



DESENVOLVIMENTO DE UM ELETRODO APLICADO AO BIOCENSO DO NARIZ ELETRÔNICO VIA TÉCNICA DE PLASMA

R.K. Hayashi^{1,3}, P.S. de P. Herrmann-Júnior², F.M. Araujo-Moreira^{1,3}, L.A. Colnago³

(1) Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, Rodovia Washington Luís km 235, 13565-905, São Carlos, SP,

RKHayashi@sabo.com.br, faraujo@df.ufscar.br

(2) Embrapa Labex Europa, Institute of Bio-Goescience 2, 52428, Jülich, Alemanha, p.herrmann@fz-juelich.de

(3) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Rua XV de novembro 1452, 13560-970, São Carlos, SP,
luiz.colnago@embrapa.br

Resumo: Um dos vários desafios da biotecnologia está relacionado a desenvolver sensores e/ou biossensores que sejam sensíveis, reprodutíveis, repetíveis e, em algumas de suas aplicações, serem baratos e descartáveis para monitorar o amadurecimento de frutas. O biossensor em estudo é um dispositivo especial para detectar e medir uma quantidade muito pequena de odor. O modelo atual de construção do biossensor utiliza um filme transparente de politereftalato de etileno (PET) ou papel vegetal, impresso um eletrodo de grafite (geometria de grade) e recoberto com um filme condutor de polianilina (PANI) no estado de oxidação esmeraldina, dopado com ácido clorídrico (HCl). Nesse trabalho é apresentada uma nova solução para produzir um biossensor barato e descartável. A técnica escolhida é a técnica de plasma, visto ser o plasma uma tecnologia inovadora que pode ser usada em diferentes aplicações nas quais mudanças superficiais são as características fundamentais para obter a resposta desejada. A tecnologia de plasma permite diversas modificações superficiais como: limpeza, funcionalização, decapagem e revestimento superficial que será utilizado para desenvolver o novo biossensor a ser aplicado no nariz eletrônico.

Palavras-chave: biossensor, barato e descartável, eletrodo de grade, técnica de plasma, nariz eletrônico.

PLASMA TECHNIQUE FOR DEVELOPMENT OF ELECTRODE APPLIED TO E-NOSE'S BIOSSENSOR

Abstract: One of the many challenges of biotechnology is related to develop sensors and/or biosensor sensitive, reproducible, repeatable on some applications, cheap and disposable to monitoring fruit ripeness. Biosensor proposed is a special device for detecting and measuring very small quantities of odor. The current model to produce biosensor is made of polyethylene terephthalate (PET) film or vegetal paper substrate with a graphite electrode printed in a special template line patterning and coated with conducting polyaniline (PANI) film with oxidation state of emeraldine doped with chloridric acid (HCl). This paper presents a new technique to manufacture a cheap and disposable biosensor. The plasma technique was adopted for this development because the plasma technique is a novel technology to change surface properties. Plasma technology offers several solutions as cleaning, activation, etching and coating that could be applied for the development of new e-nose biosensors.

Keywords: biossensor, disposable biosensor; cheap biosensor, line patterning electrode, plasma technique, e-nose.

1. Introdução

O nariz eletrônico é utilizado para medir compostos voláteis que interferem no aroma/odor. O aroma é devido a dezenas ou centenas de substâncias voláteis, representantes de várias classes químicas, com diferentes propriedades físico-químicas. O primeiro sistema de multi-sensores designado para análise de aromas, o nariz eletrônico, foi introduzido no começo da década de 80 e desenvolvido há duas décadas. O *e-nose* foi inspirado pelo sistema biológico olfatório, compreendendo receptores não específicos (sensores) e uma rede neural para processamento dos dados. O objeto da pesquisa é o desenvolvimento destes receptores sensíveis a voláteis também conhecidos como biossensores que nada mais são dispositivos para detectar e medir quantidades muito pequenas, ou alterações, em uma substância química (HERRMANN Jr. et al., 2007; PALLÁS-ARENENY et al., 2000; FRA-DEN, 2003; COOPER et al., 2004). Uma das oportunidades de aplicação do nariz eletrônico é o monitoramento do amadurecimento das frutas, tanto no processo de produção como durante o seu armazenamento para aumentar e garantir a qualidade do produto (GÓMES et al., 2008; PATHANGE et al., 2006).

Um desafio da biotecnologia é desenvolver um biossensor barato e descartável a ser utilizado no reconhecimento do estado de maturação das frutas. As principais tecnologias utilizadas para o reconhecimento de odores são: espectrometria no infravermelho; cromatografia gasosa e espectrometria de massa, que apesar de eficazes, são de alto custo. Os biossensores discretos de estado sólido são os mais baratos. Um exemplo é um aparato simples de grade condutiva dopada com um filme sensível bioquimicamente, como por exemplo, um polímero condutor

construído sobre um substrato comum no mercado e de baixo custo, como o papel vegetal ou filme de transparência (HERRMANN Jr. et al., 2006; STEFFENS et al., 2009).

Para o desenvolvimento de um biossensor é importante entender o princípio de amadurecimento das frutas: receptores especiais nas células vegetais se prendem ao etileno. Os primeiros genes vegetais conhecidos e envolvidos nesse processo, ETR1 e CTR1, foram identificados em 1993. Eles impedem a ativação dos genes da maturação até que o etileno seja produzido via oxidação dos lipídeos e, quando isso acontece, o ETR1 e o CTR1 se inativam, o que provoca uma reação em cascata que finalmente prende outros genes que produzem várias enzimas: pectinase, para quebrar as paredes celulares e tornar a fruta mais macia, amilase para converter carboidratos em açúcares simples tornando a fruta mais doce e hidrolase, para reduzir a quantidade de clorofila da fruta, mudando sua cor (KENDRICK, 2012).

O presente trabalho propõe um método alternativo para produção de biossensores baratos e descartáveis. Para compô-lo, foi escolhida a técnica de plasma, que pode ser usada em diferentes aplicações onde as mudanças superficiais são características fundamentais para obter-se a resposta desejada. A tecnologia de plasma permite diversas modificações superficiais como: limpeza, funcionalização, decapagem e revestimento superficial (D'AGOSTINO, 1990).

A física de superfície, por intermédio da utilização das técnicas de plasma vem se mostrando promissora em função das novas propriedades obtidas da superfície do material (HASUDA, 1995). É sabido que qualquer substância pode existir em três estados: sólido, líquido e gasoso, cujo exemplo clássico é a água que pode ser gelo, líquido e vapor. Plasma é um estado físico completamente distinto que manifesta todo um conjunto de propriedades importantes e mesmo extraordinárias. Diferentemente dos demais estados da matéria, sólido, líquido e gasoso, a matéria no estado de plasma, nada mais é que um gás ionizado constituído de elétrons livres, íons e átomos neutros, em proporções variadas e que apresenta um comportamento coletivo. Dentre as várias técnicas de modificação superficial via plasma, vamos pesquisar o revestimento *sputtering* para o desenvolvimento do eletrodo e a funcionalização *etching* para a dopagem do biossensor.

- Plasma *sputtering*: Método de deposição de filmes baseado na erosão de um material pelo ataque de espécies do plasma.
- Plasma *etching* or PECVD “Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition”: Exige o estabelecimento de plasmas a partir de compostos orgânicos / inorgânicos ou metálicos. Amostra é embebida no plasma - todas as superfícies são tratadas simultaneamente.

2. Materiais e Métodos

O método adotado foi o hipotético-dedutivo. Os seguintes materiais e procedimentos foram utilizados para esse experimento:

2.1. Delineamento experimental

Tabela 1. Comparativo das condições de regulação equipamento de plasma *sputtering* x *etching*.

Variáveis:	Condições:	
	Plasma <i>Sputtering</i> Edward	Plasma <i>Etching</i> Diener
Potência	50W - 90W eletrodo superior	150W eletrodo inferior
Tensão / Frequência	600V / 60Hz	800V / 13,56MHz
Tempo	10 - 60 minutos	90 minutos
Pressão fundo	$0,13 \times 10^{-3}$ Bar	$1,5 \times 10^{-2}$ Torr
Pressão diferencial	N/A	$6,5 \times 10^{-2}$ Torr
Alvo	lâmina de ouro 0,5mm	pastilha de PANI
Gás precursor	atmosférico	nitrogênio
Distância eletrodos	25 - 50mm	50mm

Para o desenvolvimento das trilhas do biossensor foi utilizado o equipamento de plasma *sputtering* da empresa Edwards com Câmara de 2,5 litros (Figura 1a) e o equipamento de plasma *etching* Diener com câmara de 8 litros (Figura 1b) para o desenvolvimento do filme fino de PANI.

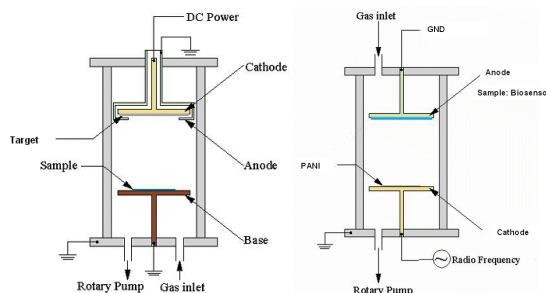


Figura 1. Esquema da câmara de plasma *sputtering* (esquerda) e *etching* PECVD (direita).

3. Resultados e Discussão

Podemos dividir a parte experimental da pesquisa do biossensor em dois blocos:

- Desenvolvimento do eletrodo via plasma *sputtering*;
- Desenvolvimento filme fino de PANI via plasma *etching*.

3.1. Desenvolvimento do eletrodo via plasma *sputtering*

A técnica de *sputtering* apresentou um resultado como solução alternativa de fabricação dos eletrodos *interdigitated*:

- A primeira etapa do desenvolvimento constituiu na deposição de um filme fino de ouro sobre o substrato de PET liso. Foi depositada uma camada uniforme de filme e com este resultado preliminar positivo foi dado prosseguimento ao estudo.

- A segunda etapa do desenvolvimento foi construir uma máscara com a gravura de um eletrodo com 16 dentes (Figura 2a). Foi utilizada uma chapa de aço inox com 2,0mm de espessura e o processo de usinagem adotado foi eletroerosão a fio, em função da espessura muito fina da trilha de 0,30mm.

- A terceira etapa do desenvolvimento foi a definição dos parâmetros do Plasma *sputtering*. A melhor opção foi 80W de potência com distância de 50mm entre os eletrodos do plasma. Foram testados diferentes tempos de exposição de plasma utilizando-se 4 (quatro) máscaras simultâneas entre 10 minutos e 60 minutos (Figura 2b). Com 10 minutos iniciou a formação da trilha e com 60 minutos apresentou uma trilha bem evidenciada. Foi adotado o tempo de 45 minutos como base para os estudos. Demais parâmetros vide tabela 1 acima.

- A quarta etapa do desenvolvimento foi a validação do eletrodo. O primeiro critério de falha foi a resistividade maior de 40M Ohms entre os terminais da grade (eletrodo) em circuito aberto e uma resistividade menor de 1M Ohm para 25mm do comprimento da trilha. Quanto à resistividade em circuito aberto, todas as amostras testadas foram aprovadas. No tocante à resistividade da trilha, a grade produzida via plasma utilizando-se o alvo de ouro foi superior à grade produzida em grafite em função da sua condutividade.

- A quinta etapa do desenvolvimento foi a caracterização da trilha. Foi utilizado o equipamento *Atomic Force Microscopy* (AFM) para avaliar o aspecto da superfície e a espessura da camada. Conforme figura 2c, podemos avaliar que existe uma definição bem evidente entre a formação da trilha e o substrato de PET. Quanto à camada de deposição da trilha ficou na ordem de 600nm. Esta camada está diretamente ligada ao tempo de exposição do plasma *sputtering*.

- A sexta etapa do desenvolvimento foi avaliar o desempenho funcional da trilha produzida via plasma *sputtering*. Para tal, foi utilizado o mesmo processo de dopagem do biossensor desenvolvido para o nariz eletrônico da Embrapa, a polimerização *in-situ* pelo processo de *self-assembly* PANI/HCl 1,0 molar. Os testes comparativos entre os eletrodos de grafite padrão e eletrodo de ouro via plasma *sputtering* apresentaram resultados similares no tocante à resposta no nariz eletrônico.

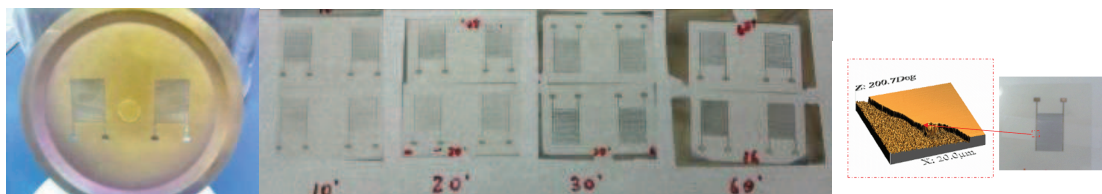


Figura 2. (a) Máscara de 2 mm espessura em aço inox com gravura usinada, (b) Impressão da grade via *sputtering* versus tempo, (c) resultado da medição da espessura do filme do eletrodo via técnica AFM.

Resultados: Foi obtido bons resultados para a formação dos eletrodos via técnica de plasma *sputtering* com a utilização de uma máscara com gravura do eletrodo (padrão nariz eletrônico da Embrapa Instrumentação: 29x15,5x0,30mm com 16 dentes).

3.2. Desenvolvimento filme fino de PANI via plasma *etching*

No processo de plasma *etching*, é aplicado energia elétron-volt para dissociar a molécula de PANI (catodo) e posteriormente a polimerização da PANI à superfície do substrato de PET (anodo) conforme esquema simplificado figura 1b. Na figura 03, foi apresentado o mapa de energia necessária para a dissociação da Polianilina.

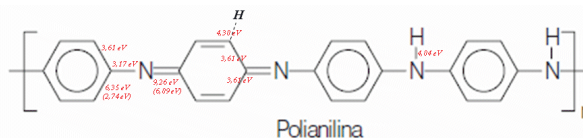


Figura 3. Energia necessária para a dissociação da polianilina em elétron-volt.

- A primeira etapa do desenvolvimento foi ajustar o aparato do equipamento de plasma para podermos bombardear a pastilha de PANI via catodo (pulverização) visando à dissociação da molécula de PANI e posterior formação de filme fino no anodo utilizando gás precursor nitrogênio (figura 4a). Os terminais do biossensor foram protegidos (destacado círculo azul - figura 4b) para evitar mau contato com os soquetes do nariz eletrônico.



Figura 4. (a) Montagem do aparato do equipamento de plasma com o biossensor acoplado na parte superior anodo, (b) Detalhe do filme de PANI - superfície esbranquiçada sobre o biossensor.

- A segunda etapa do desenvolvimento foi ajustar os parâmetros de processo para dissociar a molécula de PANI. Com radio frequência 13,56 MHz, potência de 150W e pressão de $6,5 \times 10^{-2}$ Torr, foi possível criar o plasma e quebrar a molécula de PANI conforme figura 3b. Demais parâmetros do equipamento de plasma vide tabela 01 acima.

- A terceira etapa do desenvolvimento foi a dopagem com HCl 1,0 molar para ativar a PANI na forma esmeraldina. Neste teste, foi possível detectar a presença de filme fino de PANI sobre os eletrodos, contudo não na configuração esmeraldina. O critério de falha adotado foi a resistividade entre os terminais do biossensor. Os valores encontrados foram acima de 40Mohms.

- A quarta etapa do desenvolvimento seria a avaliação do desempenho do biossensor no nariz eletrônico, contudo com o resultado não positivo até o momento, esta etapa não foi realizada.

Resultados Obtidos: Houve a polimerização de filme fino de PANI sobre o eletrodo do biossensor, contudo não apresentou condutividade após a dopagem com HCl 1,0 molar.

4. Conclusões

A técnica de plasma via *sputtering* para a preparação do eletrodo mostrou uma solução alternativa, contudo a técnica de plasma via *etching* para a polimerização do filme fino de PANI não apresentou bons resultados. No processo de plasma, é aplicado um campo elétrico dentro da câmara para dissociar a molécula de PANI e posteriormente a polimerização da mesma na superfície do substrato de PET. Neste método, após a dissociação da PANI via processo de plasma ainda não foi possível reverter à molécula da PANI a estrutura esmeraldina.

Agradecimentos

A Embrapa Instrumentação por ter me acolhido como um doutorando no desenvolvimento de um biossensor. A UFSCar pela oportunidade de participar do PPG-Biotec e a Sabó por me dar condições para me dedicar a este empreendimento.

Referências

- COOPER, J.; CASS, T.; Biosensors a Practical Approach, London: Oxford University Press, Cap. 3, 2004, 240p.
- D'AGOSTINO, R.; Plasma Deposition Treatment and Etching of Polymers, USA, Academic Press, 1990, 429 p.
- FRADEN; J.; Handbook of Modern Sensors Physics, Designs and Applications, California: AIP Press, Cap. 18, 2003. 589p.
- GÓMEZ, A.H.; WANG, J.; HU, G.; PEREIRA, A.G.; Monitoring storage shelf life of tomato using electronic nose technique. Journal of Food Engineering, Essex, v. 85, p. 625-631, 2008.
- HASUDA, H.; Plasma Polymerization, USA, Academic Press, 1995, 432p.
- HERRMANN JR., P.S.P.; VENANCIO, E.C.; MATTOSO, L.H.C.; MACDIARMID, A.G.; Aplicação da técnica de formação de trilhas com grafite e polímeros, nanofibras, e oligômeros condutores para obtenção de sensores descartáveis. São Carlos, Embrapa Instrumentação, p.29, 2006.
- HERRMANN, JR., P.S.P.; FRANCO, H.J.A.; GARCIA, A.H.S.; TORRE NETO, A.; RABELLO, L.M., CRUVINEL, P.E.; Sistema eletrônico para leitura e aquisição de dados de sensores descartáveis, aplicáveis à detecção de voláteis, desenvolvido com filmes finos de poli-anilinas condutoras. São Carlos, Embrapa Instrumentação, 2007, 3p.
- KENDRICK, M., Como as frutas ficam maduras, Scientific American Brasil, Editora Segmento, 2012.
- PALLÀS-ARENÝ; R.; WEBSTER; J.G.; Sensors and Signal Conditioning, Canada: A Wiley-Interscience Publication, Cap. 1, 2, 4, 6 e 9, 2000, 587p.
- PATHANGE, L.P.; MALLIKARJUNAN, P.; MARINI, R.P.; O'KEEFE, S.; VAUGHAN, D.; Non-destructive evaluation of apple maturity using an electronic nose system. Journal of Food Engineering, Essex, v. 77, p. 1019-1023, 2006.
- STEFFENS,C.; MANZOLI, A.; FRANCHESCHI, E.; CORAZZA, M.L., CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, J.V.; HERRMANN JR.; P.S.P., Low cost sensors developed on paper patterning with graphite and polyaniline coating with supercritical CO₂. Synthetic Material, Lausanne, v. 159, n. 21-22, p. 2329-2332, 2009.