as transições designadas por *two-electron satellite* (TES), que envolvem a recombinação radiativa de um DX, deixando o dador num estado excitado, fazendo com que a transição ocorra a uma energia inferior à do excitão ligado, sendo a diferença correspondente à diferença de energia entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental do dador [58].

Os diferentes processos de recombinação radiativa típicos num semicondutor (não fortemente dopado) estão representados na Figura 3.8. A recombinação ilustrada em (1) corresponde ao processo de recombinação banda-a-banda, em que um elétron na banda de condução se recombina diretamente com o buraco deixado na banda de valência. Nesse caso, os fótons emitidos terão uma energia próxima a E_g . No ZnO, esse tipo de transição é mais frequente para temperaturas acima da temperatura ambiente e particularmente acima de 60 meV (energia de ligação do FX). Em (2) está representada a recombinação de excitões livres, apresentando uma energia inferior à energia de hiato, sendo esta diferença correspondente à energia de ligação do excitão. Em (3) encontra-se esquematizada a recombinação do excitão ligado a impurezas. A recombinação representada em (4) ocorre entre um elétron livre e um buraco de um nível aceitador. O esquema (5) corresponde à recombinação DAP e, por último, o (6) ilustra a recombinação entre níveis de defeitos profundos, geralmente originados por impurezas ou defeitos intrínsecos (*e.g.*, lacunas, átomos intersticiais, etc) responsáveis por criar níveis de energia profundos no hiato do material [81].

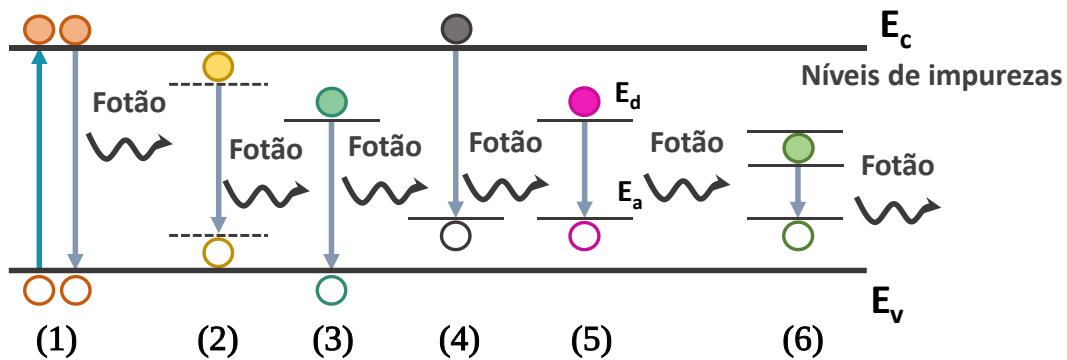


Figura 3.8: Esquema das diferentes recombinações radiativas que podem ocorrer no processo de fotoluminescência. Em (1) está representado a recombinação banda a banda, em (2) a recombinação de excitões livres, em (3) a recombinação do excitão ligado a impurezas, em (4) a recombinação entre elétron livre e um buraco de um nível aceitador, em (5) recombinação de um par dador-aceitador, e por fim, em (6) recombinação entre níveis de defeitos profundos. Adaptado de [81].

Para uma melhor compreensão e interpretação dos espectros de PL que serão mostrados nesse trabalho, a Figura 3.9 mostra um esquema representando a posição em energia dos diferentes tipos de recombinação mencionados acima para o caso do ZnO. É de notar que esta representação não é rigorosa. Além disso, apesar de por vezes se encontrar na literatura referência a transições atribuídas a excitões ligados a

aceitadores neutros (A^0X) no ZnO, não existem evidências experimentais conclusivas e reprodutíveis da sua presença. Essas foram incluídas no esquema apenas com o fim de ilustrar a posição em energia onde seria expectável que ocorressem e que são referidas na literatura.

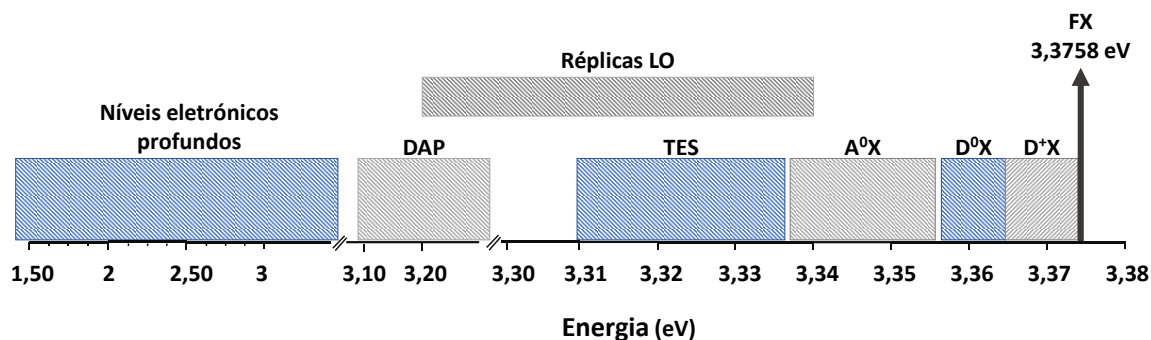


Figura 3.9: Representação esquemática das gamas de energia em que as várias transições do ZnO são geralmente observadas. Esquema adaptado da referência [57]. Na figura estão representados os excitões livres (FX), os excitões ligados a dadores neutros (D^0X), os excitões ligados a dadores ionizados (D^+X), os excitões ligados a aceitadores neutros (A^0X), a recombinação de pares dador-aceitador (DAP), as réplicas assistidas pelos fonões longitudinais óticos (LO), transições associadas a níveis eletrônicos profundos e ainda, *two-electron satellite* (TES). A representação de energias aqui esquematizada não é rigorosa e pretende apenas facilitar a interpretação dos espectros de PL apresentados no capítulo seguinte.

A temperatura tem uma influência importante em todos esses processos, uma vez que com o aumento desta são favorecidos processos térmicos não radiativos, podendo esses competir com os fenômenos radiativos. Assim, medidas a baixa temperatura (*e.g.*, 10 K) são vantajosas para uma análise fundamental das propriedades do material, já que a esta temperatura a rede é considerada estática e são minimizados os processos ativados termicamente. No entanto, devido a limitações de tempo e de ocupação do equipamento de medida, não foi possível realizar a análise a essas temperaturas. Além disso, uma vez que é pretendido que os sensores operem à temperatura ambiente, essa foi considerada a temperatura mais relevante para este trabalho.

Tendo em conta que no presente trabalho se pretendia desenvolver biossensores com transdução ótica baseados na fotoluminescência, esta técnica torna-se de elevada importância na caracterização das amostras em todos os passos de formação quer do transdutor, quer da camada de bioreconhecimento, bem como na fase de deteção do analito.

Voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

A caracterização eletroquímica dos compostos produzidos neste trabalho foi realizada por meio de ensaios de voltametria cíclica (CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), numa estação eletroquímica como mostra a **Figura 3.10 (a)**. Para as medidas eletroquímicas é necessário adicionar contactos elétricos aos transdutores, para assim poderem ser usados como elétrodo de trabalho, um dos principais elementos na célula eletroquímica. Deste modo, os contactos elétricos foram colocados usando um fio de cobre banhado a prata, fixado por uma camada de cola de prata, como mostra a **Figura 3.10 (b)**. Após fixar o contacto, os elétrodos foram submetidos a um tratamento térmico com temperaturas entre 70 e 80°C, durante 30 minutos, para garantir a adesão da camada de prata. Com o intuito de isolar a prata para que não esteja em contacto direto com a solução do eletrólito, minimizando a sua influência nas medidas, adicionou-se uma camada de verniz isolador (*Lacomit, Agar Scientific*) sobre essa região. A área geométrica (A_g) resultante correspondia a $3 \times 3 \text{ mm}^2$, sendo esse o local onde foi adicionada a camada de bioreconhecimento.

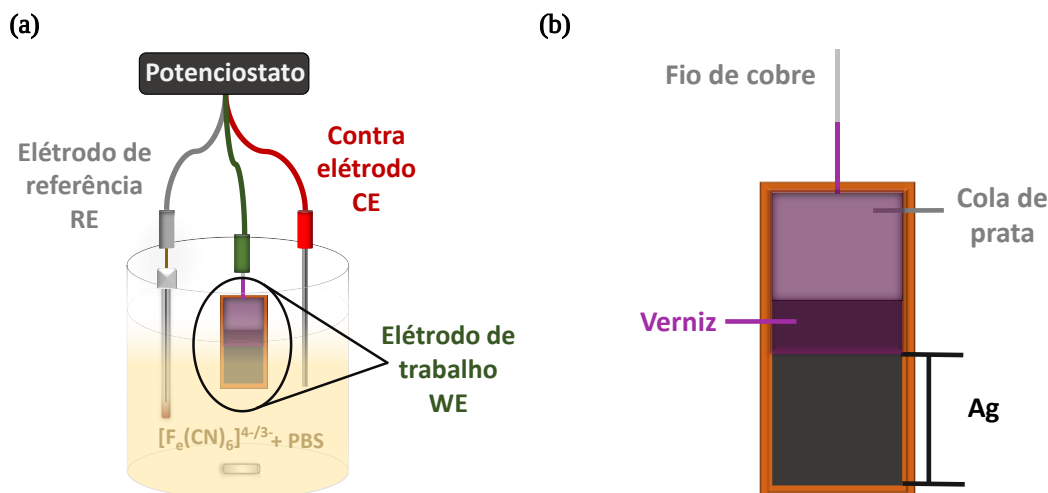


Figura 3.10: Em (a) está representada uma célula eletroquímica. A solução eletrolítica era composta por PBS e íons de $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. Em (b) estão ilustrados os principais elementos envolvidos na formação do eletrodo para as medidas eletroquímica. A área geométrica (A_g) tem dimensões $3 \times 3 \text{ mm}^2$.

A CV é o primeiro passo para verificar se os eletrodos são adequados para as medidas eletroquímicas e compreender que tipo de interações ocorrem entre o eletrodo de trabalho e a solução eletrolítica. Para as medidas de CV aplica-se uma tensão que varia com o tempo entre dois valores de potencial (V_1 e V_2). Quando a tensão atinge o valor de V_2 , o varrimento é invertido até se atingir o valor de V_1 . A taxa de varrimento é um fator importante, pois é necessário que o potencial varie num tempo suficiente para permitir que as reações na solução ocorram. Ao sistema é aplicada uma diferença de potencial entre o WE e o RE, enquanto que se mede a corrente elétrica entre o WE e o CE, obtendo um voltamograma. A partir do voltamograma avaliam-se os fenômenos eletroquímicos que ocorrem numa dada gama de potencial (*e.g.* reações redox), sendo um importante parâmetro para as medidas de EIS.

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica consiste em aplicar pequenas perturbações AC de caráter sinusoidal com baixa amplitude (2-10 mV), ρ , para uma dada gama de frequência, f , à célula eletroquímica, sob tensão DC constante (DC bias). A resposta do sistema será uma corrente, i , com comportamento sinusoidal, mas com uma diferença de fase, φ , em relação ao sinal aplicado, que se expressa em termos da impedância, Z , definida pela lei de Ohm [84]

$$Z(\omega) = \frac{\rho}{i} = \frac{E \sin(\omega t)}{I \sin(\omega t + \varphi)}, \omega = 2\pi f \quad (\text{eq.3.5})$$

Em que,

$$Z(\omega) = Z_{Re} - jZ_{Im} \quad (\text{eq.3.6})$$

A EIS pode ser dividida em dois processos: faradaico e não faradaico [85]. O processo faradaico tem origem na transferência de carga devido a reações redox que ocorrem na interface do eletrodo de trabalho em contacto com as espécies eletroativas da solução eletrolítica. Essas espécies eletroativas são alternadamente reduzidas e oxidadas pela transferência de um elétron de e para o eletrodo, segundo a reação: $Red \leftrightarrow Ox + ne^-$, onde *Red* e *Ox* representam os elementos reduzidos e oxidados de um dado par redox, respetivamente [84,85]. Relativamente à representação de Nyquist, quando o sistema se encontra no domínio das frequências mais elevadas, a impedância resulta da resistência da própria solução (resistência da solução, R_s , como esquematizado na **Figura 3.11 (a)**). Enquanto que para frequências intermédias, a impedância é dominada pela resistência ao fluxo de carga perto da interface do eletrodo de trabalho (resistência à transferência de carga, R_{ct}) [84]. A resistência à transferência de carga tem origem no potencial gerado pelo fenómeno de oxidação e redução, bem como no efeito repulsivo causado pelas espécies redox que interagem com a interface do eletrodo de trabalho [85]. Para frequências mais baixas (*e.g.* $\sim 1-0,1 \text{ Hz}$), a resposta eletroquímica tende a ser dominada pelos fenómenos de difusão de espécies

redox para a superfície do eletrodo. A representação de Nyquist terá a forma de um semicírculo devido ao processo de transferência de carga que ocorre no sistema. Na representação de Nyquist a parte imaginária da impedância (Z_{im}) é dada em função da sua parte real (Z_{re}).

Para a análise dos fenômenos que ocorrem à superfície do eletrodo de trabalho é frequentemente utilizado um circuito equivalente como modelo teórico, o circuito modificado de Randles, que tem em consideração as resistências já mencionadas, R_s e R_{ct} , o elemento de Warburg que descreve a difusão em regime semi-infinito de espécies eletroativas, Z_w , que está relacionado com a impedância de Warburg, Z_w . E ainda, em condições ideais, um condensador, C_{dl} , que modela a capacitância da dupla camada. Esse efeito surge quando um eletrodo é polarizado em relação à solução eletrolítica, ocorrendo a atração e a acumulação de íons de cargas opostas à sua superfície. A acumulação de íons cria uma camada próxima a interface do eletrodo de trabalho, como mostra a **Figura 3.11 (b)**, frequentemente denominada por dupla camada de Helmholtz [85]. Contudo, experimentalmente, a dupla camada de Helmholtz apresenta frequentemente um comportamento não ideal, sendo necessário substituir a C_{dl} por um elemento de fase constante (CPE), modelado por

$$Z_{CPE} = \frac{1}{P(j\omega)^\zeta} \quad (\text{eq.3.7})$$

onde P é um fator pré-exponencial e ζ corresponde a uma constante relacionada com a fase do elemento, podendo assumir valores entre 0 e 1 (para valor igual a 1 corresponde a um condensador ideal e 0 a uma resistência pura). Nesse trabalho, é de interesse o processo faradaico que ocorre na superfície do WE, bem como a resistência à transferência de carga.

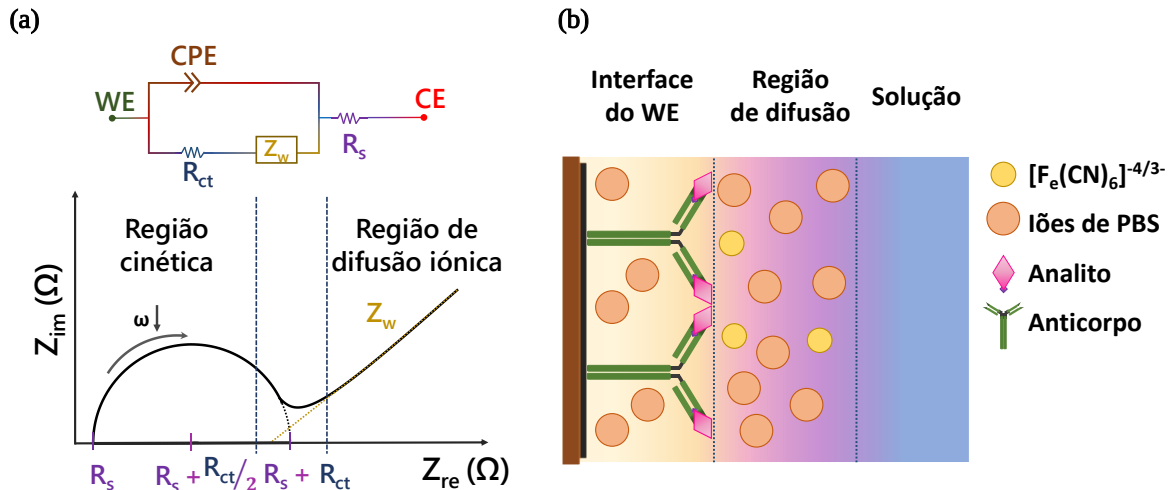


Figura 3.11: (a) Representação de Nyquist para um biossensor impedimétrico faradaico, com o respectivo circuito equivalente, adaptado de [85]. (b) Ilustração da região da interface do eletrodo que interage com a solução eletrolítica, e os elementos que participam do sistema eletroquímico. Adaptado de [86].

Já no caso do processo não faradaico, o comportamento capacitivo prevalece sobre a transferência de carga no eletrodo de trabalho. Assim, a corrente terá origem de processos semelhantes ao de carregar um condensador.

3.4 Teste como biossensor ótico e eletroquímico

Após a funcionalização, os transdutores estão prontos para o contacto com as diferentes concentrações dos antígenos, de forma a comprovar a sua adequação para serem utilizados como biossensores. Primeiramente foram testados os transdutores óticos através de análise por fotoluminescência. Para isso, foram testadas oito concentrações de PSA (*Sigma-Aldrich*: 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 e 100 ng.ml⁻¹). Os testes foram realizados em sensores processados e funcionalizados nas mesmas condições (com anti-PSA

e passivados com BSA). Além dos sensores, foram ainda preparadas amostras de controle. Para isso, foi produzido um transdutor contendo apenas a passivação com BSA. O procedimento para incubação do analito foi o mesmo reportado no caso das amostras funcionalizadas. Essa amostra serviu para avaliar se a variação de sinal obtida nos testes era proveniente exclusivamente da interação anticorpo-antígeno ou se existiriam fatores adicionais a contribuir para esta variação, nomeadamente interações não específicas entre o antígeno e a superfície do composto ZnO/LIG. Antes de adicionar as diferentes concentrações, foram adquiridos espectros de fotoluminescência das amostras sem qualquer analito, de forma a servir como referência e avaliar a influência da incubação com as diferentes concentrações de PSA na forma espectral e na intensidade do sinal. A etapa seguinte foi a incubação do PSA, tanto nos sensores, como nos controles. Para tal, foi aplicada uma gota com 20 μl da primeira concentração ($0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) em cada amostra, tendo sido deixada a reagir durante 20 minutos. De seguida, as amostras foram lavadas com PBS e secas ao ar livre antes da aquisição do espectro. O procedimento foi igual para as restantes concentrações de analito. As curvas da resposta do biossensor foram traçadas tendo em conta a variação do sinal de PL (nesse caso a intensidade) em função das diferentes concentrações de analito presente, normalizadas à intensidade da referência.

Para os ensaios eletroquímicos foram obtidos CV dos sensores e controles antes de se iniciar a incubação do antígeno, seguidos da aquisição de espectros de impedância. As medidas de EIS foram feitas para todas as concentrações de PSA mencionadas acima. O primeiro passo foi adquirir espectros de impedância para servir de referência. De seguida, foi adicionada uma gota de 30 μl da concentração de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ em cada sensor e controle, com tempo de incubação de 20 minutos (tal como no caso da PL). Após esse período, as amostras foram lavadas com PBS e colocadas na célula eletroquímica. Para a EIS também foram traçadas as curvas da resposta do biossensor, mas nesse caso monitorizou-se a variação do sinal de resistência à transferência de carga em função das diferentes concentrações de analito presente, normalizadas à resistência à transferência de carga das amostras de referência.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização dos compósitos ZnO/LIG

A primeira etapa essencial desse trabalho corresponde à caracterização morfológica, estrutural, ótica e eletroquímica dos compósitos de ZnO/LIG, uma vez que foi com base nessa informação que foi possível determinar os melhores parâmetros de processamento a laser e o precursor mais adequado para a produção de materiais com características consideradas adequadas para funcionarem como elemento transdutor do biossensor proposto nesse trabalho. Importa ainda referir que os vários tipos de caracterização foram sendo realizados em paralelo e de uma forma iterativa, de modo a fazer progressivamente um ajuste mais fino dos parâmetros de processamento. No entanto, as análises através de espectroscopia de Raman e PL foram privilegiadas, já que o principal objetivo era produzir elementos transdutores que possuíssem ambos os materiais e que evidenciassem boas propriedades de luminescência. Tal como mencionado no capítulo anterior, para compreender a influência dos parâmetros de processamento a laser e dos precursores utilizados (Zn e ZnO) foram produzidas diferentes amostras. Através da análise de SEM foi possível comparar o tamanho, a forma e a distribuição das partículas de ZnO produzidas, além de examinar a superfície do LIG relativamente à sua porosidade e formação/quantidade de fibra de carbono. As imagens de SEM das amostras dos compósitos cujas características se revelaram mais interessantes são apresentadas nas **Figura 4.1 (a) a (f)**.

Na **Figura 4.1 (a-b-c)** estão representadas as imagens de SEM para as amostras #1, #2 e #3, respetivamente, produzidas a partir do precursor de Zn, sem tratamento térmico antes do processamento a laser. Nessas amostras variou-se somente a potência do laser (amostra #1: $P=20,1$ W, amostra #2: $P=23$ W, amostra #3: $P=24,6$ W) com intuito de determinar a potência necessária para produzir tanto ZnO como LIG, mantendo uma fina camada de Kapton® como substrato flexível. A amostra #1 exibe uma estrutura de LIG semelhante a uma espuma de grafeno 3D. O LIG formado nessa amostra exibe poros com diferentes formas e diâmetros (na gama dos micrómetros), bem distribuídos por toda a área processada pelo laser e de uma forma aleatória. Como já descrito anteriormente, esses poros são formados pela libertação dos gases resultantes da degradação da PI devido ao efeito fototérmico. Também é observada a formação de aglomerados de partículas de ZnO (com dimensão na gama dos micrómetros). Pela imagem de EDS apresentada na **Figura 4.1 (a)** verifica-se que as principais espécies químicas presentes nesses aglomerados são oxigénio e zinco, sugerindo a formação de partículas de ZnO. A confirmação da presença de ZnO foi depois conseguida através da análise de espectroscopia de Raman, tal como se pode observar nos espectros da **Figura 4.2 (b)**.

Verificou-se que formação de LIG era possível utilizando potências de saída a partir de 5 W (com $v=350$ mm.s⁻¹) em amostras compostas apenas por Kapton®, como relatado num trabalho preliminar sobre esse tipo de compósitos [87] e mesmo por outros autores [53,70]. Contudo, no caso dos compósitos observou-se que eram necessárias potências mais elevadas para a sua formação (a partir de ~18 W), pois a energia fornecida aos precursores com a aplicação dessa potência não era suficiente para promover a formação de LIG e das partículas de ZnO de forma simultânea. Com o aumento da potência de saída, testada nas amostras #2 e #3, o LIG parece apresentar uma porosidade menos evidente, em que os poros são menores e menos profundos, em comparação com a amostra #1, além de estarem mais espaçados uns dos outros. Também se observa a redução da quantidade de partículas de ZnO formadas. Esses resultados poderão advir de uma maior libertação de gases durante o processamento devido ao uso de potências mais elevadas, que pode influenciar na distribuição das partículas de ZnO pela superfície do LIG. Como mencionado pelo grupo de Luo *et al.* [70] o efeito de “*bombing*” que ocorre para potências mais elevadas pode contribuir para a expulsão das partículas de ZnO da superfície do LIG após a sua formação. Isto pode ser explicado pela presença da camada precursora que absorve/dissipa os fótons proveniente do laser e/ou pela reflexão parcial dos mesmos pelas partículas de Zn no precursor (apenas no caso do precursor

baseado em Zn metálico). Esses efeitos contribuem para a redução da temperatura local no polímero, desfavorecendo a formação dos compósitos. Além disso, a camada precursora pode absorver/reter parte dos gases produzidos, o que poderá causar mudanças locais na superfície do LIG, contribuindo para diferentes morfologias e topografias observadas ao longo da amostra.

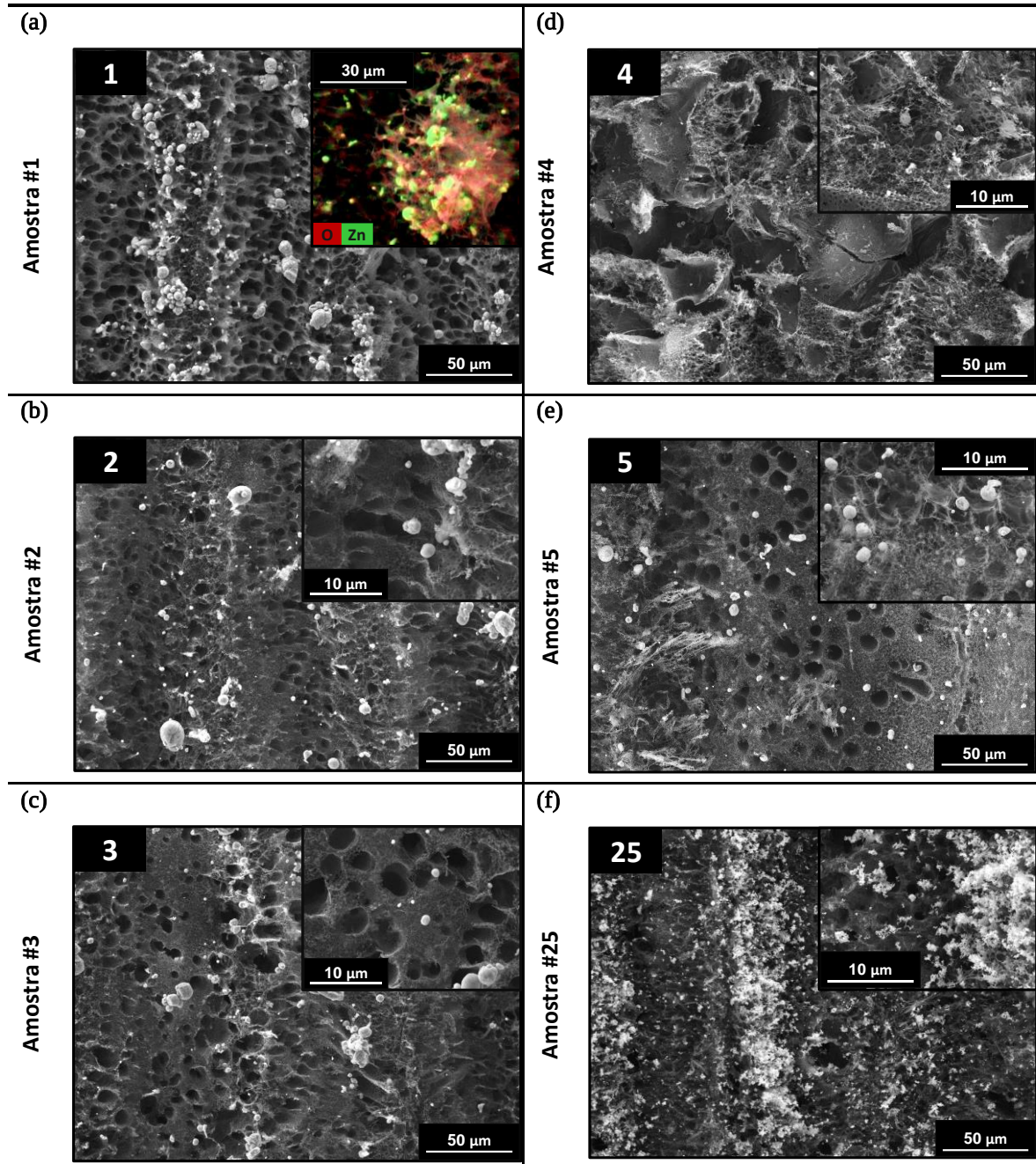


Figura 4.1: Imagens de SEM das superfícies das amostras (a) #1, com $v=200\text{ mm.s}^{-1}$, $P=20,1\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{laser}=2\text{ cm}$ e o mapa de EDS para uma região que continha um aglomerado de partículas de ZnO; (b) #2, com $v=200\text{ mm.s}^{-1}$, $P=23\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{laser}=2\text{ cm}$; (c) #3, com $v=200\text{ mm.s}^{-1}$, $P=24,6\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{laser}=2\text{ cm}$; (d) #4, com $v=150\text{ mm.s}^{-1}$, $P=21,2\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{laser}=2,1\text{ cm}$; (e) #5, com $v=150\text{ mm.s}^{-1}$, $P=22,1\text{ W}$, $d=0,2\text{ mm}$, $h_{laser}=2,1\text{ cm}$ e (f) #25, com $v=200\text{ mm.s}^{-1}$, $P=21\text{ W}$, $d=0,1\text{ mm}$, $h_{laser}=2,1\text{ cm}$. O precursor com Zn foi utilizado nas amostras de #1 a #5, e o precursor com ZnO na amostra #25.

Apesar das imagens de SEM e do mapa de EDS indicarem a presença de ZnO nas amostras #1, #2 e #3, os compósitos formados com essas condições de crescimento não exibiam emissão de luz quando excitados por um laser de 325 nm (3,81 eV), mostrando a inadequação destes compósitos para serem aplicados num biossensor ótico com transdução baseada em PL. Uma das razões poderá ser o facto das amostras apresentarem quantidades reduzidas de ZnO na superfície do LIG e/ou a dispersão da luz causada pelas fibras de carbono que se formam nessas condições.

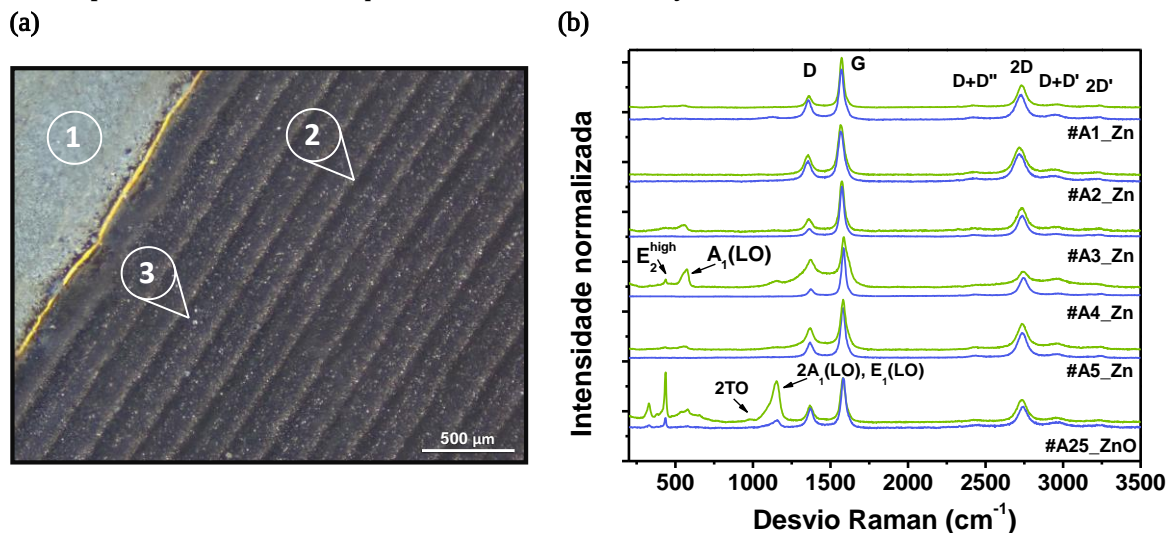


Figura 4.2: (a) Imagem de microscopia ótica de uma amostra representativa das que foram analisadas por espectroscopia de Raman: (1) região contendo a pasta precursora de ZnO, (2) regiões dominadas pelo LIG (região escura), (3) regiões mais claras correspondendo a áreas que contém maior quantidade de ZnO. (b) Espectros de Raman obtidos para amostras selecionadas. A linha azul corresponde a espectros adquiridos nas regiões dominadas pelo LIG (região escura), enquanto a linha verde diz respeito ao sinal adquirido em regiões mais claras, correspondendo a áreas que contém maior quantidade de ZnO. As amostras #1 a #5 foram produzidas com o precursor com Zn e a amostra #25 foi produzida a partir do precursor contendo ZnO.

Na tentativa de produzir compósitos de ZnO/LIG com propriedades luminescentes adequadas, outros parâmetros de processamento foram testados, desta vez utilizando o precursor com Zn e efetuando um tratamento térmico para melhorar a uniformização da sua secagem e distribuição no polímero, tal como mencionado no capítulo anterior. Na **Figura 4.1 (d)** está representada a imagem de SEM da amostra #4. Para a produção dessa amostra optou-se por adicionar duas camadas precursoras de Zn, com o propósito de tentar aumentar a quantidade de ZnO produzido. Além disso, os parâmetros de processamento foram escolhidos com intuito de aumentar a exposição da camada precursora ao feixe de laser. Assim, a velocidade de varrimento foi reduzida ($v=150 \text{ mm.s}^{-1}$). Contudo, o resultado não foi considerado satisfatório, pois a superfície do LIG formada não apresentava os poros característicos observados anteriormente, mas sim uma espécie de emaranhado de fibras de carbono. Pequenas partículas esféricas de ZnO formaram-se e espalharam-se ao longo da estrutura. Apesar disso, a amostra #4 foi uma das primeiras amostras a exibir sinal de luminescência mensurável, tal como está apresentado na **Figura 4.3 (a)**.

Um outro parâmetro testado na produção desses compósitos foi a distância entre a cabeça do laser e a superfície dos precursores (h_{laser}). Um exemplo desses testes está representado na **Figura 4.1 (e)**. A amostra #5 foi então produzida com $h_{laser}=2,1 \text{ cm}$ e apenas uma camada do precursor com Zn, usando a combinação dos parâmetros testados anteriormente, $v=200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P=21 \text{ W}$ e $d=0,1 \text{ mm}$. A estrutura do LIG formada apresentava os poros característicos observados nas outras amostras e também algumas fibras de carbono, porém em menor quantidade. Aumentando a distância entre a cabeça do laser e a camada precursora para valores superiores à distância de foco ($\sim 1,8 \text{ cm}$), isto é, trabalhando em condições

desfocadas, pode contribuir para a redução das fibras de carbono e para uma superfície mais uniforme [52]. Nessas condições, o feixe ao incidir na camada atinge uma área maior do que em condições de foco, permitindo uma distribuição de energia mais homogênea.

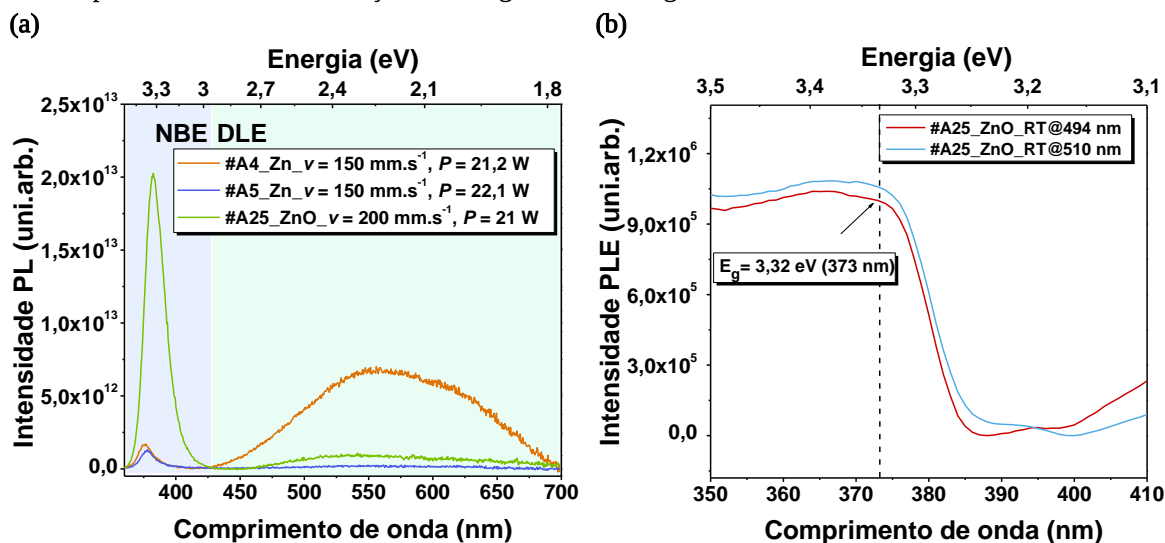


Figura 4.3: (a) Espectros PL obtidos à temperatura ambiente, sob excitação com a linha 325 nm de um laser de He-Cd, para as amostras #4, #5, #25. (b) Espectros de PLE obtidos para a amostra #25 e monitorizados em dois comprimentos de onda diferentes, ambos na região da banda visível observada no espectro de PL da amostra correspondente.

Tal como anteriormente, também se observa a formação de partículas esféricas de ZnO na superfície do LIG, mas em maior quantidade e tamanho quando comparadas com a amostra #4. Contudo, as propriedades de luminescência destas partículas de ZnO são ainda inferiores às consideradas necessárias para as aplicações em biossensores óticos, nomeadamente no que diz respeito à intensidade do sinal (ver **Figura 4.3 (a)**).

Devido a dificuldades em obter uma superfície porosa, sem fibras de carbono, com quantidade de ZnO elevada, onde as partículas estivessem distribuídas de forma homogênea por toda a amostra e com propriedades luminescentes adequadas, uma outra abordagem foi testada, utilizando como precursor pós de ZnO comerciais. Um exemplo dos compósitos formados nessas novas condições pode ser visto na **Figura 4.1 (f)**, correspondendo à amostra #25 (ver **Tabela 3**). É importante mencionar que, também nesse caso, foram testados vários parâmetros de processamento, tal como demonstrado no capítulo anterior. Observou-se que, nesse caso, a estrutura produzida exibia também a presença do LIG, e que as partículas de ZnO se encontravam em maior quantidade, mostrando uma tendência para se acumularem nas regiões de maior relevo do LIG, possivelmente associado ao efeito de ‘*bombing*’ mencionado anteriormente. Essas partículas possuem menores dimensões que as produzidas com o precursor com Zn e exibem uma forma que se assemelhava a microfiores, muito distintas das partículas esféricas observadas nas amostras anteriores. A presença de ZnO cristalino pode ser confirmada nos espectros de Raman (**Figura 4.2 (b)**), onde é possível identificar os modos vibracionais característicos da estrutura wurtzite deste material. As propriedades de luminescência desses compósitos eram superiores a qualquer outro produzido neste trabalho (ver **Figura 4.3 (a)**), indicando que os parâmetros de processamento utilizados na amostra #25 são os mais adequados para prosseguir com a produção do elemento transdutor que se pretende testar. Réplicas da amostra #25 foram produzidas com o intuito de comprovar a sua reprodutibilidade, realizar a caracterização eletroquímica e os testes como biossensor.

Os espectros de Raman obtidos para amostras selecionadas estão representados na **Figura 4.2 (b)**, onde para cada amostra foram adquiridos espectros em diferentes regiões da superfície, de forma a avaliar a homogeneidade dos compósitos ZnO/LIG, especificamente em relação à distribuição de ZnO sobre o

LIG, bem como a qualidade estrutural de ambos os componentes. Na **Figura 4.2 (a)** estão representadas as diferentes regiões onde foram adquiridos os espectros de Raman, onde **(1)** corresponde à região da camada precursora que não foi processada, **(2)** à região dominada pelo LIG (região escura) e **(3)** à região com ZnO (região clara). Através da identificação dessas zonas foi possível confirmar a distribuição aleatória do ZnO, tal como observado através de SEM. Espectros adquiridos nas zonas com maior quantidade de ZnO revelaram a presença dos modos vibracionais ativos em Raman típicos da estrutura wurtzite (A_1 , E_1 e E_2), além dos seus modos combinados e sobretoms. Estes modos estão situados na região de menores números de onda, entre 100 e 1250 cm^{-1} . Nas regiões dominadas pelo LIG (região escura e porosa observada com o microscópio ótico) são identificados essencialmente os modos vibracionais tipicamente associados às ligações sp^2 do carbono, semelhantes aos modos observados em amostras de rGO, presentes na região entre 1300 e 3500 cm^{-1} .

No caso do LIG existem três modos principais, correspondendo a bandas comumente designadas por G, D e 2D. A banda G encontra-se tipicamente a $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$, sendo originada pela dispersão de primeira ordem relacionada com o estiramento das ligações sp^2 de C-C (modo duplamente degenerado, E_{2g}). O modo observado para menores números de onda corresponde à banda D, estando esta situada aproximadamente a 1350 cm^{-1} . Essa banda tem origem em processos ressoantes de um fonão do modo de respiração radial (*breathing mode*) de anéis aromáticos. A banda D está associada aos defeitos na estrutura da rede de átomos do material, sendo que em espectros de grafeno puro, essa banda não deverá ser visível. A razão entre as intensidades das bandas D e G (I_D/I_G) fornece informação relativa à densidade de defeitos nos materiais de carbono, sendo uma informação essencial para avaliar a qualidade do LIG aqui produzido. A banda D possui um sobretom situado a $\sim 2700 \text{ cm}^{-1}$, que se denomina banda 2D. Esta banda tem a sua origem na dispersão de segunda ordem, onde a conservação do momento é satisfeita através de dois fonões com vetores opostos (momento simétrico) [48]. No espectro típico do grafeno de uma única camada, uma das principais bandas é a 2D, podendo ainda fornecer informações acerca do número de camadas que o material possui, bem como a forma como estão empilhadas. Através da razão entre as intensidades das bandas 2D e G (I_{2D}/I_G) é possível extrair essas informações para as amostras de grafeno até cinco camadas [88]. Os espectros para o grafeno com uma única camada têm a banda 2D mais estreita e intensa que os restantes modos. Com o aumento do número de camadas, a banda 2D torna-se mais larga e a sua intensidade é reduzida. A interação entre as camadas causa um desdobramento nas bandas eletrônicas, e conseqüentemente, conduz a uma variação do sinal da banda 2D. Contudo, no presente trabalho, uma vez que o material produzido corresponde a uma espuma de grafeno em que as suas camadas não se encontram com uma orientação ordenada, esta informação não pode ser extraída. Outras bandas menos intensas também são características do grafeno, como a banda D', 2D', D+D'' e D+D' [48]. Tal como a banda D, a banda D' também está associada aos defeitos presente na rede do material. A banda D' é encontrada aproximadamente a $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ e o seu sobretom, 2D', em $\sim 3250 \text{ cm}^{-1}$. Além da banda D e D', a banda D+D'' e a combinação das bandas D e D', D+D', também são originadas devido à presença de defeitos. As bandas D+D'' e D+D' estão situadas a $\sim 2450 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 2950 \text{ cm}^{-1}$, respetivamente [48,88]. Ao analisar os espectros de Raman observou-se que as principais bandas associadas ao LIG estão presentes tanto nas regiões **(2)** como **(3)** em todas as amostras estudadas, enquanto que os modos vibracionais característicos do ZnO estavam presentes apenas nas regiões **(2)**. A presença das bandas do LIG e dos modos vibracionais do ZnO comprovam a formação dos compósitos de ZnO/LIG. Comparando as bandas do LIG presentes nos espectros para ambas regiões, a banda G é mais intensa e estreita do que as restantes, indicando a boa qualidade do LIG produzido. Os valores da razão I_D/I_G estão entre $\sim 0,30$ e $0,53$, como está representado na **Tabela 4**. De um modo geral, quanto maior for o valor dessa razão, maior será a densidade de defeitos presentes no LIG. Esses defeitos podem ser originados, por exemplo, por grupos funcionais na sua superfície, promovidos pela presença dos gases resultantes da degradação da PI, bem como da pasta precursora do ZnO, ou mesmo devido à presença de arestas nas folhas de grafeno. A existência de defeitos associados à presença de oxigénio deverá também

ser tida em conta, uma vez que o processamento é feito ao ar. Já a razão I_{2D}/I_G apresenta valores entre $\sim 0,38$ e $0,55$, onde $I_{2D} < I_G$ para todos os casos, o que indica a formação de um grafeno com múltiplas camadas.

Tabela 4: Valores obtidos para as razões I_D/I_G e I_{2D}/I_G para os espectros adquiridos e representados na **Figura 4.2 (b)**.

	#1	#2	#3	#4	#5	#25
I_D/I_G	0,30	0,40	0,35	0,33	0,37	0,53
I_{2D}/I_G	0,47	0,55	0,52	0,38	0,50	0,47

Relativamente à presença de ZnO, a maioria das amostras produzidas com o precursor com Zn não apresentavam os modos vibracionais associados a este semicondutor, como é, por exemplo, o caso das amostras #1, #2 e #5. Para a amostra #3, observou-se a presença de uma pequena banda entre ~ 300 e os 600 cm^{-1} , o que corresponde à zona onde são esperados os modos vibracionais associados ao ZnO. No entanto, a sua forma e a largura indicam que o ZnO produzido será amorfo e/ou que possui uma elevada densidade de defeitos. Já na amostra #4, os modos E_2^{high} ($\sim 439 \text{ cm}^{-1}$), $A_1(\text{LO})$ ($\sim 573 \text{ cm}^{-1}$) e $2A_1(\text{LO})$, $E_1(\text{LO})$ ($\sim 1142 \text{ cm}^{-1}$) podem ser identificados. Também aqui, a intensidade reduzida do modo E_2^{high} , bem como a largura do modo $A_1(\text{LO})$ parecem indicar a presença de uma elevada densidade de defeitos ou mesmo de um óxido de zinco não estequiométrico, resultante do processo de oxidação dos pós de Zn. Por sua vez, a amostra #25 exibe modos mais estreitos e bem definidos, nomeadamente $E_2^{high} - E_2^{low}$ ($\sim 327 \text{ cm}^{-1}$), E_2^{high} ($\sim 438 \text{ cm}^{-1}$), $A_1(\text{LO})$ ($\sim 541 \text{ cm}^{-1}$), $2A_1(\text{LO})$, $E_1(\text{LO})$ ($\sim 1155 \text{ cm}^{-1}$), entre outros com menor intensidade. Nesse caso, esses resultados sugerem que o ZnO formado tem uma qualidade cristalina superior à apresentada nas amostras anteriores. Deste modo, verificou-se que os parâmetros de processamento e a pasta precursora de ZnO utilizados na amostra #25 são capazes de produzir os compósitos de ZnO/LIG com melhores propriedades estruturais. É ainda importante referir, que o facto de não ter sido possível observar os modos vibracionais do ZnO nas restantes amostras, não significa que esse não esteja presente, apenas não foi possível identificá-lo nas zonas das amostras analisadas. De facto, no caso da amostra #5, apensar de não ter sido possível registar os modos deste semicondutor, esta apresentava a luminescência característica do ZnO, com uma intensidade e forma espectral da NBE muito semelhante à identificada para a amostra #4, ainda que a intensidade da banda visível seja bastante reduzida.

As amostras analisadas foram caracterizadas através da técnica de PL à temperatura ambiente sob excitação com um feixe laser de 325 nm ($3,81 \text{ eV}$), o que corresponde uma energia acima do hiato energético do ZnO, promovendo assim excitação banda-a-banda do material. Contudo, apenas algumas das amostras aqui produzidas apresentaram emissão de luz detetável. Por exemplo, as amostras #1, #2, e #3 não exibiram qualquer emissão de luz mensurável. Apenas as amostras produzidas com os parâmetros de processamento da #4, #5 e #25 permitiram a observação de sinal de PL. Essas amostras exibiam um espectro com essencialmente duas bandas: uma estreita na região do UV, correspondente à emissão NBE, e outra larga na região do visível, associada à emissão DLE, como mostra a **Figura 4.3 (a)**. (rever o esquema da **Figura 3.9** para identificação dos tipos de recombinação radiativa e a sua respetiva posição em energia). É visível que tanto a intensidade, como a forma espectral, destes centros óticos variam com as condições de processamento (precursor e parâmetros do laser), evidenciando assim a importância destes nas propriedades óticas dos compósitos.

A banda da região do visível tem uma gama espectral larga, que engloba o verde, amarelo e laranja-vermelho. A emissão mais comum relacionada com a presença de defeitos profundos no ZnO encontra-se entre $2,5\text{-}2,3 \text{ eV}$ ($495\text{-}540 \text{ nm}$), correspondendo a emissão na gama do verde (GL). Vários defeitos têm sido associados a essa banda, nomeadamente as lacunas de oxigénio/zinco (V_o/V_{Zn}), átomos de Zn

intersticial, transições de Zn intersticial para as lacunas de Zn, e também defeitos extrínsecos, nomeadamente associados à presença de iões de Cu (no caso da banda estruturada que se observa a baixa temperatura) [89]. Além disso, outros tipos de defeitos podem contribuir para a luminescência dessa região, como é o caso dos defeitos de superfície [90]. De facto, no caso de nano estruturas com uma elevada razão superfície/volume, a associação da GL com a presença desse tipo de defeitos parece ser uma das hipóteses mais aceites [56,91,92]. Ainda que menos frequentes, têm também sido reportadas bandas com emissão na região espectral do amarelo (YL), a $\sim 2,1$ eV (590 nm), e laranja-vermelho, a $\sim 1,93$ - $1,8$ eV (640-680 nm RL). No primeiro caso, uma das suas possíveis origens poderá estar relacionada com a existência de espécies químicas na superfície do ZnO, nomeadamente grupos OH, bem como alguns defeitos intrínsecos. Já no caso da RL, a sua origem é tipicamente atribuída a defeitos relacionados com excesso de oxigénio, particularmente a defeitos intersticiais [90,93]. A emissão para ambas as bandas tem sido associada a transições envolvendo níveis profundos semelhantes, porém com estados iniciais diferentes [90]. As posições dos máximos das bandas observadas para as amostras em estudo estão situadas em torno de 533-555 nm ($\sim 2,32$ - $2,23$ eV), indicando que a emissão predominantemente corresponde à GL. No entanto, a forma da banda e a sua largura indicam uma sobreposição de vários centros óticos. A amostra #4 exhibe uma banda no visível mais larga e intensa do que as amostras #5 e #25. Isso indica que os compósitos formados nestas condições possuem uma quantidade de defeitos profundos mais elevada. Contudo, para as amostras processadas com o precursor de ZnO, nomeadamente a amostra #25, a NBE tornou-se a emissão dominante, apresentando uma banda no visível pouca intensa.

Em relação à emissão correspondente à NBE, as posições dos máximos das bandas exibiam um pequeno desvio entre as diferentes amostras. Para as amostras #4 e #5 a posição do máximo de intensidade encontrava-se aproximadamente a 377 nm (3,29 eV), enquanto que para a amostra #25 o valor era de 382 nm (3,24 eV). À temperatura ambiente, a emissão dessas bandas tem origem na sobreposição de diferentes mecanismos de recombinação, nomeadamente o excitão livre, uma vez que a sua energia de ligação (60 meV) é superior a energia térmica a essa temperatura (~ 25 meV), a defeitos de superfície (a linha em 3,31 eV observada a 14 K [62,63,94]) e outros defeitos que possam criar defeitos na amostra com recombinação radiativa nessa região. A diferença na posição do máximo desta emissão entre as diferentes amostras pode dever-se a diferenças nas contribuições de cada uma destas recombinações para a emissão resultante. Uma forma de avaliar essa hipótese seria através de medidas de PL a baixa temperatura (*e.g.*, 10 K), uma vez que a essa temperatura poderia ser possível identificar e distinguir quais as transições presentes nas amostras.

Na literatura existem alguns trabalhos [94] que reportam o aumento da intensidade relativa das transições radiativas associadas a estados de superfície presentes nessa região espectral (3,31 eV) devido à presença de estruturas de carbono, nomeadamente CNTs. Esse facto foi atribuído a um aumento na acumulação de portadores de carga na superfície do ZnO, promovido pelo contacto com os materiais de carbono. Esse fenómeno pode também ocorrer no presente caso, no entanto estudos comparativos com a ZnO preparado nas mesmas condições com e sem a presença de LIG teriam de ser realizados para confirmar esta suposição. Importa ainda referir que a forma e dimensão das partículas de ZnO pode ainda contribuir para as diferenças observadas na posição e largura da emissão associada à NBE para as amostras produzidas a partir de Zn ou de ZnO, bem como a origem distinta dos precursores que dão origem a elas.

Ao analisar os três espectros adquiridos verifica-se que a intensidade relativa entre as emissões UV e visível varia em todos os casos. A razão entre NBE e DLE é um indicador da qualidade ótica dos materiais. Assim, de um modo geral, quanto maior for o valor dessa razão, melhor qualidade ótica terá o material. Além disso, a observação de emissão na região do visível indica claramente a presença de defeitos na matriz. Em termos qualitativos, a amostra #25 apresenta maior razão de NBE/DLE e, portanto, possui qualidade ótica e estrutural mais elevada. Para a amostra #25, a NBE é a emissão dominante, com uma

intensidade absoluta mais elevada (uma ordem de grandeza superior) do que as amostra com precursor de Zn. O sinal intenso dessa amostra à temperatura ambiente é desejado para a sua aplicação como meio de transdução em biossensores. Portanto, em concordância com os resultados de espectroscopia de Raman, a amostra #25 foi considerada a mais adequada para prosseguir esse trabalho.

Na **Figura 4.3 (b)** estão representados ainda os espectros de PLE obtidos para a amostra #25, monitorizados em dois comprimentos de onda diferentes, 494 nm (2,51 eV) e 510 nm (2,43 eV), à temperatura ambiente, ambos na região da banda visível observada no espectro de PL dessa amostra. Para ambos os comprimentos de onda, os espectros de PLE exibem a mesma tendência em forma de degrau, permitindo estimar o hiato energético do material em estudo com base no máximo de excitação. Assim, o valor do hiato é de aproximadamente 3,32 eV (373 nm), muito próximo do valor reportado de 3,37 eV. Os resultados de PLE indicam que a banda na região do visível observada no espectro de PL é essencialmente excitada com fótons com energia igual ou superior à energia do hiato. A presença de uma ligeira cauda observada na região de menores energias pode indicar uma contribuição adicional de estados de superfície para a emissão monitorizada.

A reprodutibilidade da produção de amostras nas condições da amostra #25 foi avaliada através de espectroscopia de Raman e de PL, como mostra a **Figura 4.4 (a) e (b)**, respectivamente. Também foi caracterizada uma amostra de LIG produzida com os mesmos parâmetros de processamento da amostra #25, de forma a servir como amostra de referência na caracterização eletroquímica.

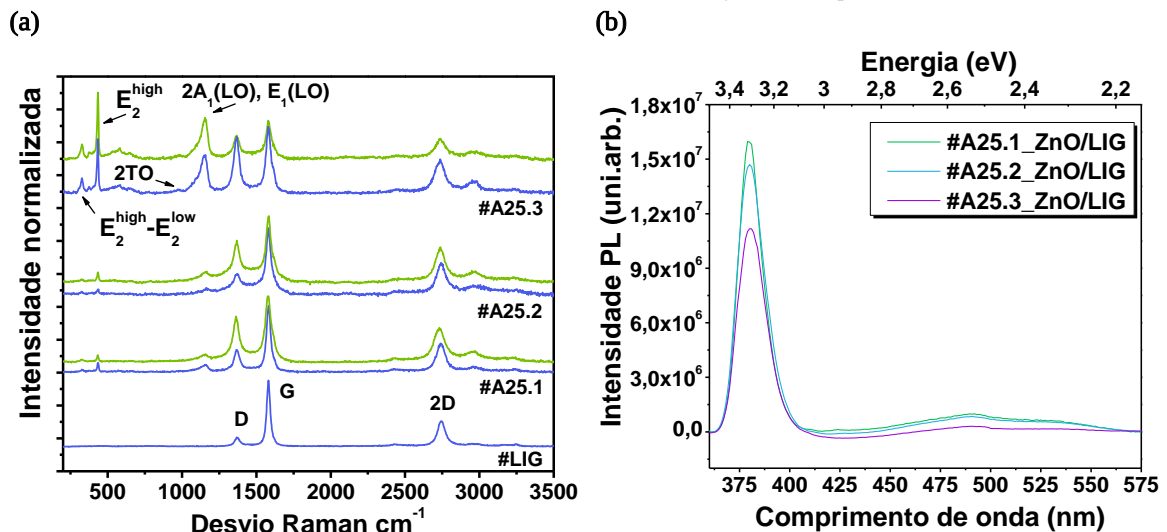


Figura 4.4: (a) Espectros de Raman obtidos para as réplicas da amostra #25. O espectro indicado como #LIG corresponde à amostra processada numa folha de Kapton® sem a pasta precursora e utilizando os parâmetros da amostra #25. As linhas azuis correspondem a regiões dominadas pela presença do LIG, enquanto as linhas verdes correspondem a dominadas pelas partículas de ZnO. (b) Espectros PL obtidos a RT nas amostras #25.1 #25.2 #25.3 (excitação com o comprimento de onda 325 nm usando uma lâmpada de Xe de 450 W).

Ao comparar os espectros de Raman das réplicas (**Figura 4.4 (a)**) observou-se que os modos vibracionais de ZnO têm, quando identificados, uma forma espectral e a relação de intensidades semelhantes aos observados na amostra #25. Verificou-se ainda que a amostra de LIG evidenciava o menor valor da razão I_D/I_G , como se pode ver na **Tabela 5**, isto porque a estrutura formada apresenta menor densidade de defeitos. Enquanto o valor mais elevado está associado à réplica #25.3. Tal como indicado pelos valores obtidos anteriormente, verifica-se que o LIG formado na presença do ZnO apresenta uma maior densidade de defeitos, provavelmente motivado pela presença da pasta precursora, como discutido anteriormente. Na **Figura 4.4 (b)** estão representados os espectros de PL para as réplicas #25.1, #25.2, #25.3. Todas elas exibem a banda NBE mais intensa do que a banda no visível, de forma semelhante ao que já tinha sido observado para a amostra #25. Assim conclui-se que no caso da resposta

de PL, não são observadas diferenças significativas entre as amostras processadas nestas condições, podendo assim utilizá-las como transdutores óticos.

Tabela 5: Valores obtidos para as razões I_D/I_G e I_{2D}/I_G a partir dos espectros das réplicas da amostra #25 e da amostra de LIG.

	#LIG	#25.1	#25.2	#25.3
I_D/I_G	0,13	0,53	0,48	0,72
I_{2D}/I_G	0,37	0,47	0,50	0,50

Para a caracterização eletroquímica foram analisadas duas amostras: uma réplica da amostra #25 e outra composta apenas por LIG produzido com os mesmos parâmetros de processamento da amostra anterior. Essas duas amostras foram analisadas em duas soluções diferentes: uma em PBS e outra solução contendo PBS e ferrocianeto. É importante mencionar que o LIG formado com e sem a camada precursora poderá apresentar características ligeiramente distintas, devido à presença da camada precursora de ZnO durante a sua formação. Na **Figura 4.5 (a)** e **(b)** estão representados os dados obtidos para os ensaios de CV e EIS para ambas as amostras. Deste modo, é possível compreender os processos de transferência de carga que ocorrem nos compósitos de ZnO/LIG e confirmar sua adequação para serem utilizados como biossensor impedimétrico.

As primeiras medidas de CV foram realizadas numa solução de PBS, correspondendo as linhas a azul associadas à amostra de LIG e a verde à amostra do compósito de ZnO/LIG (**Figura 4.5 (a)**).

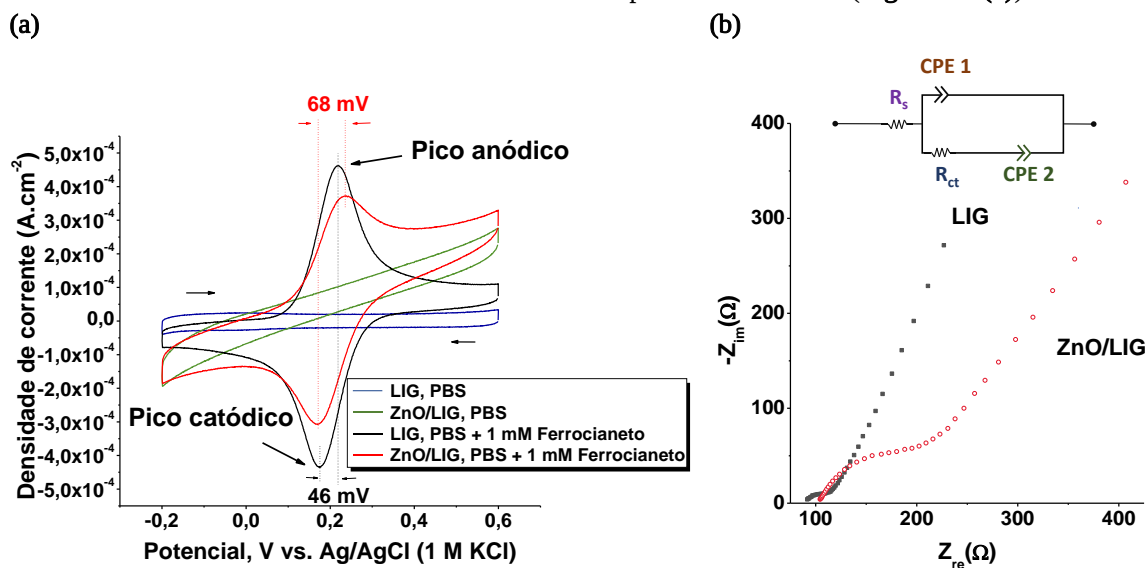


Figura 4.5: (a) CVs das amostras de LIG e ZnO/LIG obtidos a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. As linhas azul e verde correspondem a medidas feitas numa solução de PBS, enquanto as linhas preta e vermelha correspondem a medidas feitas numa solução de PBS com 1 mM ferrocianeto. Em (b) as representações de Nyquist para a amostra de LIG (símbolos em preto) e ZnO/LIG (símbolos em vermelho) e no topo o circuito equivalente.

Esses voltamogramas exibem uma forma semelhante ao um retângulo simétrico dando indício da natureza capacitiva em ambos casos. Comparando as duas amostras, as densidades de correntes e as áreas dos retângulos são maiores para os compósitos de ZnO/LIG do que para o LIG. A presença do ZnO pode ser responsável pelo aumento da capacitância, como também observado por Saranya *et al.* [95]. Já as linhas a preto correspondem à amostra de LIG e a vermelho à amostra do compósito de ZnO/LIG (**Figura 4.5 (a)**), estando associadas às medidas realizadas numa solução de PBS contendo 1 mM de ferrocianeto. Dessas medidas, os voltamogramas para as duas amostras exibem máximos bem definidos relacionados com a atividade redox das espécies eletroativas. Mais concretamente, esses máximos são o

resultado da oxidação (anódico) e redução (catódico) de ferrocianeto e ferricianeto, respetivamente, de acordo com a equação



Quando o potencial aplicado é varrido desde -0.2 V Ag/AgCl (1 M KCl) e se aproxima do potencial formal da reação, cerca de 0,2 V vs. Ag/AgCl (1 M KCl), a corrente anódica aumenta abruptamente (quanto mais rápida a cinética de transferência de carga, mais abrupto é esse aumento de corrente). No entanto, como o ferrocianeto na camada de difusão é consumido nessa reação, a certo momento começa a haver falta desse reagente e a corrente atinge um máximo, decrescendo posteriormente. O mesmo acontece para o ferricianeto quando o potencial é revertido (pico catódico). Assim, a existência desses dois máximos no voltamograma é uma consequência da limitação do processo redox pela difusão de reagentes para a superfície do elétrodo. A amostra de LIG apresenta um valor de separação entre os máximos anódico-catódico de aproximadamente 46 mV, sendo que o valor mínimo teórico é de 57 mV para processos termodinamicamente reversíveis que envolvam um eletrão, à temperatura ambiente (25°C) [96], de acordo com a seguinte equação

$$\Delta E_p = E_{p,ano} - E_{p,cat} = 2,218 \frac{RT}{\eta F} = 57mV \quad (\text{eq.4.2})$$

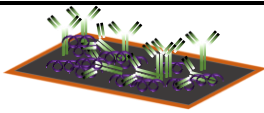
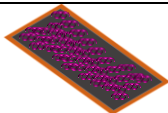
onde ΔE_p é a diferença entre os potenciais dos máximos anódico-catódico, $E_{p,ano}$ o potencial no máximo anódico, $E_{p,cat}$ o potencial no máximo catódico, R a constante dos gases, T a temperatura ambiente, η o número de eletrões envolvidos e F a constante de Faraday. Isto pode ocorrer devido à adsorção parcial dos iões de ferro/ferricianeto à superfície do LIG, que altera a energia de ativação dos processos redox, que por sua vez deixam de ser descritos pelo processo convencional de difusão de espécies para a superfície do elétrodo (para o qual a **equação 4.2** é válida). Já no caso do compósito de ZnO/LIG é possível observar uma redução nos valores da densidade de corrente. Além disso, a separação entre os máximos anódico-catódico encontra-se em torno de 68 mV, superior ao observado para o LIG, indicando um grau superior de irreversibilidade do processo redox devido à presença do ZnO. Separações de potencial na gama entre o mínimo teórico para um processo termodinamicamente reversível, 57 mV, e cerca de 220 mV delimitam frequentemente uma região denominada por quasi-reversibilidade, na qual o compósito de ZnO/LIG se enquadra.

Na **Figura 4.5 (b)** é possível observar a representação de Nyquist para ambas as amostras obtidas nas medidas de EIS, bem como o respetivo circuito equivalente que modela esse sistema. Nesse caso, o circuito equivalente correspondente é o circuito modificado de Randles para um sensor com transdução impedimétrica faradaica, onde CPE1 e CPE2 são os elementos de fase constante que modelam a capacitância para a camada dupla, não ideal, e a difusão dos iões de ferro/ferricianeto, respetivamente. De referir que a necessidade de um CPE para descrever a difusão em vez de um elemento de Warburg, como mencionado na **secção 3.3**, indica que o processo de difusão não ocorre num regime semi-infinito, provavelmente devido à porosidade elevada do LIG. Uma vez que ocorrem processos de transferência de carga no sistema, espera-se que a representação de Nyquist apresente um semicírculo. Para a amostra de LIG (símbolos a preto), a representação de Nyquist exibe uma ligeira modulação à R_{ct} nas frequências mais elevadas, enquanto para as frequências mais baixas dominam os processos de difusão. Por outro lado, a forma do semicírculo é mais visível para o caso dos compósitos de ZnO/LIG (símbolos a vermelho), em que é observado um aumento no R_{ct} de 30 Ω para 120 Ω após o ajuste com o circuito equivalente representado. Isto sugere a existência de transferência de carga entre o LIG e o ZnO como processo inerente às reações redox observadas. É também consistente com a redução da intensidade dos máximo redox e aumento da separação em potencial dos mesmos observado através da CV da **Figura 4.5 (a)** (processo com grau de irreversibilidade maior, caracterizado por um aumento de resistência de transferência de carga como inferido pelo EIS).

4.2 Resposta do biossensor

Após a escolha da melhor condição de produção dos compósitos de ZnO/LIG e sua funcionalização com anti-PSA, como descrito no **Capítulo 3**, os biossensores e amostras de controlo foram testados para oito concentrações de PSA (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 e 100 ng.ml⁻¹) através das técnicas PL e EIS, de forma a verificar a sensibilidade e seletividade desses ao antígeno. Na **Tabela 6** está representado o tipo de amostra com a sua respetiva funcionalização e a técnica utilizada para monitorização da deteção.

Tabela 6: Amostras e testes realizados para transdução via fotoluminescência e EIS.

Funcionalização	Teste de fotoluminescência e EIS
Biossensor por adsorção física	
Controlo	

Apesar de terem sido testados vários sensores através da análise do seu sinal de PL, na **Figura 4.6** destacam-se os resultados obtidos para três deles, onde um desses (S#1) foi funcionalizado por 2 horas, enquanto que os outros dois (S#2 e S#3) estiveram em contacto com a solução contendo o anticorpo por 24 horas. Na **Figura 4.6** estão representados ainda os resultados para uma amostra de um controlo (C#1). Os espectros que correspondem às medidas de referência estão denominados como branco, tendo sido adquiridos antes de se adicionar as concentrações de PSA às amostras, tendo estado elas em contacto somente com PBS. A monitorização foi feita no máximo da NBE, uma vez que esta é a emissão que apresentava maior intensidade e cujas variações eram mais evidentes aquando a adição das diferentes concentrações de PSA. Verificou-se que o sensor S#1 (**Figura 4.6 (a)**) não exhibe qualquer tendência do sinal PL em função das concentrações adicionadas. A título de exemplo, destaca-se que a intensidade do espectro de referência e das concentrações 0,1; 1 e 5 ng.ml⁻¹ apresentam valores semelhantes, enquanto que para as concentrações 0,5; 10; 25; 50; 100 ng.ml⁻¹ se observa uma variação aparentemente aleatória.

Uma das razões pelas quais esse biossensor exhibe um comportamento aleatório pode ser o facto da ligação do anticorpo à superfície do transdutor não ser estável às diferentes incubações e/ou a ligação anticorpo-antígeno não se tenha estabelecido adequadamente. Tendo em conta esses resultados optou-se por incubar o anti-PSA por 24 horas nos biossensores S#2 e S#3, de forma a tentar promover uma melhor ligação do elemento de bioreconhecimento com o transdutor. Os resultados de PL resultantes para estes dois casos estão representadas nas **Figura 4.6 (b) a (c)**, respetivamente.

Em relação ao sensor S#2 (**Figura 4.6 (b)**), de um modo geral, a intensidade de PL diminuiu com o aumento das concentrações. Contudo isto não ocorreu para todas as concentrações, sendo a intensidade da concentração 25 ng.ml⁻¹ superior à observada para 10 ng.ml⁻¹. O sensor S#3 (**Figura 4.6 (c)**) exhibe uma tendência semelhante ao sensor #2 para maiores concentrações, entre 10 e 100 ng.ml⁻¹, porém para concentrações menores (0,1 a 5 ng.ml⁻¹) as intensidades de PL não seguem o mesmo padrão. Idealmente, no caso do controlo C#1, a intensidade de PL não deveria variar significativamente com as diferentes concentrações de PSA, uma vez que nesse caso não existe elemento de bioreconhecimento para que se dê uma ligação específica com o antígeno. Contudo, a resposta do controlo C#1 (**Figura 4.6 (d)**) mostra que a intensidade de PL variou também de forma aleatória em função do aumento das concentrações de PSA.

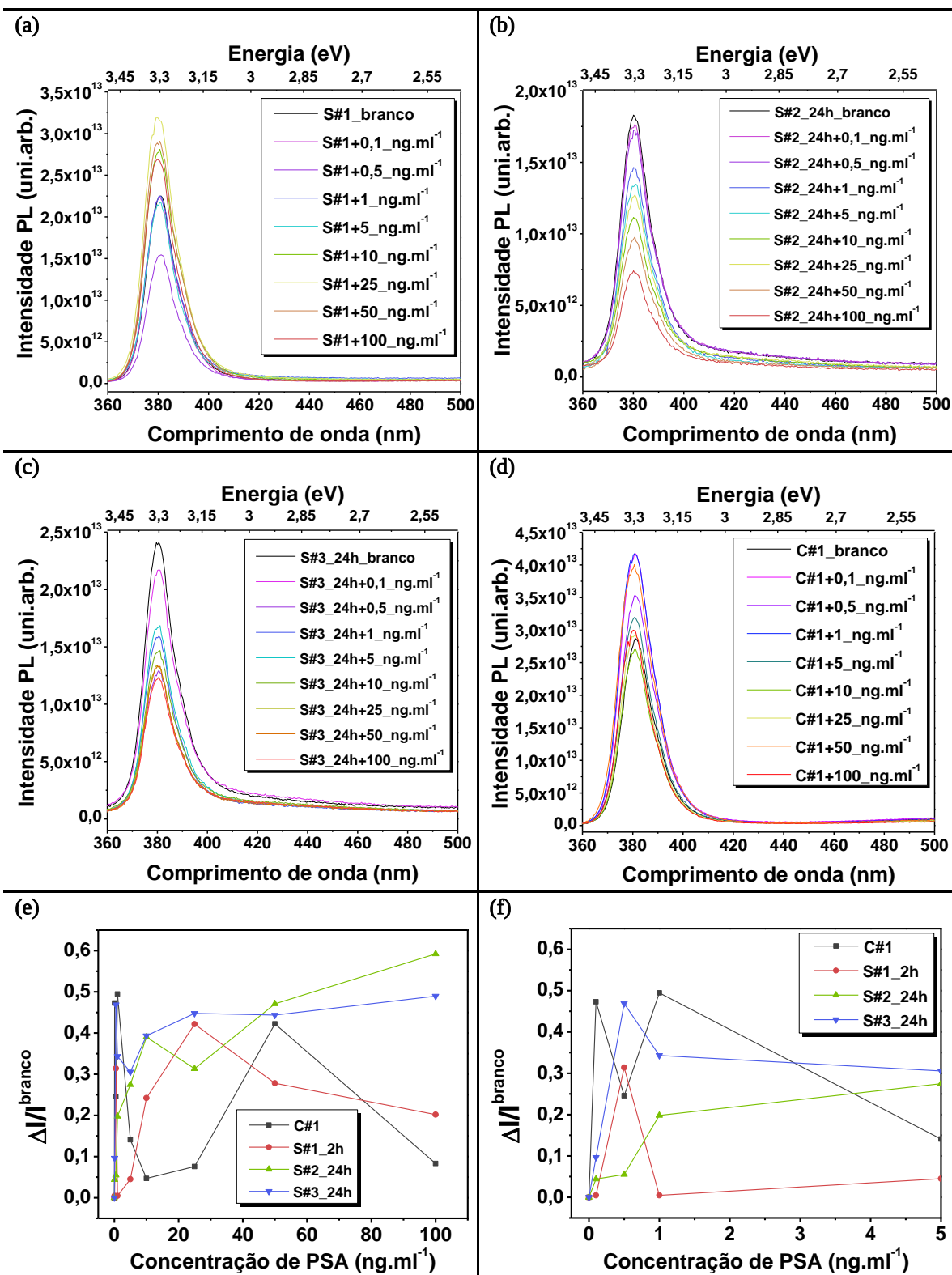


Figura 4.6: Espectros de PL em função da concentração de PSA: (a) biossensor em que a solução do anti - PSA esteve em contacto com a superfície do compósito durante 2 horas (S#1); (b) e (c) biossensor com incubação durante 24 horas (S#2 e S#3, respetivamente); (d) controlo (sem anti-PSA, C#1). (e) Resposta PL de para os sensores S#1, S#2 e S#3 e para o controlo C#1, monitorizando no máximo da NBE; (f) ampliação do gráfico anterior na região das concentrações de PSA entre 0-5 ng.ml⁻¹.

A resposta normalizada dos biossensores óticos foi determinada de acordo com a seguinte expressão [40,41]:

$$Resposta_{PL} = \frac{\Delta I}{I_{branco}} = \frac{|I - I^{branco}|}{I_{branco}} \quad (\text{eq.4.3})$$

e foi representada em função das concentrações, como pode ser observado **Figura 4.6 (e)** (e a ampliação desse gráfico para menores concentrações (0-5 ng.ml⁻¹) na **Figura 4.6 (f)**).

Comparando as diferentes respostas, observa-se que nem os biossensores nem a amostra de controlo apresentam comportamentos reprodutíveis e com uma tendência específica em função do aumento da concentração de analito. Ainda assim, essa variação foi diferente da observada no caso dos sensores. Além disso, para o caso dos sensores que estiveram 24 horas em contacto com o bioreceptor, a resposta exhibe algumas semelhanças no comportamento com as diferentes concentrações de analito, sugerindo uma melhoria nas condições de funcionalização para esse caso. Uma das razões poderá ser o facto de uma maior permanência na solução de anti-PSA permitir uma melhor penetração dessa no transdutor e assim promover uma maior área funcionalizada. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho não nos permitem afirmar que esses materiais possam ser capazes de atuar como sensores óticos e detetar (e discriminar) as diferentes concentrações de PSA.

Para os testes eletroquímicos de CV e EIS foram utilizados um sensor S#4, com anti-PSA incubado por 2 horas, e um controlo C#2 (ver **Figura 4.7**). As medidas foram realizadas numa solução eletrolítica composta por [Fe(CN)₆]^{-3/-4} de (1:1 mM) em 10 mM PBS. Uma monitorização inicial das superfícies dos eléctrodos foi realizada através da voltametria cíclica, como está representada na **Figura 4.7 (a)**. Através da análise do voltamograma verifica-se que tanto o sensor S#4 como o controlo C#2 exibem comportamentos semelhantes às amostras caracterizadas anteriormente, apesar da ligeira diferença na densidade de corrente de pico dos dois eléctrodos, provavelmente relacionada com pequenas diferenças na quantidade de ZnO produzido nas duas amostras.

As representações de Nyquist do biossensor e controlo estão representadas nas **Figura 4.7 (b) e (c)**, respetivamente. Para o sensor S#4, com o aumento das concentrações de PSA, as formas dos semicírculos exibem comportamentos semelhantes, e por consequência, as resistências à transferência de carga (R_{ct}) também não evidenciam variações significativas. De igual modo, as formas dos semicírculos gerados nas medidas do controlo C#2 também não exibem variações significativas com o aumento das concentrações de PSA.

Após as medidas de EIS foi feito um ajuste às curvas das representações de Nyquist que permitem obter a resposta do biossensor e controlo testados (**Figura 4.7 (d)**). Pelo ajuste, o modelo que se adequa melhor a esse sistema é, mais uma vez, um circuito equivalente de Randles modificado, como observado anteriormente. Através do ajuste determinaram-se os valores das resistências à transferência de carga para o sensor e controlo analisados, e assim, a sua respetivas respostas em função das concentrações. Na **Figura 4.7 (e)** encontra-se representada a resposta normalizada para o biossensor eletroquímico.

Essa resposta foi obtida de uma forma semelhante à utilizada para o caso da PL. Assim, nesse caso

$$Resposta_{EIS} = \frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}^{branco}} = \frac{|R_{ct} - R_{ct}^{branco}|}{R_{ct}^{branco}} \quad (\text{eq.4.4})$$

A **Figura 4.7 (f)** corresponde a uma ampliação do gráfico da resposta normalizada em função das concentrações de PSA para menores concentrações (0 - 10 ng.ml⁻¹). Todos os ajustes apresentavam um desvio às medidas experimentais de aproximadamente 1,5%. Com base nesses resultados, conclui-se que o sensor S#4 e o controlo C#2 exibem respostas semelhantes, principalmente para baixas concentrações (0-5 ng.ml⁻¹), enquanto que para maiores concentrações apresentam um comportamento aleatório. Mais uma vez, não é possível afirmar que o biossensor produzido possa ser capaz de atuar como sensor eletroquímico e detetar o PSA.

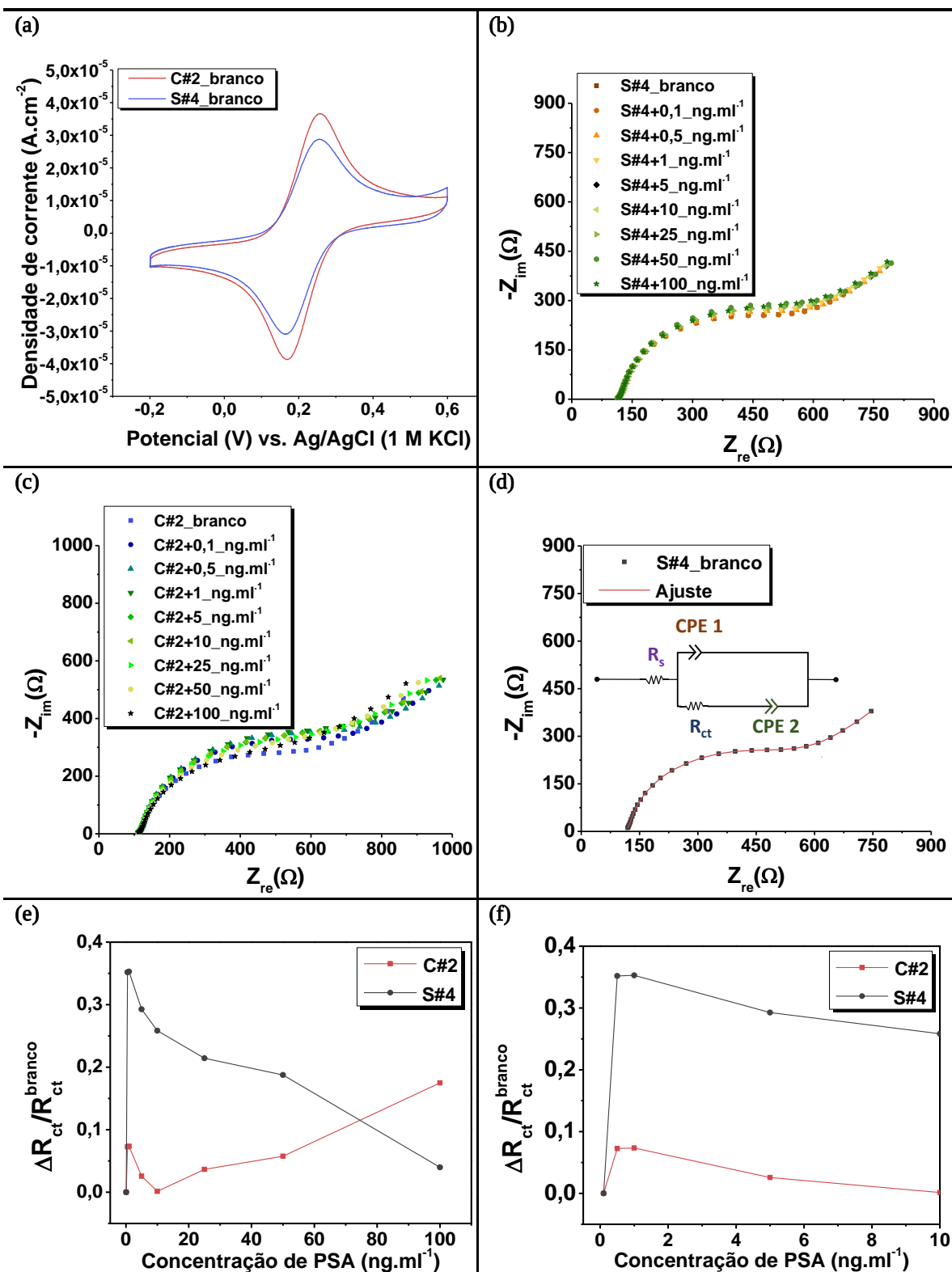


Figura 4.7: (a) CVs do controle C#2 (linha vermelha) e do biossensor S#4 (linha azul) adquiridos com taxa de varrimento de 100 mV.s⁻¹; (b) e (c) são as respostas EIS para o biossensor S#4 com anti-PSA incubado por 2 horas e para o controle C#2, respectivamente; (d) representação de Nyquist do biossensor S#4 branco (símbolos pretos), com o seu respetivo circuito equivalente e com a curva de ajuste (linha vermelha); (e) comparação entre as respostas do controle C#2 e o biossensor S#4; e (f) ampliação do gráfico anterior na região das concentrações de PSA entre 0-10 ng.ml⁻¹.

4.3 Fatores limitativos do desempenho como sensor

Após a realização dos testes anteriores, foi feito um estudo para identificar os fatores que podem influenciar na resposta dos biossensores produzidos neste trabalho e assim tentar perceber o que poderá estar a limitar a utilização desses materiais como transdutores. Esse estudo consistiu em avaliar as possíveis alterações nos biossensores e nos controlos produzidos após os testes de PL para deteção do PSA, ou que estiveram em contacto com PBS durante algumas horas e/ou lavagens sucessivas. Amostras selecionadas foram analisadas através de SEM, EDS e espectroscopia de Raman. Os resultados mais relevantes estão representados nas **Figura 4.8** e **Figura 4.9**.

As primeiras amostras analisadas foram o sensor S#5 (**Figura 4.8 (a)**) e o controlo C#3 (**Figura 4.8 (b)**), onde foi possível observar a presença de cristais facetados com uma forma octaédrica que não se encontravam presentes nas amostras dos compósitos de ZnO/LIG caracterizadas anteriormente. Esses cristais foram vistos por toda a superfície dos compósitos, estando, em alguns casos, mesmo envolvidos pelos compósitos ZnO/LIG (**Figura 4.8 (a)**). Com o intuito de compreender a origem e a contribuição desses cristais, uma amostra contendo os compósitos de ZnO/LIG foi analisada antes (**Figura 4.8 (c)**, S#6.1), durante e após (**Figura 4.8 (d)**, #6.2) todo o processo de funcionalização, além de terem também sido expostas a sucessivas lavagens com PBS.

Ao comparar as imagens de SEM adquiridas na mesma região da amostra em cada passo do teste, observa-se que a superfície da amostra S#6.1 apresenta somente as estruturas esperadas para uma amostra só com LIG e ZnO, como verificado na **Figura 4.1 (f)**, enquanto que a amostra S#6.2 (imagem SEM adquirida após funcionalização e a sucessivas lavagens de PBS) exhibe não só os compósitos, mas também cristais de diferentes formas e tamanhos por toda a superfície da amostra, inclusivamente dentro dos poros do LIG. Com base nesses resultados surgiu a hipótese de que esses cristais pudessem ter origem nos sais presentes na solução de PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ [97]), e que a sua nucleação na superfície dos compósitos fosse promovida pela presença de ZnO, atuando como ponto de ancoragem para o crescimento desses cristais. Para confirmar quais são as espécies químicas presentes na superfície da amostra S#6.2 foram realizadas medidas de EDS (**Figura 4.9 (a)**) (acoplado ao SEM do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica). As medidas de EDS foram feitas após adicionar duas concentrações de PSA, 1 e 100 ng.ml⁻¹. Pelos resultados de EDS foi identificada a presença dos elementos P, Cl, Na, além dos esperados C, O e Zn. Isto é uma evidência que esses cristais provêm de facto da solução de PBS. Para compreender a formação dos sais de PBS na superfície dos biossensores foi realizado um ensaio que consistiu em mergulhar o sensor S#7 (funcionalizado com anti-PSA e BSA, mas sem a incubação com PSA) durante 3 horas numa solução contendo somente PBS. Nas **Figura 4.8 (e)** e **(f)** estão representadas as imagens de SEM da superfície do sensor antes (S#7.1) e depois (S#7.2) do ensaio, respetivamente, onde é possível identificar o LIG, ZnO, mas também um cristal semelhante ao observado nas **Figura 4.8 (a)** e **(b)**, logo após a funcionalização dessas estruturas, mas uma vez que tanto o anti-PSA como a BSA se encontram dissolvidos em uma solução de PBS. A diferença mais relevante entre os dois passos do ensaio diz respeito à ligeira alteração das dimensões do cristal, observando-se que esse permanece no mesmo local da amostra, evidenciando assim a sua adesão à amostra, bem como o crescimento dos mesmos.

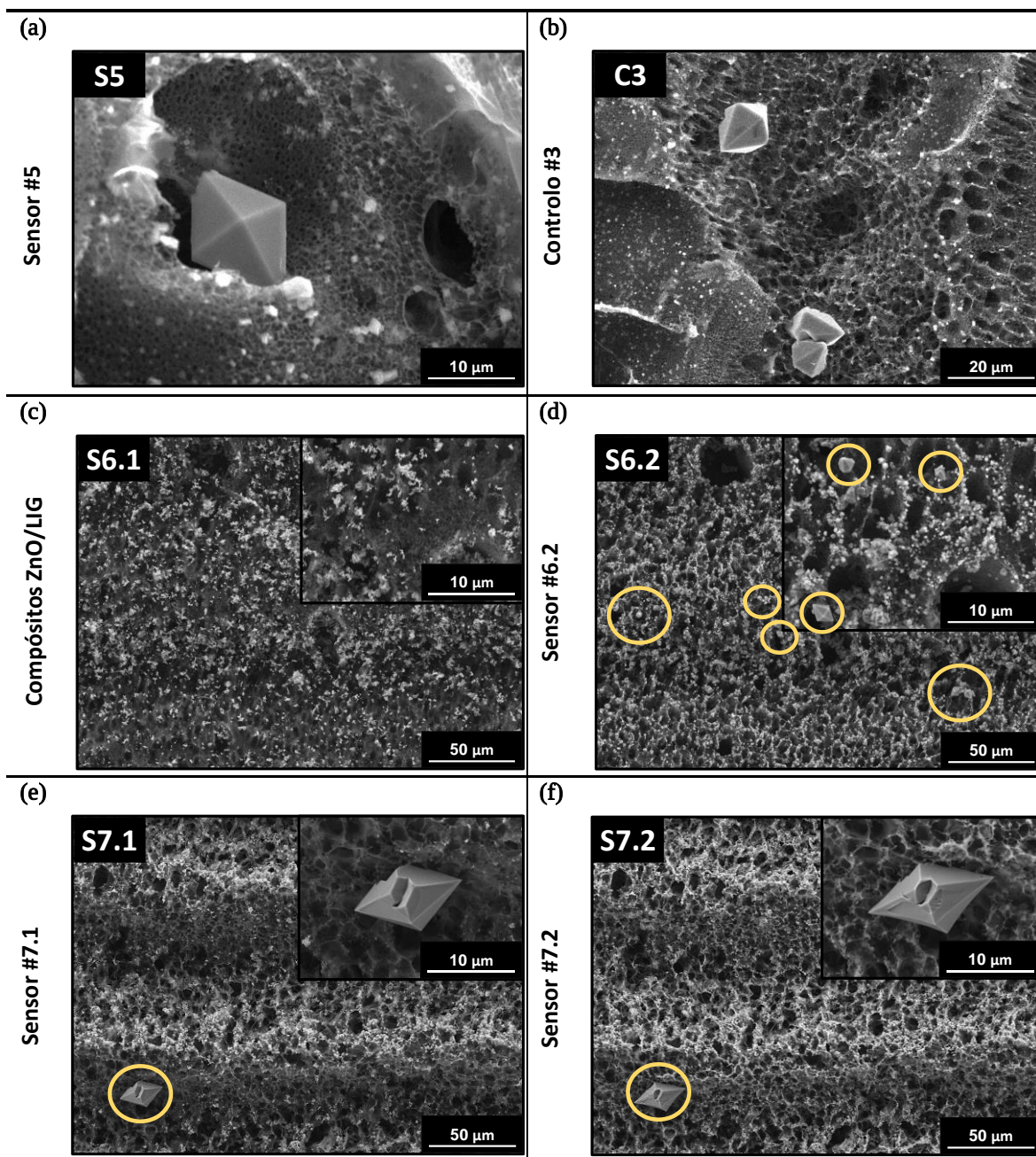


Figura 4.8: Imagens de SEM adquiridas para (a) o biossensor #5; e (b) para o controle C#3, após os testes de PL para as oito concentrações de PSA. (c) Amostra S#6 contendo somente os compostos de ZnO/LIG antes da funcionalização; (d) mesma amostra após a funcionalização e as sucessivas lavagens com PBS; (e) e (f) superfície do sensor S#7 antes e depois de ser mergulhado durante 3 horas numa solução de PBS, respectivamente.

Uma vez que a análise de EDS só permitiu obter informação acerca dos elementos químicos presentes nas amostras e que foi sugerida ainda a possibilidade de que alguns desses cristais poderiam ser originados pela reação do ZnO com as espécies químicas que contêm fosfato, produzindo $Zn_3(PO_4)_2$, a análise dos cristais foi complementada através de espectroscopia de Raman em pontos diferentes das amostras S#6.2 e S#7.2 e comparados com os espectros da amostra #25, como representado na **Figura 4.9 (b)**.

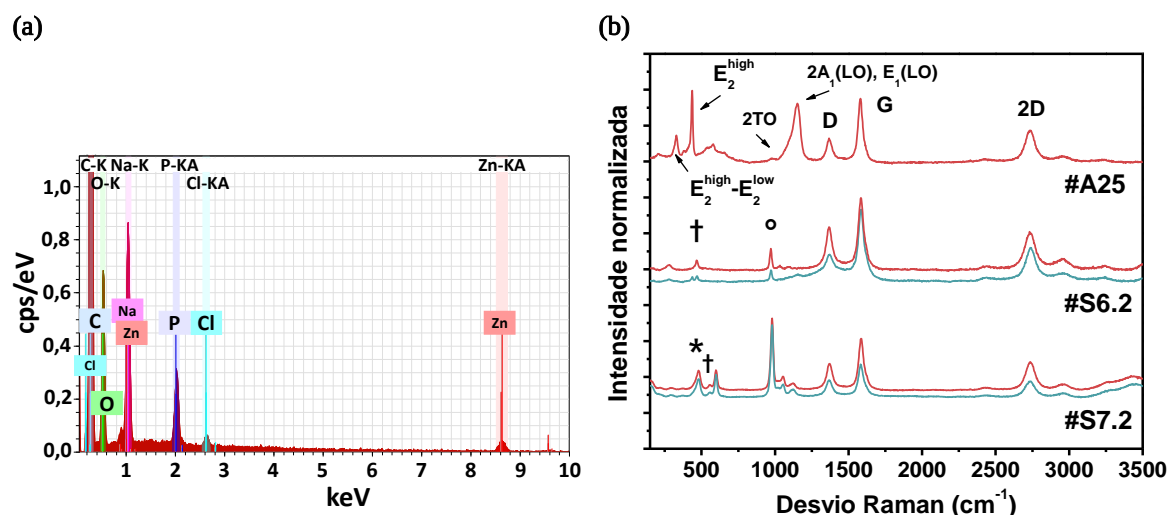


Figura 4.9: (a) Espectro de EDS da amostra S#6.2 após os testes. É possível observar a presença das espécies químicas de Zn, O, C, Na, P, Cl. Em (b) os espectros de Raman para as amostras #25, #S6.2 e #S7.2. Encontram-se representados os espectros de Raman para duas regiões distintas e aleatórias (linhas vermelhas e verdes escuro), onde † está associado à Na₂HPO₄, * à KH₂PO₄, ° à Zn₃(PO₄)₂.

Tanto o espectro da amostra S#6.2 como o da S#7.2 exibem os modos correspondente ao LIG entre 1300 e 3500 cm⁻¹ e ao ZnO, na região de menores números de onda, semelhante ao que ocorre no espectro da amostra #25. Contudo, entre 100 e 1250 cm⁻¹ é possível observar a presença de modos adicionais. Num dos espectros adquiridos na amostra S#6.2 (linha vermelha) encontram-se modos vibracionais menos intensos em 277 cm⁻¹, 468 cm⁻¹ e 969 cm⁻¹. Já para o espectro associada à outra região da mesma amostra (linha verde escuro) é possível encontrar, para além desses modos, um outro a 434 cm⁻¹. Para a amostra S#7.2 foi obtido um espectro que exhibe modos vibracionais diferentes do caso anterior, a 480 cm⁻¹, 550 cm⁻¹, 598 cm⁻¹, 980 cm⁻¹ (mais intenso), 1051 cm⁻¹ e 1117 cm⁻¹ para ambas regiões estudadas.

Tendo em conta a hipótese de os cristais observados anteriormente terem sua origem nos sais de PBS procurou-se na literatura os modos vibracionais relacionados com Na₂HPO₄, KH₂PO₄, mas também para o Zn₃(PO₄)₂. Primeiramente comparou-se os modos vibracionais do Na₂HPO₄ [98] com os modos observados no espectro de Raman da **Figura 4.9 (b)**, onde somente o modo situado em 468 cm⁻¹ para amostra S#6.2 e o modo em 550 cm⁻¹ para S#7.2 são semelhantes aos 461 cm⁻¹ e 556 cm⁻¹ presentes no Na₂HPO₄, respetivamente. Em seguida, procurou-se os modos para KH₂PO₄ [99], e verificou-se que o modo que aparece a 480 cm⁻¹ para a amostra S#7.2 poderá estar associado ao modo presente em 475 cm⁻¹ para KH₂PO₄. No caso de Zn₃(PO₄)₂ [100], o modo situado em 960 cm⁻¹ encontra-se próximo do observado para a amostra S#6.2, a 969 cm⁻¹. A comparação entre os espectros de Raman dos sais e das amostras S#6.2 e S#7.2 presentes na **Figura 4.8** sugerem assim a presença dos sais KH₂PO₄, Na₂HPO₄, bem como a formação de Zn₃(PO₄)₂, indicando a ocorrência de reações químicas entre o PBS e os cristais de ZnO.

Além da presença desses cristais, o facto das superfícies dos compósitos, quer antes e mesmo depois da funcionalização, terem um caráter hidrofóbico, como visto no **Capítulo 3 (Figura 3.3)**, pode ainda comprometer significativamente a obtenção de sensores adequados. Uma consequência direta é a capacidade limitada da superfície do transdutor ser permeável a substâncias líquidas, influenciado o processo de funcionalização e imobilização do anticorpo e do antígeno. A dificuldade em molhar a superfície das amostras foi observada durante todo o trabalho, sendo necessário proceder a sucessivas lavagens com água desionizada ou com PBS para aumentar a sua molhabilidade. Isto afeta o tempo mínimo necessário para incubar o anticorpo e o antígeno na superfície do biossensor. Por isso foram realizados os testes de PL com o biossensor funcionalizado com anti-PSA por 2 horas e por 24 horas, tendo-se observado melhorias aparentes para os últimos. Caso o anticorpo não seja imobilizado em

quantidade suficiente na superfície do transdutor, o desempenho geral do biossensor estará comprometido, como já discutido anteriormente, bem como a reprodutibilidade do mesmo. Além disso, a técnica de imobilização utilizada (adsorção física) pode ser mais um fator que contribui para a limitação do desempenho do sensor produzido neste trabalho. Como a técnica de adsorção física depende das interações eletrostáticas e de Van der Waals entre o anticorpo e a superfície do transdutor, as sucessivas lavagens com PBS poderão ser suficientes para retirar parte ou mesmo a totalidade dos anticorpos presentes na superfície. E ainda, é esperado que a ligação se dê maioritariamente no ZnO devido ao valor elevado do seu IEP, como descrito no **Capítulo 2**. Já que a quantidade de LIG é consideravelmente superior à de ZnO, existe a hipótese de que somente uma pequena parte da amostra seja efetivamente funcionalizada. Consequentemente, as variações observadas nos testes de PL e EIS podem não ser das interações específicas entre anticorpo-antígeno, mas sim de outros processos que ocorrem na superfície transdutora e que ainda terão de ser investigados em detalhe.

5. Conclusões e trabalho futuro

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, caracterização e otimização de compósitos de ZnO/LIG produzidos através da sua síntese simultânea por tecnologia laser para aplicação em biossensores que possibilitassem dupla transdução, ótica e impedimétrica, e que fossem capazes de detetar e discriminar diferentes concentrações do antígeno específico da próstata.

Primeiramente, exploraram-se as diferentes combinações dos parâmetros de processamento a laser e diferentes precursores para a formação de ZnO, de modo a determinar qual era a combinação mais adequada à produção simultânea tanto do LIG como do ZnO, com as características desejadas. A escolha dos compósitos de ZnO/LIG para compor o material transdutor foi baseada nas amostras que apresentavam as melhores propriedades, nomeadamente qualidade cristalina dos componentes, intensidade do sinal de luminescência, transferência de carga, e homogeneidade dos compósitos. Para isso recorreu-se as técnicas de SEM, EDS, espectroscopia de Raman, PL/PLE, CV e EIS para a caracterização morfológica, estrutural, ótica e eletroquímica. Entre as diversas combinações de parâmetros e precursores testados, a que se revelou mais adequada correspondia aos compósitos de ZnO/LIG produzidos a partir da pasta precursora de ZnO, com os parâmetros de processamento: $v = 200 \text{ mm.s}^{-1}$, $P = 21 \text{ W}$, $d = 0,1 \text{ mm}$, $h_{\text{laser}} = 2,1 \text{ cm}$. As réplicas dos compósitos escolhidos foram também caracterizadas para verificar a sua reprodutibilidade, tendo essa sido considerada satisfatória, particularmente no caso do sinal de PL.

Após a síntese e caracterização do material transdutor, procedeu-se à modificação da superfície do compósito de ZnO/LIG de modo a possibilitar a incorporação da camada de bioreconhecimento. A funcionalização foi dividida em duas etapas: a primeira etapa consistiu em utilizar a técnica de adsorção física para imobilizar o anticorpo, anti-PSA, na superfície do material transdutor e na segunda etapa foi feita a passivação da mesma com BSA. Todas as amostras foram igualmente funcionalizadas, podendo assim prosseguir para os testes como biossensor. Além disso, foram ainda produzidas amostras de controlo contendo apenas a passivação com BSA.

Os testes de deteção foram realizados adicionando oito concentrações diferentes de PSA à superfície dos biossensores produzidos e verificando as alterações na resposta destes em função do aumento da concentração de analito. Essas alterações foram monitorizadas através das técnicas de PL e EIS. A resposta dos biossensores testados, assim como dos controlos para ambas as técnicas, não possibilitou a identificação de uma tendência específica em função do aumento da concentração de analito. Além disso, não exibiram um comportamento reprodutível e, conseqüentemente, não foi possível concluir que as amostras produzidas neste trabalho possam ser capazes de atuar como sensores, detetando e discriminando as diferentes concentrações de PSA.

Por fim, foram realizados estudos acerca dos fatores limitativos que poderiam influenciar a resposta dos biossensores. Esses estudos consistiram em analisar a superfície de um biossensor (S#5) e um controlo (C#3), através de SEM, após os testes de PL com as oito concentrações de PSA. Foi analisada também uma amostra contendo somente os compósitos de ZnO/LIG, antes e após a funcionalização (S#6), bem como um biossensor após ter ficado submerso em PBS por 3 horas. Pelas imagens de SEM observou-se a presença de cristais facetados distribuídos por toda a superfície dos compósitos. Para obter mais informações sobre a origem desses cristais, as amostras S#6.2 e S#7.2 foram analisadas por EDS e por espectroscopia de Raman. Os resultados desses estudos indicam que os cristais podem corresponder à presença de sais de PBS e também à formação de $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$. Outros fatores limitativos identificados dizem respeito à natureza hidrofóbica da superfície transdutora e à técnica de funcionalização utilizada (adsorção física), cuja estabilidade e reprodutibilidade poderão ser reduzidas, particularmente nesse tipo de amostras.

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, é necessário um estudo mais aprofundado nos compósitos de ZnO/LIG. Nomeadamente, propõem-se como trabalho futuro a realização de medidas de

PL a baixa temperatura (*e.g.*, 10 K) de forma a identificar quais as transições radiativas associadas à banda UV observada nas amostras selecionadas. É ainda importante aprofundar a caracterização estrutural dos compósitos através de difração de raios-X. No que diz respeito à funcionalização dos materiais, melhorar a molhabilidade da superfície dos compósitos pode ser um aspeto relevante, de forma a conseguir que o elemento bioreceptor tenha um melhor contacto com o transdutor e de forma mais uniforme. Além disso, funcionalizar a camada transdutora através de outra técnica de imobilização, nomeadamente a ligação covalente, de modo a melhorar a estabilidade e reprodutibilidade da formação da camada de bioreconhecimento, bem como garantir o alinhamento adequado do anticorpo, é também uma questão relevante. Assim, um estudo detalhado de quais as melhores condições para que esta camada seja formada, sem, no entanto, afetar as propriedades óticas e eletroquímicas do transdutor, é de grande importância. Após a otimização de todas estas etapas, novos testes de PL e EIS nesses biossensores terão de ser realizados para verificar a sua reprodutibilidade e a resposta na presença do analito.

6. Referências

- [1] World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals, 2018.
- [2] L.W. Niessen *et al.*, *Lancet*. 391 (2018) 2036–2046. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30482-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30482-3).
- [3] F. Bray *et al.*, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [4] F. Bray *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv273>.
- [5] R. Luengo-Fernandez *et al.*, *Lancet Oncol.* 14 (2013) 1165–1174.
- [6] D.A. Healy *et al.*, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 125–131.
- [7] A. Rasooly *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1851–1858.
- [8] J. Kirsch *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 1–37. <https://doi.org/10.1039/c3cs60141b>.
- [9] J. Edge *et al.*, *Arch. Dis. Child.* 102 (2017) 543–549.
- [10] S. Rodriguez-Mozaz *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1025–1041.
- [11] B. Bohunicky *et al.*, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 4 (2010) 1–10. <https://doi.org/10.2147/NSA.S13465>.
- [12] D. Grieshaber *et al.*, *Sensors*. 8 (2008) 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>.
- [13] B.A.G. Rodriguez *et al.*, *Biosens. Micro Nanoscale Appl., InTech*, (2015) 347–373.
- [14] N.F. Atta *et al.*, *Biosens.-Micro Nanoscale Appl., InTech*, (2015) 37–84.
- [15] C.I.L. Justino *et al.*, *TrAC Trends Anal. Chem.* 91 (2017) 53–66.
- [16] A. Samouco *et al.*, *Flex. Print. Electron.* 3 (2018) 1–21. <https://doi.org/10.1088/2058-8585/aaed77>.
- [17] <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/o-que-e-o-cancro> (accessed September 10, 2019).
- [18] H. Grönberg, *Lancet*. 361 (2003) 859–864. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12713-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12713-4).
- [19] A. Cox *et al.*, John Wiley & Sons, Ltd, (2008) 511–521.
- [20] M.R. Cupp *et al.*, *Mayo Clin. Proc.* 68 (1993) 297–306.
- [21] <https://saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-da-prostata/estadiamento> (accessed September 10, 2019).
- [22] C. Mamoulakis *et al.*, *Biomarkers Toxicol., Elsevier*, (2019) 869–881.
- [23] M.M. Shen *et al.*, *Genes Dev.* 24 (2010) 1967–2000. <https://doi.org/10.1101/gad.1965810>.
- [24] M.B. Gretzer *et al.*, *Urol. Clin. North Am.* 30 (2003) 677–686.
- [25] S.E. Dowd *et al.*, *Microbiol., Elsevier*, (2009) 225–241.
- [26] J.R. Crowther, 516 (2009) 1–566. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4>.
- [27] J.R. Prensner *et al.*, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003180>.
- [28] J.P. Chambers *et al.*, *Curr. Issues Mol. Biol.* 10 (2008) 1–12. <https://doi.org/10.21775/cimb.010.001>.
- [29] G. Rivas *et al.*, *Talanta*. 74 (2007) 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.013>.
- [30] P. Mehrotra, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159.
- [31] K.L.M. Moran *et al.*, Elsevier B.V., (2016) 93–120. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.04.002>.
- [32] X. Zhao *et al.*, *J. R. Soc. Interface*. 9 (2012) 2457–2467. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0148>.
- [33] T.E. Benavidez *et al.*, *J. Colloid Interface Sci.* 435 (2014) 164–170.
- [34] D.A. Armbruster, *Clin. Chem.* 39 (1993) 181–195.
- [35] N.R. Shanmugam *et al.*, *Futur. Sci. OA.* 3 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0006>.
- [36] J.L. Arlett *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 203–215. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.44>.
- [37] K. Danzer, *Pure & Appl. Chem.*, (1998) 993–1014.
- [38] C.I.L. Justino *et al.*, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1172–1183.
- [39] C.I.L. Justino *et al.*, *TrAC Trends Anal. Chem.* 85 (2016) 1–60.
- [40] A. Tereshchenko *et al.*, *Sensors Actuators B Chem.* 229 (2016) 664–677.
- [41] R. Viter *et al.*, *IEEE Sens. J.* 14 (2014) 2028–2034. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2014.2309277>.
- [42] X. Xi *et al.*, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 1273–1279. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1448-1>.
- [43] D. Sodzel *et al.*, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 1819–1826.
- [44] D.R. Thevenot *et al.*, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 2333–2348.
- [45] A. Chen *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 5425–5438. <https://doi.org/10.1039/c3cs35518g>.
- [46] Y. Wang *et al.*, *Micromechanics Nanomechanics Compos. Solids*, Springer International Publishing, (2018) 123–156. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52794-9_4.
- [47] Y. Zhu *et al.*, *Adv. Mater.* 22 (2010) 3906–3924. <https://doi.org/10.1002/adma.201001068>.
- [48] A.C. Ferrari *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* 8 (2013) 235–246. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.46>.
- [49] H. Wang *et al.*, *J. Raman Spectrosc.* 40 (2009) 1791–1796. <https://doi.org/10.1002/jrs.2321>.
- [50] J.T. Robinson *et al.*, *Nano Lett.* 8 (2008) 3137–3140. <https://doi.org/10.1021/nl8013007>.
- [51] M. Pumera, *Mater. Today*. 14 (2011) 308–315. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70160-2](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70160-2).

- [52] Y. Chyan *et al.*, ACS Nano. 12 (2018) 2176–2183. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08539>.
- [53] J. Lin *et al.*, Nat. Commun. 5 (2014) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6714>.
- [54] S.P. Singh *et al.*, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 38–47.
- [55] C. Fenzl *et al.*, ACS Sensors. 2 (2017) 616–620. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00066>.
- [56] A.B. Djurišić *et al.*, Small. 2 (2006) 944–961. <https://doi.org/10.1002/smll.200600134>.
- [57] C.F. Klingshirn *et al.*, Springer Berlin Heidelberg, (2010) 1-359.
- [58] Ü. Özgür *et al.*, J. Appl. Phys. 98 (2005) 1–103. <https://doi.org/10.1063/1.1992666>.
- [59] J. Serrano *et al.*, Phys. Status Solidi. 244 (2007) 1478–1482. <https://doi.org/10.1002/pssb.200675145>.
- [60] J.G. Solé *et al.*, John Wiley & Sons, Ltd, (2005) 1-283. <https://doi.org/10.1002/0470016043>.
- [61] P. Erhart *et al.*, Phys. Rev. B. 73 (2006) 1–9. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.73.205203>.
- [62] J. Rodrigues *et al.*, Mater. Sci. Eng. B. 195 (2015) 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2015.01.009>.
- [63] J. Rodrigues *et al.*, Acta Mater. 60 (2012) 5143–5150. <https://doi.org/10.1016/j.actamat.2012.06.005>.
- [64] O. Lupan *et al.*, ACS Appl. Mater. Interfaces. 9 (2017) 84–99. <https://doi.org/10.1021/acsmi.6b11337>.
- [65] V. Postica *et al.*, Adv. Funct. Mater. 27 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.1002/adfm.201604676>.
- [66] M. Tak *et al.*, J. Mater. Chem. B. 1 (2013) 6392–6401. <https://doi.org/10.1039/c3tb20935k>.
- [67] Y. Zhao *et al.*, Sci. Rep. 6 (2016) 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep32327>.
- [68] Y.H. Ko *et al.*, Nanoscale Res. Lett. 7 (2012) 13. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-13>.
- [69] D. Eder, Chem. Rev. 110 (2010) 1348–1385. <https://doi.org/10.1021/cr800433k>.
- [70] S. Luo *et al.*, Carbon N. Y. 96 (2016) 522–531. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.09.076>.
- [71] L.X. Duy *et al.*, Carbon N. Y. 126 (2018) 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.10.036>.
- [72] Y. Li *et al.*, Adv. Mater. 29 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.1002/adma.201700496>.
- [73] <https://imagej.net> (accessed October 30, 2019).
- [74] Z.W. Li *et al.*, Surf. Coatings Technol. 198 (2005) 319–323.
- [75] W.P. Brown *et al.*, J. Appl. Polym. Sci. 22 (1978) 1459–1468.
- [76] G.S. Gardner *et al.*, Ind. Eng. Chem. 29 (1937) 179–181. <https://doi.org/10.1021/ie50326a014>.
- [77] <http://www.abc.chemistry.bsu.by/vi/analyser/> (accessed July 15, 2019).
- [78] P. Hawkes *et al.*, Springer New York, (2007) 1-1338. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-49762-4>.
- [79] J. Rodrigues, Tese de doutoramento, Universidade de Aveiro, (2015) 1-355.
- [80] R.S. Das *et al.*, Vib. Spectrosc. 57 (2011) 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2011.08.003>.
- [81] D.K. Schroder, John Wiley & Sons, Inc., (2005) 1-790. <https://doi.org/10.1002/0471749095>.
- [82] M. Fox, (1958) 245-286. <https://doi.org/10.1007/BF02751482>.
- [83] P.Y. Yu *et al.*, Springer Berlin Heidelberg, (2010) 1-793. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00710-1>.
- [84] H. Beyenal *et al.*, John Wiley Sons, Inc. 112 (2015) 1–394. <https://doi.org/10.1002/9781119097426>.
- [85] J.S. Daniels *et al.*, Electroanalysis. 19 (2007) 1239–1257. <https://doi.org/10.1002/elan.200603855>.
- [86] B.-Y. Chang *et al.*, Annu. Rev. Anal. Chem. 3 (2010) 207–229.
- [87] J. Rodrigues *et al.*, Nanoscale Adv. 1 (2019) 1–17. <https://doi.org/10.1039/C8NA00391B>.
- [88] A.C. Ferrari *et al.*, Phys. Rev. Lett. 97 (2006) 1-4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401>.
- [89] A.F. Kohan *et al.*, Phys. Rev. B. 61 (2000) 15019–15027. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.61.15019>.
- [90] A.B. Djurišić *et al.*, Nanotechnology. 18 (2007) 1-8. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/9/095702>.
- [91] J. Rodrigues *et al.*, Phys. Status Solidi. 215 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1002/pssa.201800155>.
- [92] J. Rodrigues *et al.*, Nanoscale Adv. 1 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1039/C8NA00296G>.
- [93] A.B. Djurišić *et al.*, Appl. Phys. Lett. 88 (2006) 103107. <https://doi.org/10.1063/1.2182096>.
- [94] J. Rodrigues *et al.*, CrystEngComm. 21 (2019) 1071–1090. <https://doi.org/10.1039/C8CE01773E>.
- [95] M. Saranya *et al.*, J. Sci. Adv. Mater. Devices. 1 (2016) 1–22.
- [96] A.J. Bard *et al.*, John Wiley Sons, Inc. (2001) 1-850.
- [97] <https://www.biocompare.com/21239-PBS-Dry/1799862-Phosphate-Buffered-Saline-Tablets/#companyinfo> (accessed September 20, 2019).
- [98] A. Ghule *et al.*, Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 59 (2003) 1529–1539.
- [99] G. Lu *et al.*, Mater. Sci. Eng. B. 116 (2005) 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2004.09.010>.
- [100] D. Shakhvorostov *et al.*, J. Chem. Phys. 128 (2008) 1-10. <https://doi.org/10.1063/1.2837809>.