**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

FABRÍCIO APARECIDO DOS SANTOS

**Caracterização de grafeno quimicamente esfoliado para aplicações em
nanomedicina**

São Carlos
2017

FABRÍCIO APARECIDO DOS SANTOS

**Caracterização de grafeno quimicamente esfoliado para aplicações em
nanomedicina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto
Coorientador: Prof. Dr. Bruno C. Janegitz

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Fabrício Aparecido dos
Caracterização de grafeno quimicamente esfoliado para aplicações em nanomedicina / Fabrício Aparecido dos Santos; orientador Valtencir Zucolotto - versão corrigida -- São Carlos, 2017.
141 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. RGO. 2. Grafeno. 3. Biossensor. 4. Fototerapia.
5. FET. I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

A minha mãe, que tanto lutou por mim.

A Maria Clara meu maior presente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Aparecida, mãe e batalhadora, que lutou para me educar e estar aqui hoje defendendo esta Tese. A minha família, Fábio meu pai e irmãos Iole e Fabiano, que são os pilares da minha vida, a Maria Clara minha filha e meu anjo.

Ao professor Valtencir Zucolotto, pela orientação e amizade nesses sete anos de convivência.

Ao meu coorientador e grande amigo Bruno Janegitz, pelo apoio e as boas conversas.

Ao Nirton pela amizade e a grande ajuda nas discussões.

A Dona Valentina e Seu Sergio, minha segunda família e de quem jamais esquecerei.

Aos alunos de iniciação científica, Victor Rabesquine e Catarina Batista, pela ajuda e aprendizado.

A Mônica, que no momento mais complicado da minha vida me apoiou e não deixou cair.

Aos amigos do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, pelas risadas, horas de almoço, churrascos, conversas, congressos: Camilo, Valéria, Ju, Camila B, Laís B, Laís R, Thiers, Olavo, Henrique, Jaqueline, Cris, Paula, Adris, Fran, Ieda, Isa, Abilene.

Aos amigos ex-membros deste grupo e que já partiram para uma nova jornada, Rodrigo, Wagner, Jaciara, Lilian, Edson, Denise, Leo, Idelma, Lorena.

Ao técnico e secretarias, Romeu, Ju, Jacke e Flávia.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela excelente infraestrutura, funcionários, professores.

A CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Laboratório de Microfabricação(LMF/LNNano), pela ajuda na fabricação dos eletrodos interdigitados e medidas de XPS.

Aos meus amigos e irmãos da república Aquarius, que sempre estiveram comigo e vão estar comigo sempre e em todo lugar, não importa onde estiver. *“Doutor meu coração é aquariano”*.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

"É impossível para um homem aprender o que ele acha que já sabe"

Epicteto

RESUMO

SANTOS, F. A. **Caracterização de grafeno quimicamente esfoliado para aplicações em nanomedicina.** 2017.141p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

Esta tese descreve a esfoliação e modificação do grafeno oxidado (GO) na obtenção de grafeno em sua forma reduzida (RGO) para aplicações biomédicas, que envolve sensoriamento e biossensoriamento, além de aplicação em fototerapia. Nas aplicações em sensores, inicialmente o RGO juntamente com o surfactante aniônico Dihexadecilfosfato (DHP), foi utilizado na fabricação de filmes por *drop casting* em eletrodo de carbono vítreo (CGE), na detecção do hormônio Estradiol. O eletrodo modificado (RGO-DHP/CGE) foi caracterizado por voltametria cíclica e impedância de espectroscopia eletroquímica. Os resultados mostraram uma corrente de pico de oxidação irreversível em 0,6 V. Sob as condições experimentais ideais, usando a voltametria linear, o limite de detecção para este hormônio foi de $7,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Foram fabricados também dispositivos de efeito de campo (FET) de RGO via porta líquida em eletrodos interdigitados, para a detecção de Cistatina-C, um marcador de doença renal crônica. Os filmes foram fabricados utilizando a técnica de automontagem de interação eletrostática, nos quais, como polieletrólito de carga positiva foi utilizado o RGO modificado via ligação covalente de APTES, e como polieletrólito de carga negativa, o RGO dopado com nitrogênio, através da redução via micro-ondas. Estes dispositivos apresentaram uma sensibilidade de $(1,94 \pm 0,29) \Delta I_{DS}(\%) \text{ ngmL}^{-1}$. O LD foi de $0,39 \text{ ngmL}^{-1}$ e a região linear entre $5 \text{ ngmL}^{-1} - 100 \text{ ngmL}^{-1}$, quando utilizados em urina sintética. Avaliamos também o uso de RGO em sistemas de fototerapia, utilizando GO reduzido com NH_4OH na presença de L-Glutamina (RGO-Glu), onde observamos um aumento de temperatura localizado quando o material é irradiado por um laser (808 nm). Este sistema apresentou uma boa estabilidade e baixa agregação em dispersão aquosa e em meio de cultura, devido à formação de uma corona proteica. O RGO-Glu mostrou-se mais eficiente para o aquecimento que o RGO sem a modificação, na absorção do laser em 808 nm, com valores de eficiência de conversão de energia de 63% e 50% respectivamente. Estudos utilizando célula HeLa mostram que a internalização do RGO-Glu foi mais eficiente do que o RGO sem a modificação. Estes estudos mostram a versatilidade do grafeno quimicamente esfoliado em aplicações biomédicas quando convenientemente modificado, que pode ser utilizado em diagnóstico e em terapia.

Palavras-chave: RGO. Grafeno. Biossensor. Fototerapia. FET.

ABSTRACT

SANTOS, F. A. **Characterization of chemically exfoliated graphene for nanomedicine applications.** 2017. 141p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

This thesis describes the exfoliation and modification of graphene oxide (GO) to obtain reduced graphene oxide (RGO), for biomedical applications, namely: (bio)sensing for diagnostics and as active material in phototherapy. For (bio)sensing applications, RGO was used in combination with the anionic surfactant Dihexadecylphosphate (DHP) in the fabrication of drop-cast thin films onto carbon glass electrode (CGE), to be used in the detection of the hormone Estradiol. The modified electrode (RGO-DHP/CGE) was characterized by cyclic voltammetry and electrochemical spectroscopy impedance (EIS). The results showed an irreversible oxidation peak current at 0.6 V. Under ideal experimental conditions, and using linear voltammetry, the detection limit obtained for this sensor was $7.7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. In the second part of the study, RGO was used in the fabrication of field effect transistors (FETs) via liquid gate, and the devices were applied in the detection of Cystatin-C, a biomarker for chronic renal disease. The films were made using the electrostatic layer-by-layer technique, in which APTES-modified RGO was used as positive polyelectrolyte, whereas nitrogen-doped RGO was used as the negative species. These devices exhibited a sensitivity of $(1,94 \pm 0,29) \Delta I_{DS}(\%) \text{ ng.mL}^{-1}$, whereas LD was $0,39 \text{ ng.mL}^{-1}$ and the linear region of detection was between $5 \text{ ng.mL}^{-1} - 100 \text{ ngmL}^{-1}$ when used in synthetic urine. The studies on the use of RGO in phototherapy were carried out using NH_4OH -reduced GO in the presence of L-Glutamine (RGO-Glu) for subsequent cell internalization and irradiation under an 808 nm laser line to promote hyperthermia. This system showed good stability and low aggregation in aqueous dispersions and culture medium, due to the formation of a protein corona. RGO-Glu was more efficient than the RGO without the modification in the absorption of the laser at 808 nm, resulting in an efficiency of heat generation (energy conversion efficiency) of 63% and 50% respectively. Cytotoxicity studies using HeLa cell lines revealed that the internalization of RGO-Glu was more efficient than RGO without modification. These studies show the versatility of chemically exfoliated graphene oxides for biomedical applications, including diagnosis and therapy.

Keywords: RGO. Graphene. Biosensor. Phototherapy. FET.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura hexagonal do grafeno, com as células unitárias A e B, b) primeira zona de Brillouin, onde os cones de Dirac estão localizados no pontos K e K', c) Estrutura de bandas em três dimensões para o grafeno, d) Zoom na região K e K' onde se toca as bandas de valência e condução formando o cone de Dirac.	34
Figura 3.2 - Microscopia ótica de uma amostra de grafeno mecanicamente esfoliado, dentro do círculo a imagem de uma folha.....	35
Figura 3.3 - Esquema básico de um: a) MOSFET e seus principais componentes, dreno (D), fonte (S), porta (G), para um FET do tipo NPN. B) Esquema básico de um transistor de grafeno GFET do tipo <i>back-gate</i>	40
Figura 3.4 - Esboço de uma curva de transferência ideal para um GFET, as setas indicam o preenchimento das bandas (cor azul), ora na região de condução por buracos, ora na região de condução por elétrons.	41
Figura 3.5 - Design de um biossensor, e seus principais componentes, analito (o que se mede), receptor (reconhecimento do analito) e transdutor (transforma a informação dada pela interação analito-receptor em um sinal mensurável).	45
Figura 3.6 - Etapas de crescimento de um filme LBL, onde o processo se inicia com a adsorção da primeira camada seguida de lavagem, em seguida inicia o processo de adsorção da segunda camada e por último a limpeza desta, o processo se reinicia, quantas vezes for necessário.	48
Figura 3.7 - Efeitos causados nos tecidos em diferentes temperaturas.....	50
Figura 3.8 - Janela de absorção do visível ao infravermelho próximo, mostrando as regiões de máximo e mínimo de absorção para a Hemoglobina e a água.....	51
Figura 3.9 - Número de publicações com os termos “ <i>Photothermal Therapy</i> ” graphene extraídos do portal <i>Web of Science</i>	53
Figura 4.1 - Esquema dos eletrodos interdigitados e suas dimensões.	62
Figura 4.2 - Esquema do FET construído, com a identificação dos terminais, porta (G), dreno (D) e fonte (S).	62
Figura 5.1 - Esquema simplificado dos dois processos de redução, o primeiro para funcionalização e redução utilizando NaBH ₄ e APTES, e o segundo método utilizando dopagem com nitrogênio via redução na presença de Ureia em micro-ondas.....	68
Figura 5.2 - Espectros UV-Vis do RGO-SiNH ₂ (reduzido via NaBH ₄ após modificação com APTES) e do RGO-N, reduzido via micro-ondas na presença de Ureia.	69
Figura 5.3 - Espectros FT-IR para as amostras de GO, RGO-SiNH ₂ e APTES, com a identificação dos principais grupos presentes e a variações em cada amostra.....	70
Figura 5.4 - Espectros FT-IR para as amostras de RGO e RGO-N, com a identificação dos principais grupos presentes.	71
Figura 5.5 - Espectros de XPS no modo de varredura para as amostras a) GO, b) RGO-N e c) RGO-SiNH ₂ com a identificação dos principais picos.	72
Figura 5.6 - Espectros XPS de alta resolução para as amostras: a) GO, b) RGO-N, c) RGO-SiNH ₂	73

Figura 5.7 - Espectros XPS em alta resolução para os grupos N 1s presentes nas amostras: a) RGO-N, b) RGO-SiNH ₂ .	74
Figura 5.8 - Potencial Zeta para as amostras de GO, RGO-SiNH ₂ e RGO-N variando o valor de pH de 2,0 a 9,5.	75
Figura 5.9 - Estudo da influência do pH na adsorção dos filmes automontados, com monitoramento do crescimento via espectroscopia UV-Vis, onde em: a) Absorbância em 268 nm para o RGO-SiNH ₂ , b) Absorbância em 268 nm para o RGO-N.	76
Figura 5.10 - Curvas de adsorção utilizando microbalança de quartzo para as amostras a) GO-SiNH ₂ , b) RGO-N.	77
Figura 5.11 - Espectro UV-Vis dos filmes automontados: a) (RGO-SiNH ₂ /RGO-N) com a banda de absorção em 268 nm, onde os números indicam o sentido do crescimento das bicamadas, b) Dependência linear da absorção com o número de bicamadas medido no comprimento de onda de 268 nm.	78
Figura 5.12 - Estudo da influência do tempo de secagem dos filmes LBL, utilizando espectroscopia UV-Vis; a) Espectro para o tempo inicial sem secagem e após 3 horas, b) Para o comprimento de onda da absorção em 268 nm em função do tempo de secagem em 150 °C	79
Figura 5.13 - a) Variação da resistência em função do número de bicamadas, b) Comparação das resistências para filmes sem secagem e com secagem após 3 horas, c) Variação da resistência em função do número de camadas para um filme de 5 bicamadas sem secagem e seco, d) Distribuição gaussiana de 45 eletrodos.	80
Figura 5.14 - AFM para os filmes de a) 1 bicamada, b) 3 bicamadas, c) 5 bicamadas: onde a esquerda é vista a superfície topográfica e a direita temos uma visão tridimensional dos filmes.	82
Figura 5.15 - a) Curva de transferência para os filmes de (RGO-SiNH ₂ /RGO-N) ₅ e (RGO-SiNH ₂ /RGO(NaBH ₄)) ₅ com a corrente I _{DS} normalizada, b) Curva de transcondutância para os dois dispositivos em estudo.	83
Figura 5.16 - a) Curva de transferência com variação do eletrodo de referência na porta, b) esquema da formação da dupla camada e comprimento de Debye na porta do dispositivo.	85
Figura 5.17 - a) Curva de transferência para o filme de 1 bicamada em função de V _{DS} : 0,01, 0,02 e 0,03 V, b) filme de 3 bicamadas, c) filme de 5 bicamadas, d) Curva de saída para os 3 filmes com V _{GS} : 0,05 V	86
Figura 5.18 - a) Corrente de fuga em função da força iônica, <i>inset</i> : zoom da região entre -0,2 à 0,2 V da tensão V _{GS} , b) curva de transferência em função da força iônica.	87
Figura 5.19 - a) Corrente de dreno para PBS 1,5 mM, 15 mM e 150 mM, em função do tempo, b) Corrente de dreno para PBS igual à 1,5 mM para tempo mais longos (3 horas).	88
Figura 5.20 - a) variação da tensão V _D em função da velocidade de varredura para diferentes forças iônicas, b) curva de transferência em função das velocidades de 0,4 Vs ⁻¹ , 0,1 Vs ⁻¹ e 0,01 Vs ⁻¹ .	89
Figura 5.21 - Variação da velocidade de varredura para 4 velocidades no sentido direto (seta azul) e sentido inverso (seta vermelha) com as velocidades de 0,4 Vs ⁻¹ , 0,2 Vs ⁻¹ , 0,04 Vs ⁻¹ e 0,02 Vs ⁻¹ .	90
Figura 5.22 - Curva de transferência para um filme sem imobilização e com um filme com papaína imobilizada.	92
Figura 5.23 - Curvas de transferências para a) 9 adições de tampão PBS 1,5 mM, b) Adição de 0,1 a 100 ngmL ⁻¹ de Cis-C: <i>inset</i> : Corrente I _{DS} em V _{GS} igual a -0,2 V em função da concentração.	92

Figura 5.24 - a) Curva de transferência para um filme com V_{DS} igual a 0,01 V em tampão PBS 1,5 mM, b) Curva de calibração do sistema.	93
Figura 5.25 - a) Curva de transferência normalizada variando a concentração em 0,1, 5 e 100 ng mL^{-1} , b) Curva de calibração para variação da tensão V_D em função da concentração com V_{DS} : 0,01 V.	94
Figura 5.26 - Variação da corrente I_{DS} em função do tempo para diferentes concentrações de Cis-C, a linha sombreada indica o desvio padrão do tampão PBS 1,5 mM.	95
Figura 5.27 - a) Curva de transferência normalizada variando a concentração em 0,1, a 100 ng mL^{-1} em urina sintética, b) Curva de calibração para variação da corrente I_{DS} normalizada em função da concentração com V_{DS} : 0,01 V.	96
Figura 5.28 - Esquema da preparação e aplicação do RGO-DHP/GCE.	97
Figura 5.29 - a) Redução do GO em função do tempo em diferentes concentrações de NaBH_4 . b) Espectro de absorção para GO e RGO.	98
Figura 5.30 - a) Voltamogramas obtidos com RGO-DHP/GCE (linha marrom), GO-DHP/GCE (linha preta) e GCE (inset) em 0,1 Vs^{-1} na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em 0,1 mol L^{-1} de KCl. b) Diagramas de Nyquist de RGO/DHP/GCE, GO/DHP/GCE e GCE na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução de 0,1 mol L^{-1} KCl com potencial de 0,22 V.	99
Figura 5.31 - a) Voltamogramas de RGO-DHP/GCE em 0,05 mol L^{-1} de PBS na ausência (linha laranja) e na presença (linha preta) de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ estradiol com velocidade de varredura de 0,1 Vs^{-1} , com tempo de acumulação de 120 segundos. Voltamogramas de GCE (inset) em 0,05 mol L^{-1} PBS (pH 7,0) na ausência e na presença de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ estradiol com velocidade de varredura de 0,1 Vs^{-1} , e tempo de acumulação de 120 segundos. b) Corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura ($\ln v$) na presença de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de Estradiol.	100
Figura 5.32 - a) Voltametria de varredura linear de RGO-DHP/GCE in 0,05 mol L^{-1} PBS na presença de $4,0 \times 10^{-7}$, $7,9 \times 10^{-7}$, $1,6 \times 10^{-6}$, $4,2 \times 10^{-6}$, $8,2 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de estradiol com tempo de acumulação de 240 segundos com velocidade de varredura de 0,15 Vs^{-1} . b) Curva analítica de RGO-DHP/GCE in 0,05 mol L^{-1}	101
Figura 6.1 - a) Deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima, em função do tempo. b) Espectros de absorção no UV-Vis, para o GO, 2 horas de reação e 8 horas.	106
Figura 6.2 - Espectro de XPS no modo de varredura para as amostras a) RGO. b) RGO-Glu e a identificação de seus principais picos.	106
Figura 6.3 - Espectros de alta resolução para: a) Banda C 1s para RGO-Glu, b) C 1s para RGO, c) Banda N 1s para RGO-Glu, b) C 1s para RGO, e) Banda O 1s para RGO-Glu, f) O 1s para RGO.	108
Figura 6.4 - Espectroscopia do Infravermelho: a) RGO. b) RGO-Glu. c) RGO-Glu sem dialise d) Glu.	110
Figura 6.5 - Histograma de tamanho das partículas sem ultrassom de ponta e depois de 3 e 6 horas de ultrassonicação.	111
Figura 6.6 - Imagens de AFM com $10 \times 10 \mu\text{m}$ de área de a) GO esfoliado quimicamente, b) GO após 6 horas no ultrassom de ponta, c) RGO-Glu d) RGO. Histogramas da distribuição de tamanho. e) GO, f) GO após 6 horas, g) RGO-Glu e h) RGO.	113
Figura 6.7 - Histograma da distribuição de alturas para: a) GO sem esfoliação mecânica. b) GO após 35 horas no ultrassom de ponteira. c) RGO-Glu. d) RGO.	114

Figura 6.8 - DLS de RGO-Glu em meio de cultura DMEM suplementado com SBF, no tempo inicial, após 6 e 24 horas de incubação nas mesmas condições em que são cultivadas as células, temperatura 37 °C com 5% CO ₂	115
Figura 6.9 - Potencial-Zeta em função do pH para RGO-NH ₃ , e RGO-Glu, onde a região destacada em azul corresponde a região de estabilidade do nanomaterial.	116
Figura 6.10 - Esquema experimental do sistema fototermal com seus componentes indicados na figura.	116
Figura 6.11 - a) Variação da temperatura em função da concentração de RGO e RGO-Glu, após 15 minutos de irradiação. b) Variação da temperatura em função da potência para uma concentração de 2 mgL ⁻¹	117
Figura 6.12 - a) Aumento da temperatura com o laser ligado/desligado em função do tempo. b) 5 ciclos de ligado e desligado em função do tempo nas mesmas condições descrita em a).	118
Figura 6.13 - Variação da temperatura em função do tempo, para diferentes concentrações de RGO-Glu, <i>inset</i> : variação de temperatura em função da concentração.	119
Figura 6.14 - a) Obtenção da constante de tempo para as amostras RGO e RGO-Glu, através do ajuste linear da curva de Tempo x ln(ΔT), b) Eficiência de conversão fototermal do RGO e RGO-Glu.	120
Figura 6.15 - Determinação do IC ₅₀ para as amostras a) RGO-Glu. b) RGO-NH ₃	121
Figura 6.16 - Variação da temperatura em função do tempo a) RGO-Glu. b) Variação da temperatura em função da concentração para RGO-Glu e RGO.	122
Figura 6.17 - Ensaio de viabilidade por teste de FDA do RGO-Glu após exposição de 24h em células Hela antes e após a irradiação. Os asteriscos indicam que houve diferença estatística significativa na concentração de 25 µgmL ⁻¹ antes vs 25 µgmL ⁻¹ após irradiação, e na concentração de 50 µgmL ⁻¹ antes vs 50 µgmL ⁻¹ após irradiação. Análises realizadas em triplicata de 3 experimentos independentes. *p<0.05, ANOVA Tukey teste, Graph Pad prism software.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Concentrações em % em massa de cada elemento encontrado nos nanomateriais sintetizados	72
Tabela 5.2 - Porcentagem da quantidade de ligações químicas para cada grupo ligado ao carbono.	73
Tabela 5.3 - Parâmetros utilizados no ajuste teórico da equação 10 para as curvas de cinética de adsorção dada pela microbalança.....	77
Tabela 5.4 - Rugosidade média (Ra) e rugosidade média Rq dos filmes de 1, 3 e 5 bicamadas.	81
Tabela 5.5 - Determinação de Estradiol em urina sintética	102
Tabela 6.1 - Porcentagem em massa para as amostras de RGO e RGO-Glu.....	107
Tabela 6.2 - Ligações presentes para C 1s, N 1s e O 1s, e porcentagem da área para RGO-Glu e RGO	109
Tabela 6.3-Eficiência de conversão fototermal do RGO-Glu comparado com outros nanomateriais encontrados na literatura.	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
APTES	3-aminopropiltrimetoxisilano
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CIS-C	Cistatina C
CVD	<i>Chemical Vapor Deposition</i>
DHP	Dihexadecilfosfato
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DRC	Doença renal crônica
DTPA	Etilenodiaminopentacético
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EIS	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>
FDA	<i>Fluorescein diacetate uptake test</i>
FET	<i>Field effect transistor</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GCE	<i>Glassy carbon electrode</i>
GFET	Transistor de Efeito de Campo de grafeno
GLU	L-Glutamina
GO	Grafeno oxidado
HOPG	<i>Highly Oriented Pyrolytic Graphite</i>
ISFET	<i>Ion Sensivity Field Effect Transistor</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LB	Langmuir–Blodgett (LB)
LBL	<i>Layer-by-Layer</i>
MOSFET	<i>Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor</i>
NIR	<i>Near Infrared</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
RF	Radiofrequência

RGO	<i>Reduced graphene oxide</i>
SDS	Dodecil sulfato de Sódio
TFG	Taxa de filtração glomerular
TJB	Transistor de junção bipolar
UV-VIS	Espectroscopia de absorção do ultravioleta visível
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>

LISTA DE SIMBOLOS

sp^1, sp^2, sp^3	Orbital molecular
a_1 e a_2	Vetores da célula unitária
b_1 e b_2	Vetores da rede recíproca
K e K'	Pontos de Dirac
$\hbar$	Constante de Planck
v_F	Velocidade de Fermi
c	Velocidade da luz
V_{DS}	Tensão de dreno fonte
I_{DS}	Corrente de dreno fonte
V_{GS}	Tensão de porta fonte
G_m	Transcondutância
W	Comprimento do canal do FET
L	Largura do canal do FET
V_D	Tensão de Dirac
C_G	Capacitância de porta
C_E	Capacitância do eletrólito
C_Q	Capacitância Quântica
ϵ_0	Permissividade do vácuo
ϵ_r	Permissividade relativa
n_G	concentração de portadores
n^*	portadores causadas por impurezas
V_T	Tensão de limiar
M	Massa
τ	Constante de tempo
R_a	Rugosidade média
R_q	Rugosidade média quadrática
λ_D	Comprimento de Debye
k	Constante de Boltzmann
N_A	Número de Avogadro
e	Carga elementar

I	Força iônica
c_i	Concentração do íon
Z_i	Carga elétrica
RT	Constante universal dos gases e temperatura respectivamente
η	Eficiência de transdução fotothermal
C_p	Capacidade térmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	31
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	33
3.1	Grafeno	33
3.2	Síntese de grafeno	35
3.2.1	Microesfoliação	35
3.2.2	Crescimento por deposição química em fase vapor	36
3.2.3	Crescimento epitaxial em Carbeto de Silício (SiC).....	36
3.2.4	Esfoliação química do grafite	36
3.2.5	Redução do GO	37
3.3	Transistor de Efeito de Campo de grafeno (GFET)	39
3.4	Eletrólito porta RGO-FET	42
3.5	Sensores e Biossensores	44
3.6	Filmes automontados por interação eletrostática	47
3.7	Terapia fototermal	49
3.7.1	Nanopartículas com indução de fotohipertemia	50
3.7.2	Grafeno como agente de indução de calor em terapia fototermal	52
4	EXPERIMENTAL	55
4.1	Reagentes.....	55
4.2	Síntese e esfoliação	55
4.2.1	Exfoliação química do grafite	55
4.2.2	Redução química do grafeno oxidado para aplicações em sensores	56
4.2.3	Funcionalização do RGO com APTES e redução química	56
4.2.4	Redução do GO via micro-ondas	57
4.2.5	Esfoliação mecânica do grafeno oxidado	58
4.2.6	Redução do GO na presença de L-Glutamina	58
4.2.7	Preparação da urina sintética	58
4.3	Técnicas de caracterização espectroscópicas	59
4.3.1	Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS)	59

4.3.2	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	59
4.3.3	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, XPS (do inglês, X-ray photoelectron spectroscopy)	59
4.4	Caracterização morfológica	60
4.4.1	Potencial-Zeta (ζ)	60
4.4.2	Microscopia de Força Atômica (AFM)	60
4.5	Ensaio elétrico e eletroquímico	61
4.5.1	Ensaio eletroquímico	61
4.5.2	Preparação do eletrodo de trabalho	61
4.5.3	Eletrodos interdigitados	61
4.5.4	Medidas elétricas e caracterização dos RGO-FET	62
4.5.5	Crescimento dos filmes LBL	63
4.6	Ensaio de absorção no infravermelho próximo	63
4.6.1	Cultura de células	64
4.6.2	Tratamento das culturas celulares com os nanomateriais	64
4.6.3	Viabilidade celular	65
5	IMOBILIZAÇÃO DE RGO EM ELETRODOS MODIFICADOS PARA APLICAÇÃO EM (BIO) SENSORES	67
5.1	Transistores de RGO-FET modificados com Papaína para detecção do biomarcador de insuficiência renal Cistatina-C	67
5.1.1	Caracterização espectroscópica	67
5.1.2	Caracterização dos filmes LBL	74
5.1.3	Caracterização do FET	82
5.1.4	Biossensor de Cis-C	90
5.2	Sensor eletroquímico para detecção de Estradiol	96
5.2.1	Caracterização da síntese de GO e RGO-DHP	97
5.2.2	Caracterização eletroquímica	98
5.2.3	Determinação de Estradiol usando eletrodos de RGO-DHP/GC	99
5.2.4	Estudo de interferentes	102
5.3	Conclusões parciais	102

6	GRAFENO QUIMICAMENTE REDUZIDO FUNCIONALIZADO COM L-GLUTAMINA PARA APLICAÇÕES EM TERAPIA FOTOTERMAL	105
6.1	Caracterização espectroscópica	105
6.2	Caracterização morfológica.....	111
6.3	Terapia fototermal e viabilidade celular.....	116
6.4	Conclusões parciais	123
7	CONCLUSÕES	125
	REFERENCIAS	127

1 INTRODUÇÃO

Nanociência e nanotecnologia são nomes de uma grande área no qual o principal produto de estudo são os nanomateriais. Estes podem ser compostos por materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Por definição, nanomaterial é um “material natural ou fabricado que contém partículas individuais ou em forma de agregado em que, 50% ou mais do número de partículas estejam em uma ou mais dimensões compreendidas entre 1 e 100 nm”.(1) Podem estar na forma de nanopartículas dispersas em um meio líquido ou na forma de filmes finos, e ainda como dispositivos com uma única nanopartícula.(2–4) Além disso podem ser classificados quanto à sua geometria (0, 1, 2 e 3 dimensões), o que confere diferentes propriedades mesmo quando são utilizados os mesmos elementos químicos, como o carbono, ouro, prata, entre outros. O que diferencia os nanomateriais são os efeitos de superfície, que são definidos pela razão entre área e volume, e os efeitos quânticos, quando se chega em dimensões tão pequenas, e que não são observados em micro e macro escala.(5)

A nanotecnologia desenvolveu-se para um estágio no qual é possível produzir e adaptar materiais nas mais diversas áreas, como eletrônica, energia, agroindústria, cosméticos e biomédicas. Neste último em especial, as propriedades dos nanomateriais podem ser utilizadas na engenharia de tecidos, com a reparação e criação celular, tecido ou órgãos,(6) na liberação controlada e seletiva de drogas,(7) onde pode também ser associada a terapia fotodinâmica, com o controle da liberação via excitação por fótons do visível ao infravermelho próximo.(8) Dentro das terapias, ainda podemos citar a hipertermia, onde o agente de inibição tumoral é o calor gerado localmente pelo nanomaterial quando estimulado por uma radiação não ionizante, como, luz na região do infravermelho, as radio frequências (RF), micro-ondas, ou ainda a junção de uma ou mais dessas fontes.(9–11) Deve-se mencionar ainda os sensores e biossensores, que são dispositivos feitos com o intuito de detectar os mais diversos analitos, que vão de pequenas moléculas, ácidos nucleicos, enzimas e antígenos, podendo também detectar diretamente células, bactérias e outros organismos.(12–16)

Dentro dessa grande área, os nanomateriais a base de carbono tem um grande destaque, devido a possibilidade de se obter estruturas nas mais diversas geometrias e ligações químicas (sp^1 , sp^2 , sp^3), o que muda significativamente as suas propriedades, podendo-se citar, os fulerenos (0D), nanotubos de carbonos (1D) e mais recentemente o grafeno (2D). Este último consiste de uma monocamada de átomos de carbono sp^2 dispostos em uma rede

cristalina hexagonal. Foi isolado e estudado pela primeira vez em 2004, e apesar de ser uma área de pesquisa ainda jovem, tem apresentado uma expansão significativa, tanto em termos de publicações científicas quanto em aplicações industriais.(17)

O que torna o grafeno tão atrativo são as suas propriedades únicas relacionadas à sua dimensionalidade, como as eletrônicas, óticas, mecânicas e térmicas.(18) Outro fator importante, se deve à facilidade de síntese e manipulação desse nanomaterial. O primeiro método descrito foi utilizando a clivagem dos planos cristalinos de um grafite pirolítico altamente orientado (HOPG, do inglês *Highly Oriented Pyrolytic Grafite*). (19) Por esse método é possível obter um grafeno com altíssima cristalinidade, mas pouco prático para produção em escala. Desta forma, novos métodos surgiram, como crescimento por deposição a vapor (CVD, do inglês *Chemical Vapor Deposition*), crescimento epitaxial em Carbetto de Silício (SiC), e esfoliação química do grafite.(20-22) Este último, devido ao custo e facilidade de modificação do grafeno, tem sido amplamente utilizado.

Uma das formas de se obter um grafeno quimicamente esfoliado é via oxidação do grafite, no qual o produto da esfoliação é o grafeno oxidado (GO),(23) que apresenta um comportamento diferente do grafeno cristalino obtido por outros métodos, tendo como principal característica a sua alta resistividade, devido à presença de grupos funcionais obtidos durante a esfoliação. No entanto, quando se reduz esses grupos, a condução é parcialmente restaurada aproximando assim o grafeno reduzido (RGO) do cristalino, o que o torna um bom nanomaterial em aplicações onde há necessidade de condução elétrica, como no caso dos biossensores eletroquímicos e aqueles que se baseiam em efeito de campo.(24-25)

Esta capacidade de manipulação do GO e RGO em nível molecular permite o seu uso na construção de filmes, como *casting*, *dip coating*, Langmuir–Blodgett (LB) e *layer-by-Layer* .(26-29) Este último é notório pela versatilidade de materiais que podem ser empregados, valendo-se do fenômeno de atração eletrostática de cargas opostas entre um substrato e uma solução, permitindo um controle preciso no crescimento de filmes finos. Além disso, o RGO apresenta excepcionais propriedades óticas, com uma ampla faixa de absorção, desde a região do espectro do ultravioleta, se estendendo até a faixa de micro-ondas, permitindo aplicações em liberação controlada de fármacos,(30) tratamento por terapia fotodinâmica (31) e terapia fototermal.(10)

RGO é um nanomaterial relativamente novo, com menos de uma década de estudos, e apesar da crescente literatura explorando suas propriedades, alguns nichos ainda necessitam de atenção, e novas aplicações ainda são possíveis de serem exploradas, como no caso de sensores eletroquímicos, e principalmente no uso em transistor de efeito de campo (FET, do

inglês *Field Effect Transistor*), no qual é pouco explorado utilizando a técnica LBL no desenvolvimento de biossensores. Seu uso em terapia fototermal também é pouco explorado, sendo o primeiro trabalho publicado em 2010, estando ainda em aberto muitas questões sobre maneiras de diminuição da toxicidade do nanomaterial, aumento da internalização pelas células, e eficiência no uso da técnica de fototerapia.

Desta forma exploramos nesta tese essas lacunas existentes, mostrando que o mesmo nanomaterial pode ser inserido em diferentes aplicações, tanto em sensores e biossensores quanto em terapia, apenas explorando as funcionalidades inerentes à química de sua superfície.

2 OBJETIVOS

Esta tese de doutorado utiliza o RGO em duas principais abordagens, uma destinada a sensoriamento e outra em terapia. A divisão deste trabalho foi feita da seguinte forma:

A primeira parte é sobre o uso do RGO em sensores, que foi dividida em 2 tópicos:

i. Primeiramente estudamos o uso de um sensor eletroquímico, onde o grafite é esfoliado quimicamente formando GO, e em seguida este material é reduzido com NaBH_4 e estabilizado com Dodecil sulfato de Sódio (SDS) e Dihexadecilfosfato (DHP). O composto é então imobilizado em eletrodo de carbono vítreo via *casting*, com o objetivo de determinar a presença do hormônio Estradiol em amostras de urina, utilizando técnicas eletroquímicas.

ii. O segundo tópico é destinado ao estudo dos FETs de RGO construído utilizando a técnica LBL, com o grafeno reduzido de duas formas diferentes, uma via funcionalização covalente utilizando 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTES), que visa deixar o RGO com uma carga superficial positiva, e outra redução via micro-ondas na presença de ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$). Neste caso, ocorre a dopagem do RGO com nitrogênio, aumentando a sua condutividade e servindo como camada negativa no filme LBL. Os filmes foram crescidos em eletrodos interdigitados de ouro e imobilizados via reticulação com glutaraldeído e uma proteína extraída do mamão (*Carica papaya*) a Papaína, que é uma cisteína proteinase que tem a capacidade de digerir outras proteínas. Mas a Papaína é inibida por uma proteína da família das Cistatinas, a Cistatina C (Cis-C). Desta forma será utilizada essa característica da papaína como um biossensor enzimático por inibição de Cis-C para detecção de doença renal crônica.

Na segunda parte da tese, estudamos o RGO em terapia fototermal em células tumorais do cólio do útero (HeLa). Neste trabalho o GO é reduzido com hidróxido de amônia (NH_4OH) na presença do aminoácido L-Glutamina (Glu). O grafeno modificado é incorporado em células HeLa e então submetido a irradiação de um laser no infravermelho (808 nm) e assim monitorado a variação de temperatura localizada e a consequente citotoxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Grafeno

Carbono é um dos elementos mais abundantes da terra, e sua capacidade de formar hibridizações em seu orbital eletrônico permite a construção de estruturas estáveis em diferentes dimensionalidades. Essas estruturas são encontradas naturalmente, ou podem ser sintetizadas, como os fulerenos, diamantes, nanotubos de carbono e mais recentemente, o grafeno .(19,32-33) Cada um destes materiais, apesar de terem como base a mesma matéria prima, possuem propriedades eletrônicas, óticas, térmicas e mecânicas muito diferentes, e em alguns casos melhoradas, como é o caso do grafeno, que possui muitas características semelhantes às dos nanotubos.

Grafeno é um nanomaterial bidimensional com uma estrutura cristalina hexagonal, formada por átomos de carbono sp^2 , onde cada átomo se liga a outros três em ligações σ , com uma distância interatômica de 0,142 nm. Esta ligação confere ao nanomaterial as suas excelentes propriedades mecânicas. No caso do grafite que é formado pelo empilhamento desses planos, estão interconectados por ligações π com uma distância de 0,335 nm, já no grafeno, os elétrons dessas ligações estão em um estado onde a banda permanece semipreenchida, o que dá as características condutoras deste material.(18)

A estrutura do grafeno pode ser vista como a interconexão de duas redes triangulares, como mostra a Figura 3.1a, indicadas por A e B, onde a_1 e a_2 , são os vetores da célula unitária e podem ser escritas como.

$$a_1 = \frac{a}{2}(3, \sqrt{3}) \text{ e } a_2 = \frac{a}{2}(3, -\sqrt{3}) \quad (1)$$

E os vetores da rede recíproca são dados como.

$$b_1 = \frac{2\pi}{3a}(1, \sqrt{3}) \text{ e } b_2 = \frac{2\pi}{3a}(1, -\sqrt{3}) \quad (2)$$

As Figura 3.1b e c correspondem à primeira zona de Brillouin da rede recíproca, onde os pontos K e K' são conhecidos como pontos de Dirac. Na Figura 3.1d, observa-se aproximação da região K e K', onde a banda de valência e condução se tocam, não possuindo um *gap* entre as bandas, desta forma o grafeno é considerado um semicondutor com *band gap* igual a zero, o que difere do grafite, que possui um comportamento de semimetal.(34-35)

Próximo a este ponto (K e K') temos uma das características que são únicas desse nanomaterial, que é a dispersão linear de energia, dada pela equação 3:

$$(E = \hbar v_F k) \quad (3)$$

Figura 3.1 - Estrutura hexagonal do grafeno, com as células unitárias A e B, b) primeira zona de Brilouin, onde os cones de Dirac estão localizados nos pontos K e K', c) Estrutura de bandas em três dimensões para o grafeno, d) Zoom na região K e K' onde se toca as bandas de valência e condução formando o cone de Dirac.

Fonte: Adaptada de SARMA. (36)

O grafeno possui algumas particularidades que o torna muito atrativo em aplicações tecnológicas e ciência básica.(18) Também é excelente para estudos teóricos, sendo inicialmente considerado apenas como um material acadêmico.(37) A química do grafeno permite um controle de propriedades como ocorre em poucos materiais. Algumas dessas superam outros materiais, como a alta condutividade térmica ($5.000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$),(38) área superficial ($2.630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$),(39) condução balística ($200.000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$) (40) e módulo de Young (1.100 GPa).(41)

3.2 Síntese de grafeno

Em 2004 Geim e Novoselov conseguiram isolar e estudar pela primeira vez uma folha de grafeno, o que conferiu a esses pesquisadores o prêmio Nobel de Física em 2010.(18) Este estudo possibilitou a quebra de um paradigma, que a mais de um século era previsto a impossibilidade de existir materiais bidimensionais com uma camada atômica. E desde então, uma dezena de novos materiais bidimensionais vem surgido, o que evidencia a importância desta descoberta.(42)

Diversos métodos de obtenção de grafeno vêm sendo desenvolvidos e aperfeiçoados, de acordo com as propriedades desejadas. Os principais métodos de obtenção são descritos a seguir.

3.2.1 Microesfoliação

O método de microesfoliação utilizando fita adesiva foi o primeiro método desenvolvido e o mais simples de obter grafeno. Este método consiste da clivagem dos planos cristalinos do grafite quebrando as ligações de van der Waals entre as camadas de grafeno,(19) podendo ser usado tanto o grafite natural quanto grafite sintético (HOPG). Este método apresenta como vantagem a possibilidade de obter amostras com área maior que um micrometro, o que permite ser visualizado via microscópio ótico quando depositado em um substrato de SiO_2 de 300 nm de espessura,(43–45) devido ao contraste produzido entre a folha e o substrato, como mostra a Figura 3.2 indicada dentro do círculo. A imagem foi colorida artificialmente para melhor visualização das folhas.

Figura 3.2 - Microscopia ótica de uma amostra de grafeno mecanicamente esfoliado, dentro do círculo a imagem de uma folha.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma desvantagem deste método se dá pela dificuldade de reproduzir o experimento, não sendo possível ser usado em larga escala, mas é um excelente método quando se quer estudar propriedades eletrônicas e determinar as características fundamentais deste material, devido ao alto grau de cristalinidade das folhas.(46)

3.2.2 Crescimento por deposição química em fase vapor

Outro método empregado no crescimento de folhas de grafeno, é por deposição química em fase vapor (CVD, do inglês *Chemical Vapor Deposition*). Este método consiste da exposição de um ou mais precursores voláteis que reagem ou se decompõem via ativação por luz, calor ou plasma, seguido da condensação na superfície de um substrato, formando partículas ou filmes.(47)

Por ser uma técnica já estabelecida e bastante empregada na indústria de semicondutores, é uma das mais utilizadas na produção de grafeno. Tendo como vantagem a produção em larga escala, e com folhas variando de tamanho de alguns micrometros até alguns centímetros. Uma desvantagem deste método é a dificuldade de se obter folhas com altíssima qualidade cristalina e isenta de contaminantes, pois o crescimento só é possível quando se é utilizado como substratos metais como, Ni, Co, Cu, Pt, Ir ou Ru.(21,48-49)

3.2.3 Crescimento epitaxial em Carbeto de Silício (SiC)

Este método consiste da sublimação do silício em temperaturas maiores que 1300 °C em ultra alto vácuo na direção (0001) do cristal, os átomos de carbono remanescentes formam uma superfície carbônica e nas condições ideais de crescimento, esses átomos podem se rearranjar e formar mono ou multicamadas de grafeno.(50)

Essa técnica não apresenta muitas vantagens, devido ao alto custo de processamento das amostras, além do grafeno não possuir as propriedades usuais obtidas em outros métodos, devido à forte interação entre Si-C.

3.2.4 Esfoliação química do grafite

A esfoliação química do grafite é um método empregado desde o final do século XIX, por de Brodie, Staudenmaier, e Hummers.(23,51-52) Essas três vias tem em comum a

oxidação do grafite na presença de ácidos fortes e oxidantes, onde o grau de oxidação pode variar de acordo com os reagentes, tempo e a fonte de grafite utilizado. O grafite, quando oxidado, é fortemente hidrofílico, o que permite a intercalação de moléculas entre as camadas, facilitando a esfoliação em meio aquoso. Com algumas modificações na reação e concomitantemente usando microesfoliação mecânica via ultrassom, é possível obter o GO.(53)

Uma das particularidades desse método de esfoliação é a produção de um grafeno não estequiométrico e com baixa cristalinidade, devido à inserção de grupos funcionais na estrutura do material, formado por grupos carboxílicos, aldeídos e hidroxilas, sendo impossível o controle preciso destas funcionalizações.(22) Essas ligações são majoritariamente do tipo sp^3 , o que causa uma ruptura na rede, diminuindo a sua capacidade de condução eletrônica, além de alterar suas propriedades óticas.(54) Diferente do grafeno mecanicamente esfoliado, a distância interplanar do GO fica em torno de 0,6 a 1,2 nm, e devido à presença desses grupos, ocorrem distorções na rede e a presença de água intercalada em sua estrutura.(55)

O GO apresenta três importantes características, que o tornam atrativo em diversas áreas dentro das nanociências, principalmente em nanomedicina. A primeira é a capacidade de controlar sua morfologia, onde é possível facilmente modificar o tamanho lateral que varia de alguns poucos nanômetros até folhas da ordem de dezenas de micrômetros, controlando assim sua toxicidade e internalização celular.(9,10,56) A segunda esta relacionada à química de sua superfície, em que devido à sua alta dispersabilidade em água, e em diversos solventes orgânicos, permite modificar sua estrutura com adição e/ou retirada de grupos com alguma finalidade específica, dopar e interagir eletrostaticamente com alguma molécula.(57–59) E por último, temos o baixo custo efetivo de produção e manipulação desses nanomateriais, sendo a matéria prima (grafite), com uma estimativa de custo de 1,5 a 2,0 dólares por Kg de material, e que pode chegar a um valor final de produção de GO de 220 dólares por Kg,(60) o que evidencia a importância desse método na obtenção de um produto com alto valor agregado.

3.2.5 Redução do GO

O GO apresenta propriedades bem distintas do grafeno cristalino, e mesmo considerando algumas características similares entre ambos, como a bidimensionalidade, a

presença majoritária de ligações sp^2 , e terem a mesma fonte de carbono, não podemos dizer que são o mesmo material, principalmente quando comparamos a estrutura de bandas no qual o grafeno cristalino apresenta um *gap* de 0 eV, e o GO com um *gap* em torno de 3,5 eV,(61) o que o torna um material isolante. Desta maneira, reduzir o GO é necessário quando se quer produzir um nanomaterial com propriedades que se aproximem das obtidas pelo grafeno mecanicamente esfoliado, como a condutividade, propriedades óticas e térmicas.(54,62-63)

Durante o processo de oxidação do grafite temos a quebra de algumas ligações sp^2 e a formação de ligações sp^3 nos planos grafíticos, o que causa o aumento do *gap* do GO. Quando eliminadas, temos uma restauração parcial da rede cristalina, podendo ter uma condução de cargas aumentada em até 8 ordens de grandeza.(56) Não é possível eliminar todo o oxigênio presente, além disso, outros defeitos são inseridos na estrutura como mostrado por Navarro e colaboradores, onde as folhas de GO reduzido (RGO) apresentam regiões com alto grau de cristalinidade, e regiões onde ocorrem ligações sp^2 amorfo e defeitos topológicos, que criam deformações no plano, aumentando a tensão da rede cristalina.(64) Isto diminui consideravelmente a condutividade do material, deixando-o com algumas propriedades eletrônicas inferiores às dos sintetizados por CVD ou microesfoliado.

Apesar das limitações do RGO em eletrônica de alto desempenho, outras características desse nanomaterial são exploradas em diversas outras aplicações como supercapacitores para armazenamento de energia,(65) eletrodos em baterias de íons de lítio (66) ou para eletrodos transparentes em células solares.(67) Além disso, permite sua aplicação em áreas onde o grafeno cristalino apresenta pouca ou nenhuma competitividade, como em nanomedicina, onde algumas aplicações *in vitro* e *in vivo* só são possíveis com o RGO.(10,31,68)

A redução do GO pode ser feita de diversas maneiras, como redução térmica,(69) eletroquímica,(70) e química, e cada método permite manipular de diferentes formas as propriedades do RGO. Uma dessas formas é por via química, onde diversos agentes redutores são utilizados, como hidrazina (N_2H_4),(56) borohidreto de sódio ($NaBH_4$),(62) hidróxido de amônia (NH_4OH),(71) ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) (72) entre outros.(73) A escolha do melhor redutor vai depender da aplicação, e das características que lhe são pertinentes, uma vez que, por esse método não só é possível eliminar o oxigênio presente, bem como, adicionar outros elementos, como, nitrogênio, boro, enxofre, entre outros.(57,74)

3.3 Transistor de Efeito de Campo de grafeno (GFET)

A indústria de semicondutores está próxima do limite tecnológico dos dispositivos a base de silício, assim, constantemente, novos materiais têm sido desenvolvidos para ultrapassar as limitações hoje impostas. Materiais não tradicionais nesse campo tem sido apresentados como promissores candidatos a uma nova era na eletrônica, como os polímeros condutores e nanotubos de carbono,(75-76) e mais recentemente, a introdução dos dispositivos a base de grafeno.

Um FET é essencialmente um dispositivo eletrônico com três terminais, onde o transporte de cargas é feito através de um canal, no qual a entrada é convencionalmente chamada de Fonte (S), e a saída de Dreno (D). A modulação dessas cargas é feita pelo terceiro terminal, chamado de Porta (G). A grande vantagem desse dispositivo é não ser necessário o uso de corrente para o controle de uma carga, como ocorre nos transístores de junção bipolar (TJB) o que acarreta em um consumo maior de corrente, aumentando assim as perdas por efeito joule. Essa ausência de corrente na porta do FET permite a construção de dispositivos com uma alta densidade de integração e miniaturização, tornando assim viável a construção de microcomputadores, celulares e todo equipamento eletrônico hoje fabricado.

Existem diversas variações desses dispositivos, mas a mais utilizada e que será descrita aqui, é o transistor de efeito de campo metal-óxido-semicondutor (MOSFET, do inglês *Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*), que consiste de um metal conectado a uma fina camada de óxido formando um sistema capacitivo, o qual funciona como a porta do dispositivo, modulando o transporte de cargas entre a fonte e o dreno, como mostra a Figura 3.3a. Na Figura 3.3b, o grafeno é depositado sobre uma fina camada dielétrica de SiO₂, que por sua vez é conectada com um eletrodo (G) de Silício dopado, e os terminais (S – D) são conectados nas extremidades da folha de grafeno. Este sistema é do tipo *back-gate*, mas existem outras variações desses dispositivos como os do tipo *top-gate* e híbridos *top-back-gate*.(77)

Figura 3.3 - Esquema básico de um: a) MOSFET e seus principais componentes, dreno (D), fonte (S), porta (G), para um FET do tipo NPN. B) Esquema básico de um transistor de grafeno GFET do tipo *back-gate*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os primeiros dispositivos GFET, foram desenvolvidos por Geim e Novoselov no trabalho que conferiu aos dois o Nobel de física de 2010.(19) Algumas das vantagens dos GFETs são a escalabilidade, no qual a mesma indústria de semicondutores montada atualmente para construção de dispositivos de silício pode ser usada para construção dos dispositivos a base de carbono. O transporte balístico de cargas, comportamento linear de corrente e voltagem ($I-V$), além de suportar altos valores de correntes ($>10^8 \text{ A/cm}^2$),(18) também são vantagens importantes.

Outra característica encontrada no grafeno e não observada na maioria dos dispositivos semicondutores é a condução ambipolar, onde os transportadores de carga mudam de elétrons para buracos e vice-versa, em um mínimo de condutividade que é chamado de ponto de neutralidade de Dirac. Em uma monocamada de grafeno sem a presença de defeitos e impurezas, quando a tensão V_{GS} é igual a zero, a condutividade mínima (σ_{min}) vai ser próxima à $\sigma_{min} = 4e^2/h$, o que sugere a quantização da condutividade do grafeno.(18,78) Na Figura 3.4, mostramos um esboço de uma curva de transferência de um GFET ($V_{GS} \times I_{DS}$), indicando a condução por buracos/elétrons, bem como, o ponto de mínimo condutividade de Dirac.

Figura 3.4 - Esboço de uma curva de transferência ideal para um GFET, as setas indicam o preenchimento das bandas (cor azul), ora na região de condução por buracos, ora na região de condução por elétrons.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os GFETS apresentam uma baixa razão I_{on}/I_{off} , o que limita as aplicações em dispositivos lógicos, devido à ausência de um *gap*. Nestas aplicações, uma alternativa que vem sendo explorada é a introdução de um *gap* utilizando nanofitas de grafeno. Dispositivos com largura menores que 5 nm foram operados como dispositivos de canal P e apresentaram taxas I_{on}/I_{off} de 10^7 .(79) Apesar do grande avanço em termos de performance, algumas características são sacrificadas por esse método, como a mobilidade, e um baixo nível de corrente, além do que, é difícil manter uma regularidade nas bordas do dispositivo onde qualquer distúrbio muda o valor do *gap* significativamente.(80) Além disso, existem as dificuldades tecnológicas de construir nanofitas em escala industrial, sendo ainda viável apenas em escala de laboratório. Outras alternativas também exploradas utilizam bicamadas de grafeno e dopagem superficial, e por esses métodos é possível obter um *gap* > 80 meV, mas não sendo possível ainda obter valores de I_{on}/I_{off} superiores a 10^3 .(81-82) Em contrapartida, apresenta promissoras aplicações em radiofrequência, uma vez que os dispositivos utilizados não necessitam de uma grande razão I_{on}/I_{off} para operar, onde a principal dependência da performance está relacionada à mobilidade.

Outra limitação no uso dos GFETs são a sua sensibilidade e degeneração da mobilidade decorrente de impurezas e centros espalhadores de cargas, que limitam o caminho livre médio de elétrons/buracos para menos de um micrômetro. No entanto, é evidente que o grafeno é um cristal quase perfeito sem defeitos estruturais, logo, as limitações desses dispositivos provêm de fontes extrínsecas.(83) Embora a natureza do espalhamento de cargas não ser exatamente

clara, algumas evidências indicam como origem as armadilhas de cargas na superfícies do substrato, fônons interfaciais, ondulações estabilizadas pelo substrato, resíduos da fabricação dos dispositivos e adsorção de moléculas na superfície do grafeno, como a água.(36,84–86) Uma estratégia usada para eliminar parte desses problemas foi manter o grafeno suspenso sem manter contato direto com a porta, podendo assim chegar a mobilidades da ordem de 200.000 cm^2/Vs em temperatura ambiente, e a 1.000.000 cm^2/Vs em 4 K.(87-88)

3.4 Eletrólito porta RGO-FET

Como mencionado no tópico anterior, existem duas configurações de GFET, *back* e *top gate*. Na última configuração, o dielétrico pode ser substituído por uma solução eletrolítica, onde a modulação da tensão V_{GS} é feita através de um eletrodo de referência mergulhado na solução, que por sua vez fica em contato direto com as folhas de grafeno, semelhante aos FET sensíveis a ions (ISFET, do inglês *Ion Sensivity Field Effect Transistors*) desenvolvidos por Bergveld em 1970.(89) Desta forma, podemos utilizar esses dispositivos como transdutores no desenvolvimento de biossensores.

As interações entre biomoléculas ou adsorção de biomoléculas na superfícies de GFETs modulam o transporte de carga elétrica através de mudanças na concentração de portadores e na mobilidade, causadas pelo bloqueio eletrostático ou pelo efeito de *doping* de carga no canal de grafeno.(90)

Porém, os biossensores utilizando GFET tem um desempenho limitado quando comparados com outros nanomateriais, como nanofios de silício,(91) e nanotubos de carbono.(92-93) Essa limitação ocorre pela contaminação durante o processo de transferência a partir de substratos metálicos e padrões de fotorresiste.(25) Além disso, devido à falta de sítios de ligação no grafeno, a quantidade de receptores que se ligam em sua superfície diminui significativamente, limitando a sua performance, como demonstrado por Fu e colaboradores: em dispositivos com alto grau de cristalinidade, a sensibilidade do grafeno a variações de pH são mínimas.(94)

O uso de RGO em FETs oferece a possibilidade de construir dispositivos em um processo simples de fabricação com grande densidade de sítios de ligação. Na literatura científica existe uma gama de trabalhos já publicados visando aplicações em biossensores, explorando essas qualidades do RGO.(25,90,95-96)

Existem diversos modelos aplicados em GFETs para determinação das características de saída de corrente, e aqui foi adotado o modelo proposto por Yu e colaboradores.(96)

A mobilidade dos portadores de carga é dada.

$$\mu = g_m \frac{L}{W V_D C_G} \quad (4)$$

Onde g_m , L , W , V_{DS} e C_G , são respectivamente a transcondutância intrínseca do dispositivo, o comprimento e largura do canal condutor, a tensão de dreno e a capacitância de porta.

A capacitância de porta C_G , é considerada como a soma de dois capacitores em série, uma sendo a capacitância do eletrólito C_E mais a capacitância quântica C_Q .(97) Supondo que o grafeno é equivalente a um disco metálico colocado no isolante, podemos calcular a equação:

$$C_E = \frac{2\pi\epsilon_0(\epsilon_r + 1)r}{\tan^{-1} \left[\frac{2h(\epsilon_r + 1)}{r\epsilon_r} \right]} \quad (5)$$

Onde r é o raio do grafeno, h , a espessura do isolante, ϵ_0 e ϵ_r a permissividade do vácuo e a relativa respectivamente.

Já a capacitância quântica é dada.(98)

$$C_Q = \frac{2e^2}{\hbar v_F \sqrt{\pi}} (|n_G| + |n^*|)^{1/2} \quad (6)$$

Onde v_F , é a velocidade de Fermi, n_G e n^* a concentração de portadores causada pelo potencial de porta (V_{GS}) e a carga de impurezas respectivamente.

Somando as duas capacitâncias temos.

$$C_G = \frac{C_E \cdot C_Q}{C_E + C_Q} \quad (7)$$

A corrente de dreno (I_D) pode ser escrita com a mesma equação utilizada para um MOSFET convencional, quando $V_{DS} < V_{GS} - V_T$.

$$I_D = C_G \mu \frac{W}{L} \left[(V_{GS} - V_T) V_{DS} - \frac{1}{2} V_{DS}^2 \right] \quad (8)$$

Onde V_T é a tensão de limiar. Devido à característica ambipolar dos GFETs, este modelo é uma primeira aproximação e incompleta, uma vez que ela só explica a região linear da I_D em função de V_{GS} , além disso, ela deve ser aplicada separadamente para as regiões de buraco e elétrons.(96)

3.5 Sensores e Biossensores

Em uma definição ampla, um sensor pode ser definido como um dispositivo, sistema, ou uma rede, com o propósito de medir variações em um ambiente e converter essas variações em uma dada informação.(99) Já um sensor químico, segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) é um “dispositivo que transforma uma informação química, desde a concentração de um componente de uma amostra específica até a análise de composição total, em um sinal analiticamente útil”.(100)

Um sensor pode ser químico, onde envolve alguma reação química, ou físico em que se mede a variação de alguma grandeza física. Podemos dividir um sensor químico em duas partes, a primeira é o elemento de reconhecimento (receptor), e neste ponto é onde ocorre a diferença entre um sensor químico e um biossensor, no qual o primeiro ocorre uma reação química com a participação do analito que origina sinal analítico. Um biossensor é um sensor químico no qual o elemento de reconhecimento é um receptor biológico.(100) Como receptor temos os biossensores baseados em interação antígeno-anticorpo, enzima-substrato, hibridização de DNA, além do uso de microrganismos, como bactérias, fungos, e também tecidos de animais e plantas.(101)

O receptor pode ser seletivo ou não, mas a eficiência do sistema está diretamente ligada à sua especificidade, desta forma desenhar um dispositivo que tenha a melhor resposta em função da seletividade é o primeiro objeto de estudo. Na Figura 3.5, mostramos o design básico de um sensor e seus principais componentes, no qual o analito ao interagir com o receptor, gera uma resposta indicada pelo “Sinal” na figura.(102)

Figura 3.5 - Design de um biossensor, e seus principais componentes, analito (o que se mede), receptor (reconhecimento do analito) e transdutor (transforma a informação dada pela interação analito-receptor em um sinal mensurável).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O transdutor transforma a interação química/bioquímica do receptor em um sinal analítico mensurável. Podemos classificar os sensores/biossensores pelo seu método de transdução:

Óticos: Um sensor ótico é um dispositivo que contém um elemento de reconhecimento acoplado a um transdutor ótico. Estes dispositivos podem ser de ressonância de plasmons de superfície (SPR), fluorescência de ondas evanescentes, interferometria de onda guiada, bioluminescência utilizando fibra ótica, espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS, do inglês *Surface-enhanced Raman spectroscopy*), Raman e elipsometria.(103)

Piezoelétricos: Transdutores piezoelétricos são representados pela clássica balança de quartzo, onde uma fina placa de cristal de quartzo tem suas duas faces recobertas com ouro, onde uma é a região ativa, no qual o receptor é imobilizado. Essa técnica consiste da medida da variação da frequência natural do cristal (5 MHz) quando este é submetido a um potencial oscilante de mesma frequência, gerando uma onda acústica transversa na sua superfície, e como consequência, o deslocamento dos átomos do cristal paralelo à sua superfície. Quando um determinado material é depositado, temos um deslocamento dessa frequência de ressonância, e podemos medir e estudar o comportamento dessa superfície em tempo real. Desta forma, essa técnica mede a quantidade de massa que é adsorvida na superfície do metal, podendo assim, estudar a interação antígeno-receptor de diferentes moléculas.(104)

Térmicos: Transdutores térmicos medem as mudanças de entalpia de uma reação, esses dispositivos podem ser considerados como microcalorímetros, onde o receptor é colocado em uma pequena coluna próximo ao transdutor de detecção de calor, em geral um termistor. Este

sistema diferencial de medição anula as flutuações da temperatura ambiente, e permitindo a medição específica da reação.(105-106)

Capacitivos: Essa classe de transdutores baseia-se nas propriedades dielétricas, distribuição de carga, dimensão e forma, quando um complexo analito-receptor é formado. Podem ser usados em duas abordagens diferentes, uma é com a imobilização do receptor entre duas placas paralelas, que podem ser de um só par, ou de múltiplos pares (interdigitados). A outra forma é a imobilização do receptor em um eletrodo, no qual a capacitância é medida entre a interface do eletrodo de trabalho e a solução.(107)

Eletroquímicos: Transdutores eletroquímicos encontram aplicações nas mais diversas áreas, como indústria de alimentos, farmacêutica, análise clínica, monitoramento ambiental. É o método de transdução mais utilizado hoje, devido ao baixo custo de desenvolvimento, integração a outros dispositivos, miniaturização, além de reprodutibilidade, baixo limite de detecção, linearidade e estabilidade dos sistemas existentes. O termo “sensores eletroquímicos” abrange uma gama muito maior de transdutores, que podem ser do tipo amperométrico, voltamétrico, potenciométricos e condutimétrico.

Historicamente, os biossensores tem sua origem um pouco mais recente do que os sensores, com o trabalho pioneiro de Clark e Lyons em 1962, quando imobilizando uma enzima em um eletrodo de oxigênio, construíram um dispositivo para monitoramento contínuo de glicose no sangue.(108) E desde então, estudos e desenvolvimento de novos dispositivos crescem a cada ano devido à grande demanda existente de novas metodologias e novos dispositivos, principalmente aqueles que se baseiam no conceito de “*point-of-care*”, como os medidores de glicose no sangue e testes de gravidez de farmácia.

Este é o maior desafio da área de biossensores, realizar diagnósticos de ponta, de forma rápida, alta sensibilidade e precisão, com baixo custo e confiável em uma plataforma simples e amigável ao usuário. Principalmente em doenças onde existe a necessidade do monitoramento contínuo e em lugares onde há carência de sistemas mais complexos de diagnóstico. Um exemplo de ensaio que é desejável dentro dessas características, são testes de infarto do miocárdio, no qual hoje já existem marcadores específicos para essa doença (Troponina cardíaca I e T) e seu uso se torna necessário devido à natureza crítica do tempo da manifestação da doença.(109)

3.6 Filmes automontados por interação eletrostática

Automontagem camada por camada (LBL, do inglês, *Layer-by-Layer*), é uma técnica para revestir substratos com polímeros, colóides, biomoléculas e até mesmo material biológico.(110–113) É uma técnica versátil quando comparada com outros métodos de deposição de filmes finos, como Langmuir–Blodgett (LB) (28) e monocamadas auto-organizadas (SAM),(114) A deposição pode ser feita com diferentes métodos, como: imersão, crescimento por spray, *spin coating*, *spin-spray*, filtração, utilizando campo elétrico e campo magnético, etc. (113) Essa técnica existe desde 1966 com o trabalho de Iler sobre deposição de sílica coloidal e alumina,(115) mas não chamou muita atenção da comunidade científica, e 26 anos mais tarde, Decher e colaboradores demonstraram que a técnica LBL é uma ferramenta útil na construção de filmes, com inúmeras publicações para as mais diversas aplicações.(110)

Uma característica marcante dos filmes LbL é que podem possuir espessuras de alguns nanômetros até centenas de micrômetros, onde o controle do crescimento ocorre pelo número de camadas desejadas. Para a maioria de filmes automontados, ocorre um aumento linear da espessura, ou da quantidade adsorvida por unidade de área, o que está relacionado ao número de bicamadas. Nesse caso, um substrato carregado negativamente é mergulhado em uma solução contendo polycations durante um determinado tempo. Em seguida, este substrato, já com uma camada, é colocado em uma solução de lavagem e depois submetido a procedimentos de secagem. A seguir, o substrato é colocado em outra solução, desta vez com polianions e uma nova camada é adsorvida, sendo novamente lavado e seco. A repetição deste processo leva à adsorção de outra bicamada e assim sucessivamente até obter o número desejado de bicamadas,(115) conforme é mostrado na Figura 3.6.

Figura 3.6 - Etapas de crescimento de um filme LBL, onde o processo se inicia com a adsorção da primeira camada seguida de lavagem, em seguida inicia o processo de adsorção da segunda camada e por último a limpeza desta, o processo se reinicia, quantas vezes for necessário.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Usualmente a deposição da camada ocorre por dois eletrólitos diferentes, mas podem ser construídos utilizando apenas um, ou com múltiplos eletrólitos. (116-117) O principal mecanismo de adsorção dos filmes LBL se dá pela interação eletrostática entre substrato/eletrólito, mas outros mecanismos estão presentes. Devido à variedade de polieletrólitos existentes, podemos classificar essas interações de acordo com polieletrólito utilizado em:(118)

Polieletrólitos altamente carregados: Interações iônicas governam os mecanismos de adsorção usando polieletrólitos altamente carregados, o que permite criar filmes estáveis e ultrafinos na ordem de um 1 nm por camada e grande homogeneidade.

Polieletrólitos fracamente carregados: A principal interação que ocorre entre o material adsorvido e o substrato também é a interação iônica, neste caso, devido à fraca carga associada ao polieletrólito, outras interações também podem ocorrer, como pontes de hidrogênio. Dessa forma, a espessura de cada camada será fortemente dependente das condições experimentais, como o pH da solução, e a presença ou ausência de sal.

Ligações secundárias: Neste tipo de adsorção as interações podem ser exclusivamente secundárias ou em conjunto com interações iônicas. Desta forma, as camadas depositadas podem variar de espessura, também sendo fortemente dependentes das condições experimentais. Essas interações podem ser do tipo ligação de hidrogênio, forças de van der

Waals, interações hidrofóbicas e dipolo-dipolo. Esse tipo de interação permite a adsorção não auto-limitante, permitindo assim construir filmes utilizando somente um polieletrólito, onde as camadas são adsorvidas sobre si mesmas.

Ligações específicas: Interações específicas são ligações do tipo biotina-avidina, por exemplo. Esse tipo de interação é mais forte que as iônicas prevalecendo sobre essas, desta forma, podem ser montados filmes sem a necessidade de utilizar cargas opostas, este tipo de interação é menos usual do que as outras descritas acima.

3.7 Terapia fototermal

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes que determinam a dinâmica e estrutura de sistemas biológicos, desde moléculas e macromoléculas, até sistemas mais complexos como células e tecidos. A ideia de usar o aumento da temperatura no tratamento de câncer surgiu no final do século XIX e início do século XX com William Coley, observando pacientes com infecções bacterianas, que frequentemente experimentavam uma regressão tumoral devido a febre induzida por esses patógenos.(119)

Podemos classificar as terapias que usam o aumento de temperatura como fonte de tratamento em três tipos, que variam de acordo com a amplitude de temperatura e os efeitos causados, em: diatermia, hipertemia, e ablação celular.

A diatermia não induz modificações significativas em nível celular, mas esses tratamentos quando associados a outros métodos, trazem benefícios à saúde, sendo utilizados principalmente em fisioterapia, no alívio de dores, relaxamento de tendões e músculos. Já em tratamento em câncer auxilia na difusão de quimioterápicos, devido ao aumento do fluxo sanguíneo.(120)

Hipertermia é definida como a elevação da temperatura de uma porção de um tecido em que a temperatura excede o limite fisiológico normal, estando entre 39 e 45 °C. Os mecanismos de ação da hipertemia dependerão da temperatura e duração do tratamento, a combinação de outras terapias e o local do tumor. Alguns desses mecanismos são a perfusão sanguínea,(121-122) alteração do metabolismo celular, ativação da apoptose,(123) aumento da absorção de quimioterápicos,(124-125) inibição do reparo a danos no DNA (126) e ativação do sistema imunológico.(127-128)

Acima de 48 °C, ocorrem a morte celular e os processos de necrose, e o efeito da temperatura é considerado drástico e irreversível. Esse aumento de temperatura é altamente

eficiente na destruição de tumores, a desvantagem é que não afeta somente as células doentes, podendo causar efeitos colaterais relevantes no tecido saudável.(129,130)

A ablação ocorre em temperaturas superiores a 60 °C, causando de forma irreversível a desnaturação de proteínas e destruição imediata dos tecidos. Os fluídos superaquecem, a pressão aumenta, ocorrendo a desidratação do tecido.(131,132) Na Figura 3.7, temos os processos que ocorrem durante as várias fases do aquecimento dos tecidos.

Figura 3.7 - Efeitos causados nos tecidos em diferentes temperaturas

Fonte: Adaptada de JAQUE.(130)

3.7.1 Nanopartículas com indução de fotohipertermia

Depois da segunda guerra mundial devido ao advento das tecnologias de microondas e radiofrequência (RF), foi possível induzir hipertermia de maneira controlada, segura e localmente, em uma variedade de tumores. Somente no fim da década de 70 do último século e início da década seguinte, que a técnica veio a ser amplamente utilizada, concomitante à outras, como a quimioterapia e radioterapia.(133)

Com advento de novas tecnologias, como lasers, diodos, equipamentos de ressonância magnética nuclear, ultrassom, entre outras, novas maneiras de induzir aquecimento local tem surgido, como a magnetohipertermia, que utiliza de nanopartículas magnéticas sob um campo magnético de alta frequência (KHz – MHz), como magnetita (Fe_3O_4), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), e magnemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$).(134) A frequência do campo induz vibrações no nanomaterial, gerando assim um calor localizado.(135-136)

Outra modalidade terapêutica que vem crescendo são as técnicas fototermais, que utilizam luz do espectro visível até o infravermelho próximo.(130,137–139) Consiste de um tratamento físico contra o câncer, que emergiu como uma alternativa às terapias convencionais. A técnica usa absorção ótica da luz, promovendo elétrons do absorvedor no estado fundamental e elevando para o estado excitado. A energia de excitação eletrônica posteriormente decai, liberando energia cinética que leva ao superaquecimento do local. Assim, lesões podem ser tratadas sem a necessidade de acesso direto ao tumor, com a luz infravermelha, sendo efetivamente penetrada em um tecido e seletivamente destruindo as células tumorais.

A luz do infravermelho próximo (700 – 1100 nm) pode penetrar nos tecidos, como pele e sangue, de forma mais eficiente do que a luz visível, pois esses tecidos espalham e absorvem menos luz em longos comprimentos de onda. Em comprimentos de onda superiores a 950 nm, no entanto, este efeito diminui devido ao aumento da absorção por água e lipídios.(129,140) A Figura 3.8, ilustra o coeficiente de extinção em função do comprimento de onda do visível ao infravermelho, para a hemoglobina e água.

Figura 3.8 - Janela de absorção do visível ao infravermelho próximo, mostrando as regiões de máximo e mínimo de absorção para a Hemoglobina e a água.

Fonte: KOBAYASHI.(140)

Na última década, várias classes de nanomateriais com forte absorção no infravermelho próximo tem sido utilizadas como agente fototermal, incluindo nanoestruturas metálicas, como ouro,(141) CuS,(142) de carbono como fulerenos,(143) nanotubos e mais recentemente, grafeno.(129)

Quando a luz incide na superfície das nanopartículas de ouro, elétrons livres vão oscilar coletivamente em relação aos íons positivos na mesma frequência da luz incidente. Esse fenômeno é conhecido como ressonância de plasmas de superfície. Esse processo pode ser dividido em dois tipos de interações: Espalhamento, em que a luz é re-emitida com a mesma frequência recebida, e um segundo processo, que consiste da absorção e conversão em calor, devido aos fônons e vibrações da rede cristalina. O controle do comprimento de onda de absorção ocorre com as mudanças na geometria, formato e tamanho do nanomaterial, como nanopartículas esféricas, nanobastões, nanoestrelas, nanocubos, nanodiscos, prismas e *nanoshells*, variando absorção do visível até o infravermelho próximo, no caso particular das nanopartículas de ouro.(144)

3.7.2 Grafeno como agente de indução de calor em terapia fototermal

O uso de grafeno como agente fototermal é recente, com o primeiro artigo sendo publicado em 2010 por Yang e colaboradores, no qual utilizaram nanofolhas de RGO funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG), e injetadas via intravenosa em ratos.(68) Desde então, o número de publicações vem crescendo linearmente, o que demonstra o interesse da comunidade científica na utilização dessas materias em fototerapia. A Figura 3.9, ilustra o número de artigos publicados por ano, para os termos pesquisados “*photothermal therapy graphene*”, no portal Web of Science.^a

^a Web of Science: <https://webofknowledge.com/>

Figura 3.9 - Número de publicações com os termos “*Photothermal Therapy*” graphene extraídos do portal *Web of Science*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os materiais a base de carbono apresentam particularidades semelhantes, como ocorre para o grafeno e os nanotubos de carbono, que possuem muitas propriedades semelhantes, uma vez que o nanotubo pode ser considerado uma folha de grafeno enrolada.(18) Estas propriedades tem relação com as ligações químicas presentes, por exemplo, a forte absorção no infravermelho próximo e médio, que deriva das interações $\pi \rightarrow \pi^*$. No caso do GO temos uma baixa eficiência de conversão fóton/calor devido à quebra de simetria da rede cristalina com a presença de ligações sp^3 . Essa conversão aumenta a medida que a taxa O/C diminui, desta forma, o grau de conjugação π do RGO tem um importante papel na absorção ótica no infravermelho.(10) Além disso, temos efeitos plasmônicos. Uma vez que os plasmons de superfície são induzidos e excitados, ocorre a transmissão de dipolos e ressonância aleatórias, que são convertidas em energia térmica.(145) Acik e colaboradores demonstraram que outro fator que relaciona o aumento da absorção no infravermelho é a presença de átomos de oxigênio agregados nas bordas de defeitos. Com isso há um aumento significativo da absorção no infravermelho decorrente do acoplamento de estados eletrônicos desses átomos no modo de estiramento assimétrico.(146)

Comparativamente a outros nanomateriais como os nanobastões de ouro, os materiais a base de carbono apresentam vantagens pela sua fácil modificação da superfície, evitando assim a detecção do sistema imunológico, alta porcentagem de internalização celular no tecido doente (30%), e uma absorção muito baixa pela pele e outros órgãos.(147-148)

4 EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na esfoliação química do grafite, redução do grafeno oxidado, além de outras etapas da caracterização e aplicação foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A Cistatina (Cis-C) foi adquirida da ThermoFisher Scientific (PHP0044). A Papaína foi obtida da Sigma Vetec, na forma liofilizada. O grafite expandido foi gentilmente cedido pela Nacional de grafite® (99,5%). Água ultrapura (18 MΩ·cm) foi utilizada em todos os experimentos.

4.2 Síntese e esfoliação

4.2.1 Exfoliação química do grafite

No método original descrito por Tung et al. foram utilizados grafite natural em pó com granulometria de 200 *mesh*,(56) e neste trabalho foram feitas adaptações devido ao uso do grafite expandido. Este possui um volume 200 vezes maior que o grafite em pó, isto permite uma maior área de reação, aumentando a qualidade da esfoliação, ou seja, uma menor quantidade de grafite oxidado e partículas não esfoliadas.

O grafite foi pré-tratado com a adição de 120 mL de H₂SO₄ concentrado e aquecido até 90 °C, e 2,5 g de K₂S₂O₈ e P₂O₅ são adicionados em seguida, em agitação, até a completa dissolução dos reagentes. Esfriando a mistura até 80 °C e adicionando 3 g de grafite, a dispersão foi mantida nesta temperatura por 4,5 horas. Em seguida, a solução foi diluída em 500 mL de água deionizada e permaneceu em repouso *overnight*. Posteriormente, a solução foi filtrada usando filtro qualitativo 80g, utilizando água para retirar traços de ácido e em seguida secada em estufa a 50 °C por 24horas.

Para a etapa de oxidação, foram adicionados 200 mL de H₂SO₄ em um *erlenmeyer* a 0 °C. Em seguida, foram adicionados 15 g de KMnO₄, e a temperatura monitorada constantemente para não ultrapassar os 10 °C até a total adição do reagente, que permaneceu por 2 horas a 35 °C. A solução nesta etapa adquire cor verde escuro. Subsequentemente foi adicionado 230 mL de água deionizada, esta etapa é a mais crítica. Inicialmente recomenda-se

a adição de 1 a 5 mL por vez, pois a água reage violentamente com o ácido aumentando a temperatura substancialmente, não devendo ultrapassar os 50 °C. Depois de adicionada a água a solução permaneceu por mais 2 horas sob vigorosa agitação, e nesta etapa a solução adquire coloração marrom escuro. Em seguida completou-se o volume da solução até 700 mL, seguido da adição de 12 mL de H₂O₂ 30% v/v, com a solução adquirindo coloração dourado brilhante, que permaneceu em agitação por alguns minutos, e em seguida foi mantida em repouso *overnight*.

No dia seguinte foi retirado o sobrenadante e adicionado 1.250 mL de HCl 10% e centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado e substituído por água ultrapura para lavar o GO e neutralizar o ácido, sendo esta etapa repetida três vezes. O material foi colocado em uma membrana de diálise com *cutoff* de 10 KDa e mantida por uma semana, onde a água foi trocada duas vezes ao dia. No final a solução possui uma coloração marrom. A dispersão foi armazenada em 4 °C para evitar proliferação de fungos.

4.2.2 Redução química do grafeno oxidado para aplicações em sensores

A etapa de redução foi feita como descrito por Lee et al. com algumas modificações.⁽²⁶⁾ 10 mL de GO (1 gL⁻¹) e 10 miligramas de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) foram homogeneizados usando banho de ultrassom (80 W) em um béquer. Em seguida foi adicionado NH₄OH até atingir o pH 10. A solução foi então desoxigenada usando N₂ por 15 minutos, sob agitação. A amostra foi aquecida a 80 °C, e adicionado 0,15 M de NaBH₄, permanecendo em reação por 60 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 10 mg de dihexadecilfosfato (DHP) e colocado em um banho de ultrassom por 30 minutos e armazenado em 4 °C. O tempo de síntese e quantidade de NaBH₄ foram determinados por UV-Vis, variando a concentração de 0,02 a 0,3 M.

4.2.3 Funcionalização do RGO com APTES e redução química

Primeiramente foi necessário trocar o solvente (água) da solução de GO (1 gL⁻¹) por dimetilformamida (DMF), utilizando o método de centrifugação, onde o pH da dispersão foi ajustado para 1 com HCl para desestabilizar o GO, e então sendo submetido a uma centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos formando um precipitado. A água foi então

removida com auxílio de uma micropipeta. Após essa etapa, o GO foi disperso em DMF utilizando banho de ultrassom por 30 minutos. Para retirar o restante da água presente na dispersão, o sistema foi submetido a um fluxo de nitrogênio por 1 hora. Em seguida foi colocada em agitação e adicionado 2% v/v de APTES e aquecido em 70 °C por 2 horas em um balão de reação com controlador de temperatura. Depois a temperatura foi ajustada para 95 °C e adicionado 0,1 M de NaBH₄ por 2 horas. Após essa etapa, a dispersão foi resfriada a temperatura ambiente e centrifugada por 10 minutos à 10.000 rpm, seguida da adição de acetona e dispersão do grafeno funcionalizado neste solvente, e novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores por mais 2 vezes.

Por último foi adicionado água ultrapura e a dispersão de grafeno foi submetida à diálise (10 KDa) por 24 horas para remoção de eventuais resíduos de solvente e outros produtos utilizados na redução. Esta amostra é designada como RGO-SiNH₂ ao longo do texto, e foi então mantida na geladeira com o pH ajustado em 3,0.

4.2.4 Redução do GO via micro-ondas

Este método de redução foi adaptado de Umrao e colaboradores.(149) A concentração do GO foi ajustada para 1 gL⁻¹, e adicionada ureia na concentração de 10:1 (em massa), seguido de agitação em banho em ultrassom por 2,5 horas. A secagem foi feita utilizando uma estufa em ar ambiente com a temperatura de 70 °C por 24 horas. Na etapa de redução foi utilizado um micro-ondas de uso doméstico Panasonic modelo NNT-252W com 700 W de potência, em intervalos de 10 segundos, e alguns minutos para esfriamento, totalizando 1 minuto dentro do micro-ondas. Isto foi necessário, devido às altas temperaturas que são geradas na amostra devido ao plasma que se forma durante a redução.(150)

Foi adicionado água ao pó e este disperso em ultrassom por 2 horas. O produto da síntese foi então submetido à diálise (membrana de 10 KDa) para remoção de resíduos da redução por 24 horas. Esta amostra é designada como RGO-N, e a dispersão foi mantida em geladeira.

4.2.5 Esfoliação mecânica do grafeno oxidado

Vários fatores influenciam no tamanho das folhas de grafeno. Uma delas é o próprio precursor, que neste caso foi o grafite expandido. Na esfoliação química usada neste projeto, a área média das folhas foi da ordem de micrômetros quadrados, o que as torna inviáveis para aplicações em meio celular, havendo a necessidade de clivar as folhas de GO, diminuindo seu tamanho e facilitando sua internalização na célula. Foi utilizado o sonicador ultrassônico de ponta, Sonifier 450 (400 W, Branson EUA), por 6 horas, com pulsos de 15 segundos on/off, em banho de gelo para evitar superaquecimento.

4.2.6 Redução do GO na presença de L-Glutamina

Similarmente à redução usando DHP, foi utilizado L-Glutamina, para melhor estabilização do nanomaterial e possível diminuição da sua citotoxicidade. GO permaneceu em banho de ultrassom por 30 minutos com a concentração de $0,2 \text{ mgL}^{-1}$, e em seguida foram adicionados $0,01\text{M}$ de Glu e $100 \text{ }\mu\text{L}$ de NH_4OH . A dispersão foi aquecida a 90°C por 8 horas, e a redução foi acompanhada por UV-Vis, monitorando o deslocamento da banda $\pi \rightarrow \pi^*$ de 230 a 270 nm. Em seguida a amostra foi deixada em diálise por 3 dias em membrana de celulose de 10 KDa para a retirada do excesso de Glu. Esta amostra é designada como RGO-Glu. Como amostra de referência, GO também foi reduzido com NH_4OH , mas sem a presença de Glu, nas mesmas condições, e é designada como RGO.

4.2.7 Preparação da urina sintética

A urina sintética foi preparada usando CaCl_2 ($1,1 \text{ gL}^{-1}$), NaCl ($2,9 \text{ gL}^{-1}$), Na_2SO_4 ($2,25 \text{ gL}^{-1}$), KH_2PO_4 ($1,4 \text{ gL}^{-1}$), KCl ($1,6 \text{ gL}^{-1}$), NH_4Cl ($1,0 \text{ gL}^{-1}$), ureia (25 gL^{-1}) e creatinina ($1,1 \text{ gL}^{-1}$) (27). O volume de urina sintética foi fixado em $900 \text{ }\mu\text{L}$, adicionando $100 \text{ }\mu\text{L}$ de estradiol à $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com sequente homogeneização.

4.3 Técnicas de caracterização espectroscópicas

4.3.1 Espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS)

Todas as medidas de UV-Vis foram realizadas utilizando cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm, para caracterização da esfoliação do grafite e das amostras reduzidas no espectrofotômetro U-2900 (Hitachi). Essas medidas são de grande importância para determinar a oxidação/redução do grafeno. Para o monitoramento do crescimento dos filmes, foram utilizados, lâminas de quartzo previamente limpas em solução piranha (H_2SO_4 e H_2O_2 na proporção 3:1), e hidrofílica com KOH 2% em etanol.

4.3.2 Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de Infravermelho (FT-IR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Nicolet iS50 (Thermo Scientific) com resolução 4 cm^{-1} , no modo absorbância, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , com a média de 128 *scans*. As amostras foram secas em vácuo e temperatura ambiente, em seguida o pó remanescente foi misturado com Brometo de Potássio (KBr) e prensado, formando pastilhas de 7 mm de diâmetro por 2 mm de espessura.

4.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X, XPS (do inglês, X-ray photoelectron spectroscopy)

A técnica de XPS é uma técnica espectroscópica de análise de superfícies, onde é possível obter informações sobre a composição elementar, fórmula empírica, estado químico e eletrônico do material analisado. O efeito fotoelétrico é o princípio básico pelo qual essa técnica funciona, onde um feixe de raio-x incide na amostra arrancando desta os elétrons das camadas mais internas dos átomos, e um detector mede simultaneamente os elétrons que escapam da amostra e a energia cinética de cada um.(151)

As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), localizado em Campinas/SP, utilizando o equipamento K- α XPS (*Thermo Fisher Scientific*,

UK), onde foram obtidos espectros no modo varredura e no modo alta resolução. As análises foram feitas utilizando o software *casaXPS*.

As amostras foram preparadas em substrato de silício por *drop casting*, com adição de 50 μL de solução ($0,2 \text{ gL}^{-1}$) e secas em temperatura ambiente sob vácuo. Foram feitas 3 medidas em regiões distintas de cada amostra com um raio de 400 μm .

4.4 Caracterização morfológica

4.4.1 Potencial-Zeta (ζ)

As medidas de Potencial Zeta e de espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) foram feitas utilizando o equipamento Zetasizer ZS90 (Malvern Instruments). Em conjunto com o autotitulador MPT-2 (Malvern Instruments), para fazer a titulação e controle de pH das amostras. Todas as amostras foram feitas nas concentrações de $0,05 \text{ gL}^{-1}$, com volume inicial de 10 mL no titulador.

4.4.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) foi utilizado para caracterizar os filmes, utilizado o equipamento *FlexAFM (Nanosurf)* com *isostage* e gaiola de Faraday. As amostras dos filmes de (RGO-SiNH₂/RGO-N) foram preparadas em substrato de vidro BK7. As amostras de GO, GO mecanicamente esfoliado, RGO e RGO-Glu foram preparadas pelo método de *dip-coating* por 1 minuto utilizando substratos de mica, devido à sua baixa rugosidade, lavadas em água ultrapura em um béquer por 1 minuto e secas em dessecador a vácuo em temperatura ambiente. As imagens foram obtidas utilizando *cantilever* de uso geral TAP-300 (*Budget sensors*) no modo não contanto, 300 KHz, e as estatísticas de altura, área e rugosidade foram tratadas utilizando o software Gwyddion e Origin Lab 8,5.

4.5 Ensaios elétricos e eletroquímicos

4.5.1 Ensaios eletroquímicos

As medidas de voltametria foram realizadas utilizando célula de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glass Carbon electrode*) modificado com RGO-DHP, é o eletrodo de trabalho, um contra eletrodo de platina, e eletrodo de referência de Ag/AgCl (3 mol L⁻¹ KCl). As medidas eletroquímicas e impedância eletroquímica, foram realizadas usando PGSTAT12 (Autolab Eco Chemie). Voltametria cíclica (VC) e linear (VL) foram obtidas em uma célula eletroquímica de 10 mL em temperatura ambiente.

4.5.2 Preparação do eletrodo de trabalho

Foi utilizado como eletrodo de trabalho o eletrodo GCE. A limpeza e o polimento deste foi feita com o uso de papel abrasivo metalográfico número 6 e partículas de alumina (0,3 e 0,05 µm).

A solução de RGO-DHP foi colocada em um banho de ultrassom antes de todas as deposições dos filmes, que foram obtidos pela técnica de *drop casting*, usando 8 µL de solução com a concentração de 1 gL⁻¹. A secagem foi feita em temperatura ambiente por duas horas em um dessecador. O eletrodo de trabalho é designado como RGO-DHP/GCE.

4.5.3 Eletrodos interdigitados

Os eletrodos interdigitados foram confeccionados no Laboratório de microfabricação (LMF, projeto nº LMF-14840) (Campinas/SP), via litografia, pelo processo de máscara positiva. A máscara feita em AutoCad, foi impressa em folha de polietileno pela empresa DGM design (Curitiba/PR). Os dispositivos possuem 30 pares de microeletrodos com a espessura de 30 nm de Cr e 150 nm de Au, a largura de cada microeletrodo e o espaçamento entre eles são de 50 µm e 5 mm de comprimento, como mostra a Figura 4.1. Os metais foram depositados via *sputtering DC* em lâminas de vidro BK7.

Figura 4.1 - Esquema dos eletrodos interdigitados e suas dimensões.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.4 Medidas elétricas e caracterização dos RGO-FET

As medidas elétricas foram realizadas utilizando o equipamento fonte/analizador DC Keithley 2612A (Tektronix, EUA). Com aquisição de dados utilizando a plataforma de desenvolvimento LabView (National Instruments, EUA). Utilizando os dois canais do equipamento, onde o comum de ambos foi conectado no terminal fonte (S) do dispositivo, e o positivo de um canal no dreno (D) e outro na porta (G), como mostra a Figura 4.2.

Figura 4.2 - Esquema do FET construído, com a identificação dos terminais, porta (G), dreno (D) e fonte (S).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A modulação da corrente dreno-fonte (I_{DS}) foi feita via porta/solução (V_{GS}), através do eletrodo de referência comercial R682/A (Analion, Ribeirão Preto) de Ag/AgCl, em tampão PBS.

Todas as medidas foram feitas em temperatura ambiente, sem atmosfera controlada, para caracterização das resistências dos eletrodos, e em solução tampão fosfato salino (PBS) com o volume de 100 μ L.

4.5.5 Crescimento dos filmes LBL

Antes da fabricação dos filmes LBL, os substratos de quartzo e os eletrodos interdigitados foram previamente hidrofílicos com KOH 2% em solução alcoólica por 5 minutos em banho de ultrassom, seguida de enxague com etanol e lavado com água exaustivamente, sem secar, apenas retirando o excesso de água.

Para o crescimento dos filmes LbL, os substratos foram primeiramente imersos na dispersão de RGO-SiNH₂ (0,2 gL⁻¹) com pH igual a 3,0 por 60 minutos, em seguida lavados em água por 1 minuto. A próxima camada foi fabricada utilizando o RGO-N (0,2 gL⁻¹), com o pH ajustado em 3,0 e tempo de imersão de 15 minutos, seguida de lavagem em água por 1 minuto. Desta forma, o processo se repetiu até o número desejado de bicamadas.

Ao final do crescimento dos filmes LBL, os mesmos foram secos em uma estufa com à atmosfera de ar, a 150 °C por 3 horas.

4.6 Ensaios de absorção no infravermelho próximo

Os experimentos de absorção no NIR foram realizados utilizando laser diodo de 808 nm modelo iZi (Laserline) com potência máxima de 2W. As irradiações foram realizadas a 20 cm de distância, utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico e volume de 1 mL. As medidas em células foram realizadas em placa de 96 poços a 20 cm de distância na posição vertical, com 0,6 Wcm⁻² e 200 μ L de meio de cultura. A aquisição da temperatura ocorreu com um medidor de temperatura por fluorescência FOT Lab Kit m600 (Luxtron), com uma sonda de fibra ótica.

4.6.1 Cultura de células

Para evitar contaminação das células, todos os reagentes foram esterilizados em uma autoclave, e os procedimentos aqui descritos foram realizados em uma câmara de fluxo laminar. Foram adquiridas células do carcinoma cervical humano (cérvix uterino-HeLa) do banco de células da UFRJ. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm² (TPP) contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium*, Cultilab), com 2% de L-glutamina, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 0,06 gL⁻¹ de penicilina G e 0,10 gL⁻¹ de estreptomicina (Cultilab), e incubadas em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C. o crescimento foi monitorado diariamente utilizando microscópio invertido (Nikon).

Para determinar a quantidade de células mortas, foi utilizado *trypan blue* como marcador da integridade da membrana celular, antes dos ensaios. Este corante é impermeável a membrana da célula, assim, aquelas que estão mortas são facilmente identificadas pela coloração deste marcador, devido a absorção do corante, causada por danos na membrana. Desta forma, é feita a contagem das células viáveis usando uma câmara de Neubauer com 10 µL do corante *trypan blue* adicionado com uma alíquota de 90 µL, excluindo aquelas que estão coradas. As culturas cuja a viabilidade das células foi igual ou superior a 95% foram utilizadas nos experimentos.

4.6.2 Tratamento das culturas celulares com os nanomateriais

As células cancerosas foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e tratadas com as concentrações dos nanomateriais que variaram de 1 mgL⁻¹ a 100 mgL⁻¹, todos dissolvidos no meio de cultura completo, suplementado com SBF, nas mesmas condições descritas anteriormente, durante 24 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 78 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* ressuspenso em meio de cultura fresco. Essas amostras de suspensões celulares foram usadas nos ensaios descritos a seguir. Todos os ensaios e seus controles foram realizados em triplicata.

4.6.3 Viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade foram realizados pelo método FDA (do inglês *Fluorescein diacetate uptake test*) (29). Onde 100 µl de PBS foi adicionado em cada um dos poços, seguido da adição de 100 µl da solução FDA com concentração de 10 µgL⁻¹. As amostras foram incubadas em 37 °C 5% CO₂ por 60 minutos. Em seguida foram lavadas 3 vezes com PBS e medida a fluorescência em λ_{ex} 494 nm e λ_{em} 518 nm, utilizando o espectrofotômetro Spectra Max (Molecular Devices). O sinal da fluorescência foi obtido em triplicada. Foi utilizado o método de análise de variância simples (ANOVA) para análise dos dados obtidos, utilizando o software GraphPad Prism5.0 com $p < 0,05$. Os ensaios de viabilidade foram feitos antes e depois de incidir o laser.

5 IMOBILIZAÇÃO DE RGO EM ELETRODOS MODIFICADOS PARA APLICAÇÃO EM (BIO) SENSORES

5.1 Transistores de RGO-FET modificados com Papaína para detecção do biomarcador de insuficiência renal Cistatina-C

Devido à presença de poucos grupos funcionais na estrutura do RGO, existe a necessidade de modificação de sua superfície. Neste tópico descrevemos a manufatura de filmes finos de RGO, utilizando a técnica LBL, no qual foram feitas modificações de dois RGOs diferentes, um com carga superficial positiva (RGO-SiNH₂) no qual foi usado APTES ligado covalentemente no GO seguido de redução com NaBH₄. Outro com carga negativa (RGO-N), foi reduzido via micro-ondas a partir da dopagem de nitrogênio utilizando como fonte a ureia. Evidenciamos a versatilidade na manipulação do grafeno por diferentes vias, obtendo assim propriedades distintas.

Estes dispositivos foram manufaturados em eletrodos interdigitados, para serem utilizados como FETs de porta líquida na detecção de Cis-C, no qual o receptor utilizado foi a proteína Papaína. As medidas de detecção foram realizadas em tampão PBS 1,5 mM, e em urina sintética com mesma concentração, simulando assim um sistema real de detecção para um dispositivo do tipo *point-of-care*.

5.1.1 Caracterização espectroscópica

A redução do GO foi feita de duas maneiras diferentes: uma via redução química utilizando NaBH₄ após modificação com APTES, deixando-o com uma carga superficial positiva. A outra redução foi feita via micro-ondas, na presença de ureia, para melhorar as propriedades condutoras do nanomaterial e mantendo a carga superficial negativa. Na Figura 5.1, temos um esquema simplificado do processo de oxidação do grafite para formação de GO, e as duas formas utilizadas de redução do mesmo para a produzir RGO-SiNH₂ e RGO-N.

Figura 5.1 - Esquema simplificado dos dois processos de redução, o primeiro para funcionalização e redução utilizando NaBH_4 e APTES, e o segundo método utilizando dopagem com nitrogênio via redução na presença de Ureia em micro-ondas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.2 mostra o espectro de absorção na região UV-Vis para as duas reduções. A banda de absorção do RGO-SiNH_2 ocorre em ~ 267 nm, devido a presença de ligações sp^3 , formada entre o grafeno e ao APTES covalentemente ligado. A redução não elimina completamente a presença de oxigênio, mas mantém uma condutividade muito superior ao GO, devido à restauração parcial de sua rede cristalina, permitindo assim uma melhora nessas propriedades.(152)

A redução via micro-ondas, como esperado, apresenta algumas características diferentes. Neste caso, a dopagem ocorre via troca de elemento químico. Sítios antes ocupados por oxigênio são substituídos por nitrogênio devido às altas temperaturas envolvidas no processo de redução.(149) Temperaturas de até 1200°C podem ser alcançadas neste processo, devido à formação de plasma.(150) Uma das vantagens desse método é o tempo de redução utilizado, sendo inferior a 1 minuto, enquanto métodos químicos convencionais demandam longos períodos.

Figura 5.2 - Espectros UV-Vis do RGO-SiNH₂ (reduzido via NaBH₄ após modificação com APTES) e do RGO-N, reduzido via micro-ondas na presença de Ureia.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Espectroscopia FT-IR foi utilizada para identificar os grupos funcionais presentes nos dois nanomateriais sintetizados. Na Figura 5.3, para o RGO-SiNH₂, observa-se a presença de duas novas bandas; em 2957 e 2930 cm⁻¹, correspondentes ao estiramento simétrico dos grupos metila $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ e metileno, respectivamente.(153) Observa-se em 1725 cm⁻¹ a vibração de estiramento do grupo carbonila (C=O) em menor intensidade comparativamente ao GO ou devido ao processo de redução. Em 1655 cm⁻¹, têm-se uma banda de baixa intensidade deslocada de 30 cm⁻¹ em relação ao GO (1625 cm⁻¹), que pode ser devida a grupos carboxílicos ionizados, água adsorvida no GO, além de haver influência de dois efeitos opostos, a conjugação (–C=C–C=O) e interrupção (–C=C–C=C–). Pode também estar relacionada a domínios não gráfiticos presentes na estrutura do RGO-SiNH₂ e o deslocamento para maiores frequências sugere uma reação do APTES com os anéis benzênicos das folhas de GO.(154–156) A banda em 1577 cm⁻¹ é uma sobreposição de bandas, correspondendo à formação de domínios (C=C) durante a redução com o NaBH₄. A banda em 1292 cm⁻¹ corresponde à deformação assimétrica do grupo NH₂. Já a banda em 1220 cm⁻¹ corresponde ao modo de vibração de (C–O–C), que também está presente também no GO.(146) Por ser uma ligação forte, a banda em 1220 cm⁻¹ não sofre alteração significativa na presença do APTES. Em 1130 e 1050 cm⁻¹, temos os modos de vibração assimétricas para as ligações (Si–O–Si) e (Si–O–C), com um deslocamento de aproximadamente 30 cm⁻¹ para baixas frequências e 30 cm⁻¹ para altas frequências, respectivamente. A banda em 775 cm⁻¹ (Si–O–C), no APTES, praticamente desaparece na presença do RGO. Estes deslocamentos sugerem a funcionalização covalente do grafeno com o APTES.(157)

Figura 5.3 - Espectros FT-IR para as amostras de GO, RGO-SiNH₂ e APTES, com a identificação dos principais grupos presentes e a variações em cada amostra

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.4 apresenta os espectros de FT-IR do RGO-N e RGO (reduzido via NaBH₄). Este último foi utilizado como referência para definição das bandas do RGO-N. A redução que utiliza NaBH₄ apresenta somente três bandas características 1715, 1575, 1204 cm⁻¹, correspondendo respectivamente a (C=O, C=C e -C-O-C-).(158) As duas primeiras bandas também estão presentes no RGO-N, com pequenos desvios no número de onda, 1735 e 1570 cm⁻¹ respectivamente. Esta última pode também corresponder à ligação (C=N).(159-160) Em 3380 cm⁻¹, temos uma banda característica de grupos (N-H e/ou O-H).(160-161) A banda em 1380 cm⁻¹ está relacionada ao modo de vibração de (C-N).(162) A região compreendida entre 1300 e 900 cm⁻¹ que no RGO é definida como sendo um grupo epóxido, no RGO-N essa região se decompõem em três bandas, 1208, 1153, 1094 cm⁻¹ respectivamente são definidas como (-C-O-C-, C=N, C-N).(146,160,163)

Figura 5.4 - Espectros FT-IR para as amostras de RGO e RGO-N, com a identificação dos principais grupos presentes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para confirmar os efeitos da dopagem com nitrogênio no RGO-N e a funcionalização do RGO-SiNH₂, foi utilizada a técnica de XPS. Na Figura 5.5 são mostrados os espectros XPS para GO, RGO-N e RGO-SiNH₂ no modo varredura. Observa-se que a dopagem com nitrogênio ocorreu com sucesso no RGO-N, e que a presença de silício no RGO-SiNH₂ confirma a funcionalização com APTES.

Os espectros XPS da Figura 5.5 mostram que todas as amostras apresentam alguns contaminantes, como a presença de enxofre no GO, que provém da oxidação do grafite, com aproximadamente 1% peso, estando em acordo com resultados encontrados na literatura.⁽¹⁶⁴⁾ O elemento Boro está presente no RGO-SiNH₂ indicando que no processo de redução com NaBH₄, este foi introduzido na matriz do GO.⁽⁶²⁾

O RGO-N, apresentou uma quantidade maior de impurezas como Flúor e Fósforo comparativamente ao RGO-SiNH₂, com quantidades inferiores a 1%. Essas impurezas podem estar relacionadas à manipulação do nanomaterial e com a vidraria utilizada.

Figura 5.5 - Espectros de XPS no modo de varredura para as amostras a) GO, b) RGO-N e c) RGO-SiNH₂ com a identificação dos principais picos.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da deconvolução dos picos que aparecem nos espectros de varredura do XPS, podemos obter os valores em porcentagem de cada elemento encontrado em cada uma das três amostras, como mostra a Tabela 5.1. Houve uma diminuição significativa da quantidade de oxigênio em todas as amostras, sendo esta redução menor no RGO-SiNH₂, devido à ligação covalente entre o Si com O, impedindo assim uma maior eliminação de oxigênio neste caso. Já na amostra de RGO-N houve uma diminuição da quantidade de oxigênio e um aumento na incorporação de nitrogênio, sendo este valor compatível com outros métodos de síntese utilizando ureia (165) e superior a outros métodos onde se utiliza amônia como fonte de nitrogênio.(74,161,166)

Tabela 5.1 - Concentrações em % em massa de cada elemento encontrado nos nanomateriais sintetizados

	C 1s	O 1s	N 1s	Si 2p	B 1s	F 1s	P 2p	S 2p
GO	68	30	1	—	—	—	—	1
RGO-SiNH₂	71	18	3	4	4	—	—	—
RGO-N	71	13	10	4	—	0,44	0,35	1

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.6 apresenta os espectros XPS de alta resolução para as amostras de GO, RGO-N e RGO-SiNH₂, respectivamente para a banda do carbono C 1s. Por deconvolução é possível determinar a energia de ligação e estimar a proporções das ligações presentes no material.

O espectro de alta resolução para a banda C 1s mostrado Figura 5.6a para o GO apresenta três picos referentes a ligação de C–C/C=C (284,3 eV), C–O (286,3 eV) e C=O (287,5 eV).(167) Quantitativamente, as intensidades relativas das duas últimas bandas decrescem após a redução, como indicado na Figura 5.6, onde têm-se quatro picos que correspondem às ligações C–C/C=C (284,1 eV), N–sp² (285,5 eV), N–sp³ (286,5 eV) e –C=O (288,8 eV).(74,168) Na Figura 5.6c, observa-se quatro picos relacionados às ligações C–C/C=C (284,3 eV), C–O (286 eV), C=O (288,2 eV), $\pi \rightarrow \pi^*$ satélite, indicando a formação de um sistema aromático ou conjugado (292,5 eV).(169-170)

Figura 5.6 - Espectros XPS de alta resolução para as amostras: a) GO, b) RGO-N, c) RGO-SiNH₂

Fonte: Elaborada pelo autor.

A título de comparação, o percentual de cada ligação (C 1s) é mostrado na Tabela 5.2. Observa-se que a restauração da rede cristalina teve um aumento significativo nas duas reduções, sendo este aumento maior para o RGO-N. Isto explica em parte a sua maior condutividade e outras propriedades elétricas que serão discutidas adiante.

Tabela 5.2 - Porcentagem da quantidade de ligações químicas para cada grupo ligado ao carbono.

		GO (%)	RGO-N (%)	RGO-SiNH ₂ (%)
C-C/C=C	284,3	40,5	66,9	62,1
C-O	286,3	46,1	—	29,2
C=O	287,5	13,4	9,0	7,4
N-sp²	285,6	—	17,1	—
N-sp³	286,7	—	7,0	—
$\pi \rightarrow \pi^*$	292,5	—	—	1,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os espectros de alta resolução para as bandas N 1s foram deconvoluídos em três picos, N-piridinico (398,1 eV), N-pirrolico (400 eV) e N-grafítico (402 eV), e a proporção das ligações é indicada na Figura 5.7a, respectivamente (22,6%, 74,9%, 2,5%).(74) Na Figura 5.7b, observam-se os picos para o RGO-SiNH₂, que correspondem a C-NH₂ (399,3 eV) e amina protonada C-NH₃⁺ (401,3 eV), nas proporções de 42,4% e 57,6% respectivamente.(171)

Figura 5.7 - Espectros XPS em alta resolução para os grupos N 1s presentes nas amostras: a) RGO-N, b) RGO-SiNH₂.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Caracterização dos filmes LBL

Melhorar a dispersão do RGO em água é um dos objetivos quando se funcionaliza este nanomaterial, diminuindo assim a agregação que ocorre com a diminuição dos grupos oxidados durante o processo de redução. Além disso, as cargas de superfície refletem a performance e alteram as propriedades do material. Através da medida do potencial zeta foi possível avaliar se a funcionalização esperada para o RGO-SiNH₂ ocorreu de fato, avaliando o valor deste potencial em função do pH. Em geral, partículas com potencial zeta maiores em |módulo| que 30 mV são consideradas dispersões estáveis. Estes valores são suficientes para garantir a estabilidade do colóide.(172)

A Figura 5.8 mostra como varia o potencial zeta em função do pH (2,0 a 9,5) para as amostras de RGO-SiNH₂, RGO-N e GO. As diferenças nos potenciais químicos de superfície são evidentes, onde o máximo de estabilidade de RGO-SiNH₂ é obtido entre o pH 2,5 – 3,5 e o ponto isoelétrico aproximadamente em pH 9, desta maneira podemos considerar que o

APTES ligou-se aos grupos hidroxilas do GO, deixando exposto os grupos $-\text{NH}_3^+$, que conferem o caráter positivo do potencial de superfície.(173) Embora a carga superficial líquida seja positiva em relação à faixa de pH ácido, a cobertura do RGO com APTES não foi completa, devido à presença de grupos fenólicos não ligados ($-\text{OH}$), o que explica a estabilidade do RGO- SiNH_2 em pH básico.(172)

Para RGO-N, observamos uma diminuição do seu potencial zeta em relação ao GO, devido à diminuição dos grupos funcionais do nanomaterial durante a redução, mas apresentou boa estabilidade em pH básico devido a presença de grupos hidroxilas. Seu ponto isoelétrico está em torno do pH 3,5 devido à presença também de grupos fenólicos. O GO foi utilizado como referência, uma vez que é estável em todo o intervalo de pH estudado, devido à presença de grupos funcionais ($-\text{OH}$, COOH , $\text{C}=\text{O}$).(172)

Figura 5.8 - Potencial Zeta para as amostras de GO, RGO- SiNH_2 e RGO-N variando o valor de pH de 2,0 a 9,5. Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses resultados são de grande importância para determinar as melhores condições de crescimento dos filmes automontados, uma vez que a carga superficial das partículas, o pH da solução e força iônica são essenciais na construção de filmes automontados.

Algumas condições experimentais devem ser levadas em consideração no processo de adsorção das nanopartículas sobre substratos sólidos, como a concentração, pH, o tipo de substrato usado e o tempo de imersão. Neste trabalho, foram estudados o pH e o tempo de adsorção para ambas as soluções de RGO- SiNH_2 e RGO-N. A Figura 5.9a mostra como varia a intensidade da banda de absorção do RGO para diferentes valores de pH, e observa-se que em pH 3,0 ocorre a melhor absorção dos materiais ao substrato, coincidindo com os valores

de máximo do potencial zeta descritos anteriormente. Para RGO-N (Figura 5.9b), a melhor condição de crescimento ocorreu em pH 3. Como foi visto na figura do potencial zeta, neste ponto o potencial está ligeiramente positivo, e mesmo nessas condições foi verificado uma maior absorção, este efeito pode estar ligado ao fato do RGO-SiNH₂ possuir tanto grupos positivos ($-\text{NH}_3^+$), quanto grupos negativos ($-\text{OH}$), e em pH básico a carga líquida da superfície com o grafeno adsorvido tende a ser mais negativa do que positiva, ocorrendo assim uma maior repulsão das folhas de RGO-N.

Figura 5.9 - Estudo da influência do pH na adsorção dos filmes automontados, com monitoramento do crescimento via espectroscopia UV-Vis, onde em: a) Absorbância em 268 nm para o RGO-SiNH₂, b) Absorbância em 268 nm para o RGO-N.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A soma das interações partícula/substrato, partícula/partícula, partícula/solvente e solvente/substrato resulta na adsorção do eletrólito e a cinética desses processos constituiu uma etapa importante na construção de filmes automontados. Microbalança de quartzo foi utilizada para monitorar em tempo real a massa do nanomaterial que adsorve na superfície de uma fina camada de ouro. Os tempos utilizados no crescimento dos filmes foram de 60 minutos para camada positiva (RGO-SiNH₂) e 15 minutos para a camada negativa (RGO-N), como mostra a Figura 5.10.

Figura 5.10 - Curvas de adsorção utilizando microbalança de quartzo para as amostras a) GO-SiNH₂, b) RGO-N. Fonte: Elaborada pelo autor.

O comportamento assintótico da massa adsorvida no substrato da microbalança em função do tempo sugere a ocorrência do processo cinético de primeira ordem,(174-175) também foi utilizado outro modelo que considera a cinética controlada por difusão, mas não se ajusta a essas curvas. Conforme a equação.

$$M_{(t)} = M_{max} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad (9)$$

Onde $M_{(t)}$, M_{max} , τ , são a massa adsorvida em um tempo (t), a massa máxima adsorvida e constante de tempo respectivamente. Os dois últimos valores foram obtidos utilizando o software OriginLab 9,0 e os valores são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Parâmetros utilizados no ajuste teórico da equação 10 para as curvas de cinética de adsorção dada pela microbalança.

Amostras	M_{max} ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	τ (s)	R^2
RGO-SiNH₂	$16,444 \pm 0,004$	$15,332 \pm 0,012$	0,999
RGO-N	$1,367 \pm 0,016$	$1,444 \pm 0,002$	0,829

Fonte: Elaborada pelo autor.

Espectroscopia UV-Vis foi utilizada para monitorar o crescimento dos filmes LbL em substratos de quartzo nas melhores condições aqui estudadas. Na Figura 5.11a, são mostrados os espectros UV-Vis em função do número de bicamadas (RGO-SiNH₂/RGO-N)_n onde o

crescimento é feito até a 5ª bicamada. Na Figura 5.11b, é feito o ajuste linear do crescimento em função do número de bicamadas.

Figura 5.11 - Espectro UV-Vis dos filmes automontados: a) (RGO-SiNH₂/RGO-N) com a banda de absorção em 268 nm, onde os números indicam o sentido do crescimento das bicamadas, b) Dependência linear da absorção com o número de bicamadas medido no comprimento de onda de 268 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a automontagem dos filmes de (RGO-SiNH₂/RGO-N)_n, onde n, é o número de bicamadas nos eletrodos interdigitados, exibiram uma alta resistência elétrica (da ordem de MΩ). Contudo, quando secos em estufa a temperatura a 150 °C, a resistência elétrica teve uma redução considerável. Neste sentido, filmes crescidos em quartzo foram monitorados por UV-Vis, variando de 1 a 24 horas o tempo de secagem. Como mostrado na Figura 5.12a, o máximo de absorção tem um pequeno deslocamento de (~3nm) além do aumento da absorção. O deslocamento da banda pode estar relacionado com a diminuição do espalhamento devido à reorganização das folhas de RGO no substrato. Já a diminuição da concentração de oxigênio nos filmes justifica o aumento da absorção. Após 1 hora, observa-se que o filme não apresenta um aumento significativo na absorção (Figura 5.12b).

Figura 5.12 - Estudo da influência do tempo de secagem dos filmes LBL, utilizando espectroscopia UV-Vis; a) Espectro para o tempo inicial sem secagem e após 3 horas, b) Para o comprimento de onda da absorção em 268 nm em função do tempo de secagem em 150 °C
Fonte: Elaborada pelo autor.

Filmes de $(\text{RGO-SiNH}_2/\text{RGO-N})_n$ foram crescidos em eletrodos metálicos interdigitados, e a resistência elétrica dos filmes foi monitorada camada por camada, iniciando tanto com uma camada positiva, quanto com uma negativa. Nos filmes onde o crescimento foi iniciado com a camada negativa, uma modificação prévia do substrato foi realizada com APTES, com o objetivo de manter a carga do substrato positiva.

A Figura 5.13a mostra que a resistência elétrica decai em função do número de camadas. Observa-se que para as 4 primeiras, houve uma substancial queda na resistência para os filmes que começaram com a camada negativa. Isto se deve ao tamanho das folhas de RGO-N que são menores que as folhas de RGO-SiNH₂ e consequentemente, ocorre um menor recobrimento do substrato e, por conseguinte, uma maior resistência. Além disso, devido a presença de APTES imobilizado, temos uma indução da resistência de contato entre o eletrodo e o RGO-N. Depois da sexta camada não houve significativa variação na resistência para os filmes sem a secagem, e isso se deve à organização dos nanomateriais no filme à medida que cresce no número de camadas. A Figura 5.13b, mostra a comparação da resistência de um filme de 5 bicamadas sem a secagem, e com um filme seco. A Figura 5.13c mostra a comparação entre a variação da resistência em função do número de bicamadas $(\text{RGO-SiNH}_2/\text{RGO-N})_n$, para n igual a 1, 3 e 5 bicamadas, nas duas situações, sem secagem e secagem após 3 horas. Como é observado, para os filmes secos, houve uma diminuição de duas ordens de grandeza da resistência, para os três filmes. Como a água está envolvida no

processo de fabricação desses filmes nanoestruturados, não é surpreendente que a água adsorvida possa desempenhar um papel importante. Isto é especialmente verdadeiro em relação às propriedades elétricas, como aqui discutido. Esta diminuição da resistência observada em todas as situações se deve majoritariamente à evaporação da água, que funciona como centros espalhadores de carga, diminuindo assim a condutividade. Quando secos, as partículas se empacotam tornando os filmes mais compactos, diminuindo a rugosidade e aumentando o empacotamento das folhas e consequentemente o contato entre elas. A Figura 5.13d mostra que a distribuição média da resistência dos filmes obtidos após a secagem encontra-se em torno de 1500Ω . Este resultado foi obtido por um ajuste gaussiano a partir de uma amostragem de 45 eletrodos.

Figura 5.13 - a) Variação da resistência em função do número de bicamadas, b) Comparação das resistências para filmes sem secagem e com secagem após 3 horas, c) Variação da resistência em função do número de camadas para um filme de 5 bicamadas sem secagem e seco, d) Distribuição gaussiana de 45 eletrodos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As rugosidades dos filmes foram obtidas por AFM, para 1, 3 e 5 bicamadas e os resultados são mostradas na Tabela 5.4. As imagens foram feitas varrendo uma área de $10 \times$

10 μm , do qual foram retirados os valores da rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (Rq).

Tabela 5.4 - Rugosidade média (Ra) e rugosidade média Rq dos filmes de 1, 3 e 5 bicamadas.

Filmes	Rugosidade média Ra (nm)	Rugosidade média Rq (nm)
1 Bi	$6,3 \pm 1,1$	$12,8 \pm 3,1$
3 Bi	$6,7 \pm 0,8$	$12,4 \pm 2,0$
5 Bi	$8,6 \pm 0,2$	$13,8 \pm 0,4$

Fonte: Elaborada pelo autor.

A rugosidade média é dada:

$$Ra = \sum_{j=1}^N \frac{|Z_j - Z^*|}{N} \quad (10)$$

E a rugosidade média quadrática Rq, é dada:

$$Rq = \sqrt{\sum_{j=1}^N \frac{|Z_j - Z^*|^2}{N - 1}} \quad (11)$$

Onde Z_j é a altura em um dado ponto e Z^* é a média de todas as alturas e N a quantidade de pontos medidos.

Como visto na Tabela 5.4, os valores de rugosidade Ra e Rq aumentam ligeiramente com o número de bicamadas, isto se deve ao fato das folhas de grafeno serem da ordem de poucos nanômetros ($\sim 1\text{nm}$), e ao tratamento térmico dado aos filmes, que elimina a umidade, empacotando assim as folhas de RGO em um filme com baixa porosidade.

Na Figura 5.14, são apresentadas as morfologias para os filmes de 1, 3 e 5 bicamadas em visualização 2D e 3D, como se observa, os filmes apresentam grande homogeneidade, mesmo para uma bicamada, no qual não é esperado um completo preenchimento do substrato com os RGOs, também nota-se a presença de alguns poucos agregados, que aparecem durante o processo de redução do GO.

Figura 5.14 - AFM para os filmes de a) 1 bicamada, b) 3 bicamadas, c) 5 bicamadas: onde a esquerda é vista a superfície topográfica e a direita temos uma visão tridimensional dos filmes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Caracterização do FET

No desenvolvimento dos dispositivos de efeito de campo, leva-se em conta fatores inerentes ao material e à sua forma de processamento, como dopagem, funcionalização,

deposição e crescimento de filmes.(29,176–179) Considera-se também os fatores experimentais, como o eletrólito, eletrodo utilizado na porta, *drift* de corrente/potencial, corrente de fuga, velocidade de varredura da tensão V_{GS} e a tensão de dreno V_{DS} .(180–182) Neste tópico foram estudados vários desses fatores que influenciam o desempenho dos dispositivos. Para verificar a influência do dopante N no RGO, filmes crescidos de (RGO-SiNH₂/RGO(NaBH₄))₅ foram comparados com filmes (RGO-SiNH₂/RGO-N)₅. Como pode ser observado na Figura 5.15a, existe um deslocamento do potencial mínimo de condutividade, também conhecido como potencial de Dirac (V_D). Este ponto está deslocado de 80 mV para o grafeno quimicamente reduzido com NaBH₄ em relação ao RGO-N. A posição desta tensão V_D , está relacionada a diversos fatores: o principal é a presença de Boro na matriz do nanomaterial, que confere uma dopagem do tipo **p** para o GO reduzido via NaBH₄ e uma dopagem do tipo **n**, para a redução via ureia. Como o dispositivo é baseado na superposição de camadas positivas e negativas, e as camadas positivas (RGO-SiNH₂) possuem mais material, como mostrado pelos experimentos feitos com microbalança de quartzo, ambos os filmes tiveram um caráter de dopagem do tipo **p**.

Figura 5.15 - a) Curva de transferência para os filmes de (RGO-SiNH₂/RGO-N)₅ e (RGO-SiNH₂/RGO(NaBH₄))₅ com a corrente I_{DS} normalizada, b) Curva de transcondutância para os dois dispositivos em estudo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A transcondutância de um transistor representa a capacidade de amplificação que é muito importante para aplicações de amplificador de sinal, de potência e de duplicação de frequência.

A transcondutância é definida por:

$$g_m = \frac{dI_{DS}}{dV_{GS}} \quad \text{com } (V_{DS} = \text{const.}) \quad (12)$$

Desta forma obtemos os valores da transcondutância a partir da derivada numérica da curva de transferência, com aplicação de um filtro *savitzky-Golay* com polinômio de grau de 2. Os resultados são mostrados na Figura 5.15b, onde nota-se uma maior transcondutância para o RGO-N. Como demonstrado por Late e colaboradores, a redução com dopagem de nitrogênio aumenta a transcondutância em relação à redução via NaBH₄ em virtude da maior mobilidade eletrônica do RGO-N.(183) A presença de um dopante reflete na taxa I_{on}/I_{off} , que mede a usabilidade de um dispositivo, que maximiza o ganho e minimiza a corrente de fuga. Para os dispositivos feito com RGO-N, a taxa I_{on}/I_{off} obtida foi de ~3, enquanto para o reduzido com NaBH₄ ficou em ~1, em compatibilidade com outros dispositivos encontrados na literatura.(184–186)

Outra característica importante a ser levada em conta é o eletrodo de referência utilizado no potencial de porta (V_{GS}). Na Figura 5.16a foi utilizado um fio de platina, de ouro e um eletrodo de Ag/AgCl, onde os potenciais V_D , foram 0,120, 0,380 e 0,740 V, respectivamente. A diferença da posição do ponto V_D , está diretamente relacionada com a função trabalho do material utilizado. Neste trabalho foi utilizado o eletrodo de Ag/AgCl, devido ao baixo valor V_D , além de menor interação com outras espécies na solução, como proteínas e outras moléculas, como demonstrou Minot e colaboradores.(187) No uso do eletrodo de platina pode ocorrer uma maior corrente de fuga e uma aglomeração de contra-íons na superfície do RGO, devido aos altos potenciais empregados.(188)

Quando um potencial V_{GS} é aplicado, os íons livres na solução tendem a se acumular perto do eletrodo, criando uma carga contrária ao potencial e uma carga não compensada perto da interface. A acumulação é limitada pelo gradiente de concentração, que se opõe à força coulombiana do campo elétrico. Quando um estado estacionário é atingido, a distribuição de carga se assemelha à mostrada na Figura 5.16b. Esta camada elétrica atua como um isolante onde a espessura é determinada pela equação de Debye-Huckel, onde a força iônica irá determinar o tamanho dessa dupla camada.(178-179)

Figura 5.16 - a) Curva de transferência com variação do eletrodo de referência na porta, b) esquema da formação da dupla camada e comprimento de Debye na porta do dispositivo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 5.17a, o filme de RGO com 1 bicamada, exibe um comportamento unipolar de condução, o que não era esperado, como previsto em outros trabalhos.(90) Uma possível explicação para esse fenômeno é a transferência de carga positivas para o filme durante o tratamento térmico.(29,177) Uma vez que o número de camadas é aumentado, a espessura do filme aumenta e a influência do substrato diminui. Neste sentido, os filmes passam a ter o comportamento esperado para um RGO, que é a sua condução ambipolar, como mostra a Figura 5.17b e c.

Outro ponto a ser considerado é a ausência de *drift* na tensão V_D com o aumento do número de bicamadas, o que se deve à menor influência do RGO-N, pois a quantidade de material adsorvido é uma ordem de grandeza inferior à quantidade de material adsorvido de RGO-SiNH₂, como mostram os resultados de microbalança de quartzo. A Figura 5.17d, mostra a curva de saída $V_{DS} \times I_{DS}$, para os 3 filmes estudados para V_{GS} de 0,05 V.

Figura 5.17 - a) Curva de transferência para o filme de 1 bicamada em função de V_{DS} : 0,01, 0,02 e 0,03 V, b) filme de 3 bicamadas, c) filme de 5 bicamadas, d) Curva de saída para os 3 filmes com V_{GS} : 0,05 V

Fonte: Elaborada pelo autor.

A corrente de fuga porta-dreno, teve uma variação de 0,45% a 2% para uma variação de potencial V_{GS} de -0,2 a 0,2 V. Esses valores são similares a outros dispositivos encontrados na literatura, utilizando a mesma janela de potencial.(190-191) O eletrólito-porta, devido aos íons dissolvidos na solução, permite uma maior fuga de corrente, como mostra a Figura 5.18a, em que a corrente de fuga aumenta com o aumento da força iônica.

Figura 5.18 - a) Corrente de fuga em função da força iônica, *inset*: zoom da região entre -0,2 à 0,2 V da tensão V_{GS} , b) curva de transferência em função da força iônica.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Quando um eletrólito/solução está em contato com um sólido, temos a formação de uma dupla camada como descrito anteriormente. Ao se formar essa camada, é necessário um tempo para que o sistema entre em equilíbrio, e desta forma, a corrente I_{DS} vai sofrer um desvio ao longo do tempo até chegar a saturação, característica intrínseca de todos os FETs. O desvio da corrente I_{DS} para o tampão PBS 150 mM e 15 mM, foi muito pequena e rápida, diferentemente da concentração 1,5 mM, que não tem um ponto de estabilidade definido, mesmo para tempos maiores de estabilização. Mas essa variação é muito pequena para tempos pequenos, como mostra a Figura 5.19a. Na Figura 5.19b, temos a medida do *drift* de corrente I_{DS} para tempos mais longos, onde foi observado um aumento de corrente até 20 minutos, seguida de uma queda contínua. Devido ao baixo volume de solução empregado (100 μ L), foi adicionado ao longo do experimento mais PBS, para garantir que o efeito do deslocamento da corrente não fosse influenciado pela evaporação da solução, e como se observa o comportamento manteve-se o mesmo, evidenciando que a evaporação não é um dos fatores que influencia o deslocamento da corrente.

Figura 5.19 - a) Corrente de dreno para PBS 1,5 mM, 15 mM e 150 mM, em função do tempo, b) Corrente de dreno para PBS igual à 1,5 mM para tempo mais longos (3 horas).
Fonte: Elaborada pelo autor.

As propriedades de transporte de carga do RGO são muito sensíveis ao ambiente, onde a presença de moléculas adsorvidas (água, impurezas) mudam o comportamento do nanomaterial. Uma dessas características é o efeito de histerese. Este comportamento tem uma dependência com a velocidade de varredura na tensão de porta o range de tensão utilizado, e a direção da varredura. A Figura 5.20a, mostra a variação da tensão V_D em função da velocidade de varredura em diferentes concentrações de tampão. Nota-se que a quantidade de sal presente não afeta o comportamento de histerese do sistema, além de manter a mesma variação de tensão. Na Figura 5.20b, mostramos as curvas de transferência para as velocidades $0,01 \text{ Vs}^{-1}$, $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ e $0,4 \text{ Vs}^{-1}$, onde a corrente de dreno aumenta para menores velocidades de varredura.

Figura 5.20 - a) variação da tensão V_D em função da velocidade de varredura para diferentes forças iônicas, b) curva de transferência em função das velocidades de 0,4 $V.s^{-1}$, 0,1 $V.s^{-1}$ e 0,01 $V.s^{-1}$.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda estudando o comportamento dos filmes em relação a velocidade de varredura, temos na Figura 5.21a variação da velocidade de varredura no sentido $-V_{GS}$ a $+V_{GS}$ (sentido direto) e $+V_{GS}$ a $-V_{GS}$ (sentido inverso) para as velocidades de 0,02 $V.s^{-1}$, 0,04 $V.s^{-1}$, 0,2 $V.s^{-1}$ e 0,4 $V.s^{-1}$. Ambas direções apresentam esse fenômeno, sendo mais acentuado no sentido da tensão positiva para a negativa. Para velocidades altas de varredura, a tensão V_D , está 0,2 V deslocado do V_D , que vai no sentido direto. Para baixas velocidades não ocorre esse deslocamento, mas sim uma diferença de 1,93 μA em $V_D = 0,04$ V. Este comportamento pode ser explicado pela presença de água e outras moléculas adsorvidas no filmes, onde existe dois mecanismos possíveis, transferência de carga e barreira capacitiva.(180,191)

Figura 5.21 - Variação da velocidade de varredura para 4 velocidades no sentido direto (seta azul) e sentido inverso (seta vermelha) com as velocidades de $0,4 \text{ Vs}^{-1}$, $0,2 \text{ Vs}^{-1}$, $0,04 \text{ Vs}^{-1}$ e $0,02 \text{ Vs}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.4 Biossensor de Cis-C

A Cis-C é uma proteína não glicosilada de baixo peso molecular (13,3 KDa), membro de uma superfamília de inibidores de proteinase, é a única da família das Cistatinas que está presente em todas as células nucleares humanas. Possui o ponto isoelétrico de 9,3, permanecendo assim positivamente carregada em todos os fluidos do corpo.(193-194) Devido à essas características, a Cis-C é livremente filtrada pelo glomérulo, não é segregada, mas reabsorvida pelas células epiteliais tubular e em seguida catabolizada de modo que não retorna ao sangue.(192,194) Desta forma a Cis-C é utilizada como marcador da Doença Renal Crônica (DRC). Uma vantagem do seu uso como marcador, é que esta não varia em função da idade, sexo, massa muscular e etnia, o que garante uma maior precisão no diagnóstico.(192) Além disso, sofre pouca interferência com outras moléculas. As concentrações normais de

Cis-C em soro para indivíduos entre 19 e 49 anos é de (530 ngmL⁻¹ – 920 ngmL⁻¹), e para indivíduos acima de 50 anos, os valores estão compreendidos entre (580 ngmL⁻¹ – 1020 ngmL⁻¹). (193) Os valores normais de Cis-C em urina são (30 ngmL⁻¹ – 300 ngmL⁻¹), com pouca variabilidade entre idade e sexo. (195) Portanto, níveis fora dos padrões supracitados podem garantir um diagnóstico confiável na detecção de DRC.

Os dispositivos de grafeno foram utilizados na detecção da proteína Cis-C, com a imobilização da proteína Papaína pelo protocolo descrito nos materiais e métodos, utilizando o agente reticulante Glutaraldeído. Foram utilizados os filmes com a última camada positiva, ou seja, utilizaram-se filmes de 4 bicamadas e mais uma camada de RGO-SiNH₂.

Uma limitação dos dispositivos de efeito de campo com eletrólito-porta é o chamado comprimento de Debye (λ_D), que é formada por uma dupla camada elétrica próxima à superfície do dispositivo, da ordem de alguns nanômetros. Este valor se torna importante devido à distância da superfície do FET na qual o dispositivo consegue sentir a alteração da carga onde $d < \lambda_D$, desta forma λ_D pode ser calculado por:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r kT}{2 \times 10^3 N_A e^2 I}} \quad (13)$$

Onde ϵ_0 é a permissividade da água em 25 °C, ϵ_r a permissividade do vácuo, k a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, N_A número de Avogadro, e é a carga elementar, e I a força iônica da solução, que é dada pela soma de todos os íons presentes na solução:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i Z_i^2 \quad (14)$$

Onde c_i é a concentração do íon, e Z_i é a carga.

Usando as duas equações acima, para um tampão PBS 1,5 mM temos um λ_D igual a 7,45 nm. Ou seja, uma região onde a alteração de cargas devido às interações receptor-analito ou papaína-CiC pode ser medida em biossensores do tipo FET.

A curva antes e depois da imobilização feita em tampão PBS 1,5 mM é mostrada na Figura 5.22. A curva de transferência sofre um deslocamento de 0,05 V no ponto V_D do filme sem e com imobilização contendo papaína. Devido ao ponto isoelétrico da papaína ser 9, no

pH utilizado (7,4) a proteína tem uma carga global positiva, causando assim esse ΔV_D no sistema.

Figura 5.22 - Curva de transferência para um filme sem imobilização e com um filme com papaína imobilizada. Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente foi adicionado tampão PBS 1,5 mM nove vezes para verificar variações nas curvas de transferência, como mostra a Figura 5.23a. Em seguida alíquotas de Cis-C nas concentrações variando de 0,1 a 100 ngmL⁻¹ foram adicionadas, Figura 5.23b). As medidas foram realizadas após 10 minutos da adição das soluções, e esse padrão foi mantido para todas as análises.

Figura 5.23 - Curvas de transferências para a) 9 adições de tampão PBS 1,5 mM, b) Adição de 0,1 a 100 ngmL⁻¹ de Cis-C: inset: Corrente I_{DS} em V_{GS} igual a -0,2 V em função da concentração.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.24a, mostra um zoom perto da região de tensão V_D , indicando o sentido da variação da corrente e tensão em função da concentração de Cis-C. Devido à diferença entre os eletrodos, foi necessário normalizar os resultados para melhor compreensão da reprodutibilidade do sistema, e para isso a normalização foi feita pela equação:

$$\Delta I_{DS}(\%) = \frac{(I_{DS}Amostra - I_{DS}Branco)}{I_{DS}Branco} \times 100 \quad (15)$$

A sensibilidade, a linearidade e o limite de detecção (LD), foram estimados em, $2,06 \pm 0,07 \Delta I_{DS}(\%) \text{ngmL}^{-1}$, $(0,5 \text{ ngmL}^{-1} - 100 \text{ ngmL}^{-1})$ e $0,4 \text{ ngmL}^{-1}$, respectivamente. A Figura 5.24b, mostra a curva analítica.

Figura 5.24 - a) Curva de transferência para um filme com V_{DS} igual a 0,01 V em tampão PBS 1,5 mM, b) Curva de calibração do sistema.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A Figura 5.25a mostra as curvas de saída para 3 concentrações da curva de calibração medidas ($0,1$, 10 e 100 ngmL^{-1}). Devido ao P.I. do complexo Cis-C/Papaína ser positivo no pH 7.4, a corrente tende a diminuir com a concentração de analito e a tensão V_D desloca para a direita.(25) Para obter os valores de tensão V_D , foi necessária a interpolação dos dados, devido ao intervalo de medidas utilizado. Utilizando a variação da tensão de porta, obtivemos uma sensibilidade de $0,13 \text{ mV/ngmL}^{-1}$, LD de $4,68 \text{ ngmL}^{-1}$, e linearidade entre $(5 \text{ ngmL}^{-1} - 100 \text{ ngmL}^{-1})$. O desvio padrão foi calculado com 3 amostras diferentes, como mostra a Figura

5.25b. Esta variação na tensão de porta indica que houve interação antígeno-anticorpo.(15,196)

Figura 5.25 - a) Curva de transferência normalizada variando a concentração em 0,1, 5 e 100 ngmL⁻¹, b) Curva de calibração para variação da tensão V_D em função da concentração com V_{DS} : 0,01 V.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 5.26 mostramos a curva de estabilização do sistema (I_{DS} x tempo) para um tempo de 10 minutos, para todas as amostras, para um V_{DS} de 0,01 V e V_{GS} 0,2 V. As soluções foram adicionadas em um volume constante de 100 μ L, onde entre cada medida foi feita uma lavagem em tampão PBS de mesma força iônica. Na primeira curva de PBS foram feitas 5 medidas, e o sombreado é o desvio padrão dessas.

Figura 5.26 - Variação da corrente I_{DS} em função do tempo para diferentes concentrações de Cis-C, a linha sombreada indica o desvio padrão do tampão PBS 1,5 mM.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Também foi avaliada a detecção da Cis-C em urina sintética. As medidas foram realizadas nas mesmas condições do PBS, e o mesmo fator de diluição, 100x. Na Figura 5.27a temos a curva de transferência para um V_{DS} 0,01 V, variando a tensão de porta de entre -0,1 a 0,15 V. A Figura 5.27b ilustra a curva de calibração para o sistema em urina sintética, onde a sensibilidade teve uma ligeira diminuição em relação ao sistema em PBS, $1,94 \pm 0,29 \Delta I_{DS}(\%) \text{ngmL}^{-1}$. O LD foi de $0,39 \text{ ngmL}^{-1}$, e a linearidade entre ($5 \text{ ngmL}^{-1} - 100 \text{ ngmL}^{-1}$). O sistema teve uma diminuição no sinal, que pode estar relacionada com os interferentes presente na urina, diminuindo a sensibilidade do sistema, mas não invalida as medidas, uma vez que as DRC apresentam valores de Cis-C na urina, superiores aos níveis aqui estudados.

Devido às limitações impostas pelo comprimento de Debye, existe a necessidade de diluição, desta forma, para uma amostra real, as concentrações normais de Cis-C encontradas são de ($30 \text{ ngmL}^{-1} - 300 \text{ ngmL}^{-1}$), com um fator de diluição igual a 100, isto corresponderia a $0,3 \text{ ngmL}^{-1} - 3 \text{ ngmL}^{-1}$. Desta forma os dispositivos aqui estudados têm aplicabilidade no sistema proposto.

Figura 5.27 - a) Curva de transferência normalizada variando a concentração em 0,1, a 100 ngmL^{-1} em urina sintética, b) Curva de calibração para variação da corrente I_{DS} normalizada em função da concentração com V_{DS} : 0,01 V.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Sensor eletroquímico para detecção de Estradiol

Estradiol (17 β -estradiol), com fórmula linear $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$ e peso molecular de 272,39 g mol^{-1} , é um esteroide natural importante em muitos processos fisiológicos que influencia o desenvolvimento de características sexuais. Sua deficiência pode causar diversas doenças, como hiperandrogenismo, câncer, doenças do coração, osteoporose e sintomas da menopausa.(197,198) A detecção do Estradiol é importante pois a prevenção e tratamento dessas doenças podem ocorrer devido a disfunção deste hormônio.

A detecção de estradiol ocorre principalmente por técnicas como HPLC e cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massa. Estas são consideravelmente sensíveis a detecção desse hormônio mas requerem uma instrumentação com um alto custo, tempo de operação e complexa análise.(199) Desta maneira, os sensores eletroquímicos são bons candidatos para a detecção em amostras reais, sem qualquer pré-concentração ou qualquer etapa de separação e, além disso, são associadas com uma instrumentação de baixo custo.

Parte do trabalho tem como foco o uso do RGO na detecção de Estradiol por técnicas eletroquímicas. Foi utilizado DHP para uma melhor dispersão do RGO e maior aderência dos filmes de RGO no eletrodo suporte de GCE, como mostra o esquema da preparação do

eletrodo desde a esfoliação até a preparação dos filmes no sensor na Figura 5.28. A detecção foi feita em urina sintética, simulando o uso do dispositivo.

Figura 5.28 - Esquema da preparação e aplicação do RGO-DHP/GCE.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.1 Caracterização da síntese de GO e RGO–DHP

Espectroscopia no UV-Vis foi utilizada para determinar se a redução grafeno ocorreu adequadamente, como relatado em diversas publicações.⁽²⁰⁰⁾ Como mostrado na Figura 5.29a, temos a variação da banda de absorção do grafeno em função do tempo. Na Figura 5.29b, temos a comparação entre os espectros de absorção do GO e do RGO. Observamos as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em 230 nm e 270, que corresponde à dupla ligação C=C, e um ombro em 300 nm correspondente as transições $n \rightarrow \pi^*$, que está relacionada com as ligações C=O do GO. Esta é uma característica importante do grafeno, pois as propriedades deste material estão relacionadas com estas ligações químicas. O RGO tem sua estrutura cristalina parcialmente reconstituída, com a retirada de grupos contendo oxigênio, devido à diminuição de ligações sp^3 .

Neste experimento também foi avaliada a quantidade de agente redutor necessária para se retirar o máximo de grupos funcionais do GO, neste caso foi determinado o uso de 0,15 M de $NaBH_4$ e tempo final de reação em 60 minutos a 80 °C.

Figura 5.29 - a) Redução do GO em função do tempo em diferentes concentrações de NaBH_4 . b) Espectro de absorção para GO e RGO.

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.2 Caracterização eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em célula de 3 eletrodos, como mencionado na seção experimental. A área eletroativa do GCE, GO/GCE e RGO-DHP foi estimada usando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ de acordo com a equação de Randles–Sevcik.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} c \quad (16)$$

Onde I_p é o pico de corrente (A) catódica, A é a área eletroativa (cm^2), D o coeficiente de difusão ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, n é o número de elétrons transferidos na reação redox, v , é a velocidade de varredura (Vs^{-1}), e c é a concentração (mol cm^{-3}) de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

A Figura 5.30a, mostra os voltamogramas para $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ in $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl obtidos para RGO–DHP/GCE, GCE e GO–DHP/GCE em $0,1 \text{ Vs}^{-1}$. Aplicando os dados obtidos na equação 17 temos que a área eletroativa foi de 0,16, 0,30 e $0,39 \text{ cm}^2$.

Figura 5.30 - a) Voltamogramas obtidos com RGO–DHP/GCE (linha marrom), GO–DHP/GCE (linha preta) e GCE (inset) em $0,1 \text{ Vs}^{-1}$ na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl. b) Diagramas de Nyquist de RGO/DHP/GCE, GO/DHP/GCE e GCE na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl com potencial de $0,22 \text{ V}$

Fonte: Elaborada pelo autor

Foram realizadas análises de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, sigla do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*) na presença de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, com potencial de $0,22 \text{ V}$. A Figura 5.30b ilustra os diagramas de Nyquist do RGO–DHP/GCE, GO–DHP/GCE e GCE (*in set*). Os valores da resistência de transferência eletrônica dependem das propriedades dielétricas da interface eletrodo/eletrólito, sendo observado um pequeno e bem definido semicírculo em altas frequências. Como esperado, a resistência de transferência diminuiu com a modificação de GCE com RGO-DHP. Já no eletrodo modificado com GO, nota-se que aumentou a resistência de transferência eletrônica ($30,5 \text{ K}\Omega$) comparado com RGO ($2,73 \text{ K}\Omega$). Este aumento está relacionado com a presença de grupos funcionais no GO e com o aumento de ligações sp^3 , diminuindo assim a mobilidade eletrônica do material. Além disso, devido à carga superficial negativa do material, estas podem repelir o mediador redox.

5.2.3 Determinação de Estradiol usando eletrodos de RGO–DHP/GC.

Para determinar a concentração de Estradiol foi usado voltametria cíclica com eletrodos de trabalho de RGO–DHP/GCE, em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de PBS, com pH 7, e os voltamogramas foram obtidos na presença de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com velocidade de varredura de $0,1 \text{ Vs}^{-1}$, com um tempo de acumulação de 120 segundos. Tanto RGO–DHP/GCE quanto o GCE exibiram pico de corrente anódica correspondente a oxidação do Estradiol. No caso do eletrodo modificado, nota-se uma intensidade maior da corrente em

comparação do eletrodo sem a modificação. Dois picos aparecem, um anódico e um catódico próximos a 0,1 V, estes picos estão relacionados ao etanol presente na solução. No entanto esses não interferem nos estudos e na determinação do Estradiol. A Figura 5.31a mostra os voltamogramas para RGO-DHP/GCE e GCE 0,05 mol L⁻¹ de PBS e 1,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ estradiol com velocidade de varredura de 0,1 Vs⁻¹, e tempo de acumulação de 120 segundos.

Figura 5.31 - a) Voltamogramas de RGO-DHP/GCE em 0,05 mol L⁻¹ de PBS na ausência (linha laranja) e na presença (linha preta) de 1,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ estradiol com velocidade de varredura de 0,1 Vs⁻¹, com tempo de acumulação de 120 segundos. Voltamogramas de GCE (*inset*) em 0,05 mol L⁻¹ PBS (pH 7,0) na ausência e na presença de 1,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ estradiol com velocidade de varredura de 0,1 Vs⁻¹, e tempo de acumulação de 120 segundos. b) Corrente de pico anódico em função da velocidade de varredura (ln v) na presença de 1,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ de Estradiol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A resposta do eletrodo modificado foi avaliada usando a velocidade de varredura de 10 a 0,15 Vs⁻¹, em PBS e na presença de 1,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ de Estradiol como mostra a Figura 5.31b. Foi feito uma regressão linear da corrente do pico anódico (Ep) em função da velocidade de varredura (lnv), onde temos: $I_p = 8,0 \times 10^{-6} + 3,3 \times 10^{-4} v$, ($R^2 = 0,994$). α é o coeficiente de transferência v velocidade de varredura, K_s é a taxa de transferência eletrônica heterogênea, n é o número de elétrons para oxidação do Estradiol (201) e RT constante universal dos gases e temperatura, respectivamente. Este resultado sugere que a oxidação eletroquímica do Estradiol ocorre por adsorção. O pico de oxidação depende também da velocidade de varredura, que pode ser avaliada pela equação de Laviron's.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n F} \left[\ln \left(\frac{RT k_s}{\alpha n F} \right) - \ln v \right] \quad (17)$$

De acordo com Bard e Faulner, α pode ser obtido por:

$$\alpha = \frac{47,7}{E_p - \frac{E_p}{2}} \quad (18)$$

Onde $E_p/2$ é o potencial a meia altura do pico de corrente, α é igual a 0,54. O valor da constante K_s foi estimado em $0,14 \text{ s}^{-1}$, determinado por regressão linear a partir dos dados de E_{pa} em função de $\ln v$, $E_{pa} = 0,73 + 0,052 \ln v$.

A relação entre o aumento do pico de corrente de oxidação e concentração de Estradiol foi avaliada com as condições já otimizadas como mostra a Figura 5.32a. A corrente aumentou proporcionalmente com a concentração de Estradiol variando linearmente de $4,0 \times 10^{-7}$ até $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Através da regressão linear da corrente em função da corrente, obtivemos o limite de detecção que foi $7,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, como mostra a Figura 5.32b.

Figura 5.32 - a) Voltametria de varredura linear de RGO-DHP/GCE in $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ PBS na presença de $4,0 \times 10^{-7}$, $7,9 \times 10^{-7}$, $1,6 \times 10^{-6}$, $4,2 \times 10^{-6}$, $8,2 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de estradiol com tempo de acumulação de 240 segundos com velocidade de varredura de $0,15 \text{ Vs}^{-1}$. b) Curva analítica de RGO-DHP/GCE in $0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor

A repetibilidade ao longo do dia e ao longo de vários dias ($n=5$), foi analisada usando um sensor na presença de Estradiol $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo modificado exibiu um desvio padrão relativo de 2,7% e 3,8 % respectivamente. A reprodutividade ocorre com um desvio de 6,4% para cinco diferentes eletrodos durante cinco dias.

Por último, a estabilidade do sensor foi investigada analisando a resposta do Estradiol durante quinze dias, no fim deste período a variação de corrente foi de no máximo 10%.

5.2.4 Estudo de interferentes

A validação do eletrodo modificado com RGO-DHP/GCE foi realizada na presença de compostos interferentes encontrados em urina humana. Cada um dos compostos CaCl_2 , NaCl , Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , KCl , NH_4Cl , ureia, creatinina, frutose, D-galactose, L-tirosina, L-histidina, glicina e glicose, foram adicionados individualmente a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ à solução de estradiol em $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ PBS. Usando voltametria linear, as espécies químicas estudadas causaram interferência menor que 5% em resposta a corrente do eletrodo, não afetando a determinação do Estradiol. Os resultados estão mostrados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Determinação de Estradiol em urina sintética

Amostra	Adicionado ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)	Eletrodo proposto ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	4,00	4,03	101
B	16,0	15,8	98,8
C	100	94,0	94,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Conclusões parciais

Neste capítulo investigamos a manipulação do GO para construção de FETs pela técnica LBL com aplicação em detecção de Cis-C, como marcador da DRC. Para isso, o GO foi modificado por duas vias diferentes para obter um nanomaterial com carga superficial positiva, com a ligação covalente de APTES na sua superfície, e negativa via dopagem utilizando como fonte de nitrogênio a ureia, com a redução por micro-ondas. A caracterização mostrou que o crescimento dos filmes é linear e que apresentam baixa rugosidade após a secagem. Além disso, a resistência elétrica após a secagem diminui significativamente, devido à eliminação da água entre as camadas.

Os resultados do biossensor para detecção de Cis-C foram satisfatórios, sendo possível detectar valores dentro da faixa normal de Cis-C em amostras de urina sintética. Uma limitação deste tipo de dispositivo refere-se ao comprimento de Debye, que relacionada à força iônica do meio. Contudo, esse problema pode ser superado diluindo-se a amostra, e como mostram os resultados, em uma diluição de 100x, é possível detectar valores acima de 1 ngmL^{-1} , para uma amostra real, sem diluição corresponderia a um valor de 100 ngmL^{-1} , uma vez que a DRC está

relacionada à valores acima de 300 ngmL^{-1} de Cis-C. Os dispositivos aqui estudados se mostram adequados para futuras aplicações clínicas.

Os estudos referentes ao sensor eletroquímico para detecção de Estradiol foram bem sucedidos. O compósito RGO-DHP foi estável em solução aquosa permitindo produzir filmes estáveis e eletroquimicamente ativos na determinação de Estradiol. Foi obtido uma resposta linear de $4,0 \times 10^{-7}$ to $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção de $7,7 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Estes valores são comparáveis com outros resultados encontrados na literatura, mas deve-se considerar a facilidade de fabricação desses eletrodos e o baixo custo. Além disto, esse sistema mostrou-se bastante seletivo em amostras de urina sintética.

6 GRAFENO QUIMICAMENTE REDUZIDO FUNCIONALIZADO COM L-GLUTAMINA PARA APLICAÇÕES EM TERAPIA FOTOTERMAL

Nos capítulos anteriores foram estudadas as aplicações do RGO em bio/sensores, e devido à versatilidade desse nanomaterial, também é possível a utilização do mesmo em terapia, como a terapia fototermal, que consiste da absorção da luz no NIR, podendo efetivamente converter esses fótons absorvidos em energia térmica. Essa abordagem será estudada neste capítulo, no qual o GO foi reduzido com NH_4OH na presença de Glu, que apresenta menor agregação durante o processo de redução. A Glu tem o objetivo de diminuir a toxicidade e facilitar a internalização do nanomaterial pela célula. Foram utilizadas as células tumorais do colo do útero (HeLa) como alvo, as quais foram incubadas com RGO-Glu e submetidas à irradiação de um laser 808 nm.

6.1 Caracterização espectroscópica

Uma das características do RGO é a sua capacidade de absorver luz em todo o espectro do ultravioleta, até o infravermelho próximo, convertendo os fótons recebidos em calor. Esse efeito não é efetivo no GO, devido as ligações sp^3 presentes no material. Desta forma, quanto menos oxigênio estiver presente no nanomaterial, mais eficiente vai ser a conversão da radiação infravermelha em calor. Como mostra a Figura 6.1a, o comprimento de onda de absorção do GO se desloca para 270 nm depois de 8 horas de reação, além de um aumento significativo na absorção dentro do NIR. A amônia tem um poder de redução inferior ao NaBH_4 e outros redutores químicos, com uma menor eficiência na eliminação de oxigênio. Por outro lado, mantém a estabilidade da dispersão em água. Na Figura 6.1b, temos os espectros de absorção do GO no UV-Vis, depois de 2 horas e depois de 8 horas de reação.

Figura 6.1 - a) Deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima, em função do tempo. b) Espectros de absorção no UV-Vis, para o GO, 2 horas de reação e 8 horas.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 6.2 temos os espectros de varredura de XPS para as amostras de RGO (a) e RGO-Glu (b), com os principais picos presentes C 1s, N 1s e O 1s.

Figura 6.2 - Espectro de XPS no modo de varredura para as amostras a) RGO. b) RGO-Glu e a identificação de seus principais picos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos espectros da Figura 6.2, foram obtidos os valores em porcentagem de massa das amostras de RGO e RGO-Glu para cada elemento presente, como mostra a Tabela

6.1. Os resultados apresentados são a média e o desvio padrão de 3 regiões distintas. Em termos de massa, a presença da glutamina não afetou significativamente, o que pode estar relacionado à acurácia do equipamento. Como o equipamento mede a quantidade por elemento químico, não podemos dizer precisamente quanto de Glutamina se ligou ao RGO. Também temos a presença de pequenas quantidades de contaminantes. Para o RGO temos a presença de enxofre (1,5 %) e para o RGO-Glu, a presença de Cálcio e silício (0,8 % e 0,8 % respectivamente).

Tabela 6.1 - Porcentagem em massa para as amostras de RGO e RGO-Glu

	C 1s	N 1s	O 1s	S 2p	Ca 2p	Si 2p
RGO	74,7 ± 1,2	5,2 ± 0,2	18,6 ± 1,0	1,5 ± 0,2	–	–
RGO-Glu	75,8 ± 0,9	4,8 ± 0,2	17,9 ± 1,0	–	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em termos de ligações químicas, os espectros do RGO e RGO-Glu, apresentam significativa diferença, como mostra a Figura 6.3. Em a) as ligações em C 1s são, 284,28, 285,94, 287,47, 288,57 e 290,5 eV, que correspondem respectivamente a , C–C/C=C, C–O/C=N, C–O–C, C–N, $\pi \rightarrow \pi^*$ satélite.(149,169,203-204) Já em b), o espectro de alta resolução apresenta algumas diferenças, como a presença de três picos de ligações em 284,07, 285,74 e 287,98 eV correspondendo a C–C/C=O, C–O/C=N e C–O–C. Nas Figura 6.3c e d, temos as ligações para N 1s, que também apresenta significativa diferença nos espectros de alta resolução. Para ambas as amostras temos, 398,01, 399,40, 401,31 eV, que correspondem às ligações N-piridinico, N-pirrolíco, N-grafítico indicados na Figura 6.3d. A amostra de RGO-Glu apresenta mais um pico em 406,63 eV e $\pi \rightarrow \pi^*$ satélite.(204) Nas Figura 6.3e e f, o espectro para RGO-Glu e RGO respectivamente, de O 1s com os seguintes picos, 530,82, 532,2, 533,59 e 535,41 eV, que correspondem respectivamente à O–C=O, C=O, C–O e água.(206-207) A diferença entre as duas amostras para o O 1s se dá na porcentagem de ligação.

Figura 6.3 - Espectros de alta resolução para: a) Banda C 1s para RGO-Glu, b) C 1s para RGO, c) Banda N 1s para RGO-Glu, d) N 1s para RGO, e) Banda O 1s para RGO-Glu, f) O 1s para RGO.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir das deconvoluções feitas em cada um dos espectros, mede-se a área de cada pico, e assim podemos estimar a porcentagem de cada ligação presente, como mostra a Tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Ligações presentes para C 1s, N 1s e O 1s, e porcentagem da área para RGO-Glu e RGO

C 1s	RGO-Glu Área (%)	RGO Área (%)
C–C/C=C	66,1	61,81
C–O/C=N	19,81	25,93
C–O–C	8,83	12,26
C–N	4,08	–
$\pi \rightarrow \pi^*$	1,17	–
N 1s		
N-grafítico	22,18	19,8
N-piridinico	63,92	37,62
N-pirrolíco	11,67	42,57
$\pi \rightarrow \pi^*$	2,23	–
O 1s		
O–C=O	46,4	12,24
C–O	7,94	80,8
C=O	41,46	3,98
H ₂ O	4,21	2,99

Fonte: Elaborada pelo autor.

FT-IR foi utilizado para determinar quais grupos funcionais estão presentes no RGO-Glu. Para isso, comparamos os espectros do RGO (a), RGO-Glu (b), RGO-Glu sem diálise (c) e Glu (d), mostrados na Figura 6.4. Para o GO, temos a principais bandas em 3224 cm⁻¹. Essa região (3000 a 4000 cm⁻¹) corresponde aos modos vibracionais dos grupos OH, C–OH e H₂O. A banda em 1740 cm⁻¹ e 1625 cm⁻¹, correspondem ao C=O da vibração de estiramento carbonila de grupos carboxílicos, e à água adsorvida. Ambas as bandas desaparecem nas duas amostras reduzidas.(146) Em 1423 cm⁻¹, temos o modo de vibração O–H (207) e o dublete 1275 e 1242 cm⁻¹, que está relacionado ao grupo epóxido.(146)

Diferentemente do que ocorre quando se reduz o GO com agentes redutores fortes como NaBH₄, na região compreendida entre 3000 a 4000 cm⁻¹, não ocorre a diminuição significativa das bandas correspondentes à OH, C–OH e H₂O, mas ocorre o aparecimento das bandas 2847 e 2917 cm⁻¹, que correspondem às ligações C–H, tanto em RGO quanto RGO-Glu. Essas bandas estão relacionadas à presença de grupos funcionais ligados ao nitrogênio e oxigênio, que foram reduzidas com amônia.(206) A banda em 1579 cm⁻¹ corresponde à

restauração da ligação C=C da rede cristalina durante o processo de redução, estando presente tanto em RGO quanto em RGO-Glu. A banda em 1409 cm^{-1} , pode ser devida às vibrações O-H ou a C-N.(146,160) E em 1081 cm^{-1} , temos a ligação C-N que também pode estar relacionada à resíduos de ligações C-O.(165)

Para amostra de RGO-Glu, além das bandas acima apresentadas que estão relacionadas exclusivamente ao grafeno, aparecem outras bandas, como em 1540 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} , que podem estar relacionadas à deformação da NH_3^+ (1586 e 1484 cm^{-1}) da Glu.(208) Em 1108 cm^{-1} , temos o modo de rotação do grupo NH_2 da Glu. E em 800 cm^{-1} , aparece uma banda relacionada ao modo de rotação da CH_2 (811 cm^{-1}) da Glu. A presença dessas bandas no RGO-Glu, sugerem que ocorre uma interação eletrostática entre as moléculas de Glu e o grafeno, devido aos pequenos deslocamentos nos modos de vibração presentes.

Figura 6.4 - Espectroscopia do Infravermelho: a) RGO. b) RGO-Glu. c) RGO-Glu sem dialise d) Glu.
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2 Caracterização morfológica

A esfoliação química do grafite produz folhas de GO com área de alguns nanômetros até folhas com algumas dezenas de micrômetros quadrados, o que inviabiliza ou dificulta a internalização do nanomaterial pelas células, mudando também o mecanismo de toxicidade em determinados casos.(210-211) Desta forma, foi necessário quebrar as folhas para chegar em um tamanho onde ocorre uma boa eficiência na internalização. Com esta finalidade, foi utilizado um ultrassonicador de ponteira para esfoliar mecanicamente o nanomaterial. Esta técnica cria microbolhas de ar na solução, que se desintegram rapidamente liberando uma grande quantidade de calor, quebrando assim as partículas na suspensão.

Na Figura 6.5 temos os histogramas de distribuição de tamanho para o estado inicial, sem o uso do ultrassom, e depois de 3 e 6 horas. É possível notar a presença de duas populações na distribuição, para o GO no tempo inicial (65 e 250 nm) e final (25 e 75 nm). Isso pode ter relação com o formato do nanomaterial estudado, que possui grande anisotropia, uma vez que o equipamento usa equações que consideram as partículas como esféricas, mas comparando esses resultados com os obtidos por AFM, temos uma boa aproximação.

Figura 6.5 - Histograma de tamanho das partículas sem ultrassom de ponta e depois de 3 e 6 horas de ultrassonicação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para confirmar o tamanho médio das folhas de grafeno, foram realizadas medidas de AFM, com uma amostragem de 400 folhas para cada uma das amostras. A Figura 6.6, compara os tamanhos entre o GO esfoliado, o GO depois de processado em ultrassom, e RGO-Glu e RGO, e os valores foram respectivamente, 570, 62, 54 e 42 nm. Comparando os valores medidos do GO antes do ultrassom pelo AFM e DLS, nota-se uma maior discrepância nos resultados, o que se deve à anisotropia que existe no formato do GO, como vemos na Figura 6.6a. O DLS utiliza equações que consideram as partículas como esféricas, logo existe um maior erro na medida associado à essas partículas, e quando ocorre a quebra das folhas, estas começam a se aproximar de um formato mais uniforme, como mostra a Figura 6.6b, c e d. Portanto temos uma maior precisão nos resultados de DLS, quando temos folhas menores. Para todas as amostras foram utilizados ajuste log-normal para aferir a média dos tamanhos.

continua

Figura 6.6 - Imagens de AFM com 10 x 10 μm de área de a) GO esfoliado quimicamente, b) GO após 6 horas no ultrassom de ponta, c) RGO-Glu d) RGO. Histogramas da distribuição de tamanho. e) GO, f) GO após 6 horas, g) RGO-Glu e h) RGO.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 6.7a, a ordenada está representada pela porcentagem de pixels de uma imagem de AFM em função da altura, onde a altura média fica em torno de 1 nm, em acordo com resultados da literatura.(56) Teoricamente, um grafeno cristalino tem a altura de aproximadamente 0,6 nm, no caso do GO devido aos grupos funcionais e defeitos presentes em sua rede cristalina e à presença de água, essa altura aumenta para valores próximos de 0,8 a 1,2 nm.(152)

Na Figura 6.7b, vemos que a distribuição da altura possui uma variação menor em relação ao GO não quebrado, sendo praticamente uma dispersão de uma única camada de GO com uma altura média de 0,93 nm. Na Figura 6.7c, depois da redução, houve um aumento na distribuição de alturas, e a média ficou em 1,42 nm. Este aumento se deve à presença da Glu que interagindo com as folhas, pode fazer com que se agreguem, e além disso, quando se reduz o GO, a maior parte dos grupos funcionais são retirados, e são exatamente esses grupos que mantêm a estabilidade deste nanomaterial em água.(172) O RGO sem a Glu ficou com uma altura média de 1 nm.

Figura 6.7 - Histograma da distribuição de alturas para: a) GO sem esfoliação mecânica. b) GO após 6 horas no ultrassom de ponteira. c) RGO-Glu. d) RGO.

Fonte: Elaborada pelo autor

O tamanho das folhas de RGO-Glu também foi monitorado em meio de cultura DMEM suplementado com Soro Bovino Fetal (SBF), nas mesmas condições que são cultivadas as células tumorais HeLa, com a temperatura de 37 °C e 5% de CO₂. Na Figura 6.8, temos o DLS do tempo inicial, após 6 e 24 horas, e do meio de cultura como referência, no tamanho das proteínas (7,5 nm). No tempo inicial, temos a formação de um agregado de ~300 nm e observa-se que ao longo do tempo, o agregado vai diminuído em tamanho, formando duas populações de ~30 e ~80 nm após 24 horas de incubação. Esta agregação inicial ocorre pela presença de grandes quantidades de sal na solução, que desestabiliza os nanomateriais, formando agregados. A diminuição do tamanho após 24 horas está relacionada à formação de uma corona proteica em torno do RGO-Glu, através de interações hidrofóbicas e interações $\pi \rightarrow \pi$, entre as proteínas e o RGO, o que leva a um equilíbrio nas cargas superficiais, mantendo-o estável na solução.(211,212)

Figura 6.8 - DLS de RGO-Glu em meio de cultura DMEM suplementado com SBF, no tempo inicial, após 6 e 24 horas de incubação nas mesmas condições em que são cultivadas as células, temperatura 37 °C com 5% CO₂.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 6.9 apresentamos o potencial-Zeta em função do pH, para o RGO e RGO-Glu, onde destacamos em azul a região de estabilidade. Em valores entre 0 e -30 mV pode ocorrer agregação com o tempo, em pH fisiológico (pH 7,4). O material em estudo possui grande estabilidade, permitindo ser usado em aplicações em meio biológico.

Figura 6.9 - Potencial-Zeta em função do pH para RGO-NH₃, e RGO-Glu, onde a região destacada em azul corresponde a região de estabilidade do nanomaterial.

Fonte: Elaborada pelo autor

6.3 Terapia fototermal e viabilidade celular

A Figura 6.10 mostra o esquema experimental montado para indução de calor via laser (808 nm), e o sistema de medição da temperatura utilizando fibra ótica.

Figura 6.10 - Esquema experimental do sistema fototermal com seus componentes indicados na figura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As propriedades fototermais de RGO-Glu foram investigadas em diferentes concentrações (0,5 – 6 mgL⁻¹), com irradiação de laser em 808 nm com densidade de energia

de 2 Wcm^{-2} durante 15 minutos. A variação da temperatura é mostrada na Figura 6.11a, onde a temperatura não apresenta aumento significativo acima de 4 mgL^{-1} , para esta potência do laser utilizada. Na Figura 6.11b temos a diferença de temperatura em função da potência para uma concentração de 2 mgL^{-1} . A temperatura variou linearmente de 4 a $37,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para uma potência aplicada de 2,8 a $17,8 \text{ Wcm}^{-2}$. Estes resultados sugerem a boa conversão fototermal do grafeno.

Figura 6.11 - a) Variação da temperatura em função da concentração de RGO e RGO-Glu, após 15 minutos de irradiação. b) Variação da temperatura em função da potência para uma concentração de 2 mgL^{-1} . Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 6.12a, mostramos a curva da variação da temperatura em função do tempo, para uma amostra com absorção igual a 1 e potência de $13,6 \text{ Wcm}^{-2}$, irradiado por 30 minutos e resfriado em temperatura ambiente durante 30 minutos. A Figura 6.12b traz o estudo da estabilidade fototermal do RGO-Glu, nas mesmas condições anteriores, onde foram feitos cinco ciclos de irradiação/resfriamento, e observamos que não houve diminuição na absorção do nanomaterial, o que evidencia a sua grande estabilidade, mesmo em mudanças bruscas de temperatura.

Figura 6.12 - a) Aumento da temperatura com o laser ligado/desligado em função do tempo. b) 5 ciclos de ligado e desligado em função do tempo nas mesmas condições descrita em a).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A resposta do RGO-Glu sob incidência do laser 808 nm foi analisada utilizando diversas concentrações e variando a potência do laser, como mostra a Figura 6.13. Mesmo para baixas concentrações houve uma boa conversão luz/calor. O aumento da temperatura está relacionado diretamente ao grau de conjugação das ligações π que são restauradas durante a redução do GO, exibindo alta absorção óptica no visível e infravermelho próximo.

Figura 6.13 - Variação da temperatura em função do tempo, para diferentes concentrações de RGO-Glu, *inset*: variação de temperatura em função da concentração.

Fonte: Elaborada pelo autor

O desempenho fototermal do RGO e RGO-Glu foi estudado de maneira mais aprofundada, no qual a eficiência de transdução fóton/calor foi medida utilizando o método de Roper e colaboradores.(213)

A eficiência de transdução fototermal (η) é dada por:

$$\eta = \frac{hA(T_{max} - T_{amb}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A_\lambda})} \quad (19)$$

Onde h é o coeficiente de transferência de calor, A , a área da superfície da cubeta, T_{max} e T_{amb} , a temperatura de saturação e temperatura ambiente respectivamente, I , a potência do laser em W, e A_λ , a absorção ótica para o comprimento de onda de 808 nm. Q_0 , é a energia dissipada da solução e da cubeta sem a presença dos RGOs.

A determinação de hA , é realizada utilizando a equação:

$$\tau = \frac{1}{hA} \sum_i m_i C_{p,i} \quad (20)$$

Onde m e C_p , são a massa e a capacidade térmica de cada amostra (i), a constante de tempo (τ), é obtida ajustando a curva de resfriamento da temperatura da amostra quando não irradiada pelo laser.

O valor de Q_0 é obtido em um experimento independente, determinado utilizando a equação:

$$Q_0 = hA(T_{max} - T_{amb}) \quad (21)$$

Desta maneira, a eficiência foi calculada, utilizando-se os seguintes valores: massa de cubeta de quartzo de 0,825 g e da água de 0,4 g, com as capacidades térmicas, respectivamente, de 0,839 e 4,187 Jg⁻¹K⁻¹. A potência do laser utilizada foi de 0,1 W e absorvância de 0,578 para uma concentração de 30 mgL⁻¹. A obtenção dos tempos característicos ocorreu pelo ajuste da curva Tempo x ln(ΔT), mostrado na

Figura 6.14a, para o RGO e RGO-Glu, sendo, respectivamente 281 e 237. Através desses valores, obtemos a eficiência de transdução térmica, para o RGO (50%) e RGO-Glu (63%) na

Figura 6.14b. Evidenciando a eficácia do sistema RGO-Glu.

Figura 6.14 - a) Obtenção da constante de tempo para as amostras RGO e RGO-Glu, através do ajuste linear da curva de Tempo x $\ln(\Delta T)$, b) Eficiência de conversão fototermal do RGO e RGO-Glu.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esses valores de eficiência estão em acordo com outros RGOs encontrados na literatura, como mostra a Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Eficiência de conversão fototermal do RGO-Glu comparado com outros nanomateriais encontrados na literatura.

Material	Potencia irradiada (W)	Eficiência de conversão (%)	Ref.
SnS Nanosheets	0,34	36	(214)
Au nanobastões	2	50	(215)
RGO	0,2	67	(216)
Au	2	63	(217)
Nanomatriyoshkas			
RGO-Glu	0,1	63	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para determinar quais concentrações a serem usadas nos ensaios de terapia fototermal, foi utilizado o método de IC_{50} , que mede a eficácia de inibição de uma função biológica. Utilizamos nesse trabalho a concentração máxima de RGO-Glu que mata 50% das células. Na Figura 6.15, apresentamos o IC_{50} para determinar a toxicidade dos RGOs, aqui sintetizados. OS valores de IC_{50} para o RGO-Glu foram ligeiramente maior do que para RGO sem a Glu, sendo esses valores iguais a $40,11 \text{ mgL}^{-1}$ e $55,18 \text{ mgL}^{-1}$.

Figura 6.15 - Determinação do IC_{50} para as amostras a) RGO-Glu. b) RGO-NH₃.

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 6.16a mostra a variação de temperatura em função do tempo para diferentes concentrações de RGO-Glu. As cores claras representam o desvio padrão de 3 amostras. São necessários apenas 9 minutos para atingir a saturação na temperatura. Os valores de concentração mostrados são os valores usados na incubação das células. Na Figura 6.16b temos a variação de temperatura em função da concentração para RGO-Glu e RGO. Não

houve aumento significativo para o grafeno sem Glu com o aumento da concentração, com valores na mesma escala de temperatura do controle. Estes resultados mostram que a Glu influencia na internalização do grafeno. Contudo, uma possível explicação para o mecanismo de internalização necessitaria mais informações que corroborem com nossos resultados.

Figura 6.16 - Variação da temperatura em função do tempo a) RGO-Glu. b) Variação da temperatura em função da concentração para RGO-Glu e RGO.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na Figura 6.17, temos o ensaio de viabilidade celular utilizando o método de absorção de Diacetato de Fluoresceína (FDA), antes e depois da exposição de 15 minutos à irradiação das amostras para as concentrações (12, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de RGO-Glu. Para as concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve significativa diminuição da viabilidade celular comparativamente ao controle (células antes e depois de irradiadas sem o RGO-Glu). Nota-se que para a concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi suficiente para diminuição das células no meio.

Figura 6.17 - Ensaio de viabilidade por teste de FDA do RGO-Glu após exposição de 24h em células HeLa antes e após a irradiação. Os asteriscos indicam que houve diferença estatística significativa na concentração de 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ antes vs 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após irradiação, e na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ antes vs 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após irradiação. Análises realizadas em triplicata de 3 experimentos independentes. * $p<0.05$, ANOVA Tukey teste, Graph Pad prism software.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4 Conclusões parciais

O sistema RGO-Glu aqui proposto mostrou-se eficiente na internalização celular, no qual houve um aumento significativo da temperatura quando comparado com o RGO, quando incubados com as células HeLa. Este sistema também apresentou uma eficiência na conversão fóton/calor de 63%, valor superior a outros nanomateriais propostos na literatura. Contudo, apresentou uma ligeira toxicidade para essas células quando não irradiada pelo laser NIR, mas isto não inviabiliza o seu uso, uma vez que podemos aproveitar a sinergia desse sistema, somando a sua toxicidade e os efeitos fototérmicos, aumentando assim a eficiência da terapia. Estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos de interação RGO-Glu/célula.

7 CONCLUSÕES

A esfoliação química do grafeno a partir do grafite foi bem sucedida, produzindo folhas com alto grau de qualidade em termos de dispersão de altura, ou seja, a maior presença de folhas de GO com uma monocamada atômica (~74%) com altura média de 0,93 nm. GO foi utilizado em todas as aplicações aqui estudadas na sua forma reduzida (RGO) na qual, foi modificado convenientemente para cada uma das aplicações propostas.

O biossensor utilizando a plataforma FET de porta líquida para detecção de Cis-C como marcador da DRC mostrou-se uma excelente opção no desenvolvimento de dispositivos do tipo *point-of-care*, uma vez que permite a fácil integração com uma eletrônica simples, embarcada e portátil, devido a miniaturização do sistema, que utiliza como substrato, eletrodos interdigitados de ouro. Os dispositivos foram obtidos por deposição dos RGOs pela técnica LBL, que permite um maior controle da espessura e rugosidade dos filmes, além de ser uma técnica simples e de baixo custo, quando comparada com técnicas mais sofisticadas de deposição. Foram utilizados RGO modificados por duas vias diferentes, uma utilizando funcionalização covalente com o APTES, que deixou o RGO com uma carga superfície positiva em pH 3,0, e outra com dopagem de nitrogênio utilizando como fonte a ureia e redução via micro-ondas, que teve a carga superficial negativa em pH 3,0. Os filmes apresentaram uma boa uniformidade devido à presença de poucos agregados advindos das dispersões. Os filmes, quando secos em 150 °C tiveram uma resistência diminuída em duas ordens de grandeza, cujo valor médio permaneceu em torno de 1.500 Ω .

Estes dispositivos apresentaram uma sensibilidade de $1,94 \pm 0,29 \Delta I_{DS}(\%)ng.mL^{-1}$, com LD em $0,39 ng.mL^{-1}$ e linearidade entre ($5 ng.mL^{-1} - 100 ng.mL^{-1}$), quando utilizados em urina sintética. Neste caso, apresentaram uma pequena diminuição na sensibilidade quando comparados com o sistema em PBS. Uma vez que a DRC apresenta um patamar inferior a 300 $ng.mL^{-1}$, estes dispositivos são clinicamente viáveis.

Foi estudado um sensor eletroquímico utilizando RGO para detecção de Estradiol em amostras de urina. E com este intuito foi proposto o uso do compósito RGO-DHP, no qual o DHP teve o importante papel de estabilizar o RGO em água, permitindo assim a construção de filmes estáveis e eletroquimicamente ativos utilizando a técnica *drop casting* na fabricação de eletrodos. Foi obtida uma resposta linear de $4,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-5} mol L^{-1}$, com um limite de detecção de $7,7 \times 10^{-8} mol L^{-1}$. Estes valores estão comparáveis a outros encontrados na literatura, mas deve-se considerar a facilidade de fabricação desses eletrodos além do baixo

custo. Esse sistema mostrou-se bastante seletivo em amostras de urina sintética, quando utilizado na presença de interferentes. Estes resultados foram publicados no periódico *Materials Science and Engineering C*.(218)

Na segunda parte desta tese as folhas de GO foram mecanicamente esfoliadas para obter um nanomaterial de tamanho suficiente para haver uma melhor internalização pela célula HeLa, sendo esse valor em torno de 60 nm. Após esta etapa, reduziu-se o GO na presença de L-Glutamina, com NH_4OH , para evitar uma maior agregação das nanofolhas durante o processo de redução. Este sistema apresentou uma boa estabilidade e baixa agregação em água com pH fisiológico, o que é de vital importância para aplicações biológicas. O RGO-Glu mostrou-se mais eficiente que o RGO na absorção do laser em 808 nm, com eficiência de conversão de 63% e 50% respectivamente. Esses valores foram superiores a outros nanomateriais encontrados na literatura. Além disso, o sistema RGO-Glu apresentou uma maior internalização pelas células, mas os mecanismos ainda não estão compreendidos. Houve um aumento considerável de temperatura, mesmo em concentrações baixas, o que demonstra a eficácia desse sistema no tratamento de tumores sólidos. Estudos mais aprofundados na toxicidade desse composto e os mecanismos de internalização devem ser realizados, além do estudo em cultura de células saudáveis.

REFERENCIAS

- 1 EUR-LEX: official journal of the european union. Disponivel em: <<http://eur-lex.europa.eu/oj/direct-access.html>>. Acesso em: 11 set. 2017.
- 2 DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical Reviews**, v.104, n.1, p.293–346, 2003.
- 3 AI, H.; JONES, S. A.; LVOV, Y. M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics** v. 39, n. 1, p. 23, 2003.
- 4 TANS, S. J.; VERSCHUEREN, A. R. M.; DEKKER, C. Room-temperature transistor based on a single carbon nanotube. **Nature**, v. 393, p.49–52, 1998. doi:10.1038/29954.
- 5 RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews** v.35, n.7,p.583–592, 2006.
- 6 DANIE KINGSLEY, J. et al. Nanotechnology for tissue engineering: need, techniques and applications. **Journal of Pharmacy Research**, v.7, n. 2 ,p.200–204, 2013.
- 7 LENNERNÄS, H. et al. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v.127, n.1, p.103–107, 1996.
- 8 HU, S. H. et al. Photoresponsive protein–graphene–protein hybrid capsules with dual targeted heat-triggered drug delivery approach for enhanced tumor therapy. **Advanced Functional Materials**, v.24, n.26, p.4144–4155, 2014.
- 9 BUSSY, C.; ALI-BOUCETTA, H.; KOSTARELOS, K. Safety considerations for graphene: lessons learnt from carbon nanotubes. **Accounts of Chemical Research** v.46, n.3, p.692–701, 2013.
- 10 ROBINSON, J. T. et al. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v.133, n.17, p.6825–6831, 2011.
- 11 SHAO, Y. et al. Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. **Electroanalysis**, v.22, n.10, p.1027–1036, 2010.
- 12 PERINOTO, A. C. et al. Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. **Analytical Chemistry**, v.82, n.23, p.9763–9768, 2010.
- 13 VICENTINI, F. C., et al. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B: chemical**, v.188, p.1101–1108, 2013. doi:10.1016/j.snb.2013.07.109

- 14 CHEN, T.Y. et al. Label-free detection of DNA hybridization using transistors based on CVD grown graphene. **Biosensors and Bioelectronics**, v.41, p.103–109, 2013. doi:10.1016/j.bios.2012.07.059
- 15 KIM, D. J. et al. Reduced graphene oxide field-effect transistor for label-free femtomolar protein detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v.41, p.621–626, 2013. doi:10.1016/j.bios.2012.09.040
- 16 CANCINO-BERNARDI, J. et al. Detection of leukemic cells by using jacalin as the biorecognition layer: a new strategy for the detection of circulating tumor cells. **ChemElectroChem**, v.2, n.7, p.963–969, 2015.
- 17 REN, W.; CHENG, H. M. The global growth of graphene. **Nature Nanotechnology**, v.9, n.10, p.726–730, 2014.
- 18 GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v.6, n.3, p.183–191, 2007.
- 19 NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v.306, n.5696, p.666–669, 2004.
- 20 MOON, J. S. et al. Epitaxial-Graphene Rf field-effect transistors on si-face 6h-sic substrates. **IEEE Electron Device Letters**, v. 30, n.6, p.650–652, 2009.
- 21 OBRAZTSOV, A. N. et al. Chemical vapor deposition of thin graphite films of nanometer thickness. **Carbon**, v.45, n.10, p.2017–2021, 2007.
- 22 PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 4, p. 217–224, 2009.
- 23 HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v.80, n.6, p.1339, 1958.
- 24 BACCARIN, M. et al. Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/carbon black/chitosan composite for the simultaneous determination of dopamine and paracetamol concentrations in urine samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.799, p. 436–443, 2017. doi:10.1016/j.jelechem.2017.06.052
- 25 KIM, D. J. et al. Reduced graphene oxide field-effect transistor for label-free femtomolar protein detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v.41, p.621–626, 2013. doi:10.1016/j.bios.2012.09.040
- 26 JEON, I. Y. et al. Formation of large-area nitrogen-doped graphene film prepared from simple solution casting of edge-selectively functionalized graphite and its electrocatalytic activity. **Chemistry of Materials**, v.23, n.17, p.3987–3992, 2011.
- 27 NGUYEN, D. D., et al. Superhydrophobic and superoleophilic properties of graphene-based sponges fabricated using a facile dip coating method. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 7, p.7908–7912, 2012.
- 28 LI, X. et al. Highly conducting graphene sheets and Langmuir-Blodgett films. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 9, p. 538–542, 2008.

- 29 HWANG, H. et al. Highly tunable charge transport in layer-by-layer assembled graphene transistors. **ACS Nano**, v.6, n.3, p.2432–2440, 2012.
- 30 LIU, J.; CUI, L.; LOSIC, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 12, p. 9243–9257, 2013.
- 31 NURUNNABI, M., et al. Photoluminescent graphene nanoparticles for cancer phototherapy and imaging. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 15, p. 12413–12421, 2014.
- 32 KROTO, H. W. et al. C60: Buckminsterfullerene. **Nature**, v. 318, n. 6042, p.162–163, 1985.
- 33 IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, 1991.
- 34 PARTOENS, B.; PEETERS, F. M. From graphene to graphite: electronic structure around the K point. **Physical Review**, v. 74, n. 7, p. 75404, 2006.
- 35 CASTRO NETO, A. H. et al. The electronic properties of graphene. **Reviews of Modern Physics**, v. 81, n. 1, p. 109–162, 2009.
- 36 HWANG, E. H.; ADAM, S.; SARMA, S. D. Carrier transport in two-dimensional graphene layers. **Physical Review Letters**, v. 98, n. 18, p. 186806, 2007.
- 37 FRADKIN, E. Critical behavior of disordered degenerate semiconductors. I. models, symmetries, and formalism. **Physical Review B**, v. 33, n. 5, p. 3257–3262, 1986.
- 38 BALANDIN, A. A. et al. Superior thermal conductivity of single-layer graphene. **Nano Letters**, v. 8, n. 3, p. 902–907, 2008.
- 39 STOLLER, M. D. et al. Graphene-based ultracapacitors. **Nano Letters**, v.8, n.10, p.3498–3502, 2008.
- 40 DU, X. et al. Approaching ballistic transport in suspended graphene. **Nature Nanotechnology**, v.3, n.8, p.491–495, 2008.
- 41 KULKARNI, D. D. et al. Graphene oxide–polyelectrolyte nanomembranes. **Acs Nano**, v.4, n. 8, p. 4667–4676, 2010.
- 42 NOVOSELOV, K. S. et al. 2D materials and van der Waals heterostructures. **Science**, v. 353, n. 6298, 2016.
- 43 RODDARO, S. et al. The optical visibility of graphene: interference colors of ultrathin graphite on SiO₂. **Nano Letters**, v. 7, n. 9, p. 2707–2710, 2007.
- 44 CHENG, Y. et al. Direct Identification of multilayer graphene stacks on copper by optical microscopy. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 7, p. 2165–2171, 2016.
- 45 JUNG, I. et al. Simple approach for high-contrast optical imaging and characterization of graphene-based sheets. **Nano Letters**, v. 7, n. 12, p. 3569–3575, 2007.
- 46 SUKANG, B. et al. Towards industrial applications of graphene electrodes. **Physica Scripta**, v. 2012, n. T146, p. 14024, 2012.

- 47 CHOY, K. Chemical vapour deposition of coatings. **Progress in Materials Science**, v. 48, n. 2, p. 57–170, 2003.
- 48 CORAUX, J. et al. Structural coherency of graphene on Ir(111). **Nano Letters**, v. 8, n. 2, p. 565–570, 2008.
- 49 REINA, A. et al. Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. **Nano Letters**, v. 9, n. 1, p. 30–35, 2009.
- 50 TETLOW, H. et al. Growth of epitaxial graphene: theory and experiment. **Physics Reports**, v. 542, n.3, p. 195–295, 2014.
- 51 BRODIE, B. C. Sur le poids atomique du graphite. **Annales de Chimie et de physique**, v. 59, p.8, 1860.
- 52 STAUDENMAIER, L. Verfahren zur darstellung der graphitsäure. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 31, n. 2, p.1481–1487, 1898.
- 53 STANKOVICH, S. et al. Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate). **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 155–158, 2006.
- 54 LUNDIE, M.; ŠLJIVANČANIN, Ž.; TOMIĆ, S. Electronic and optical properties of reduced graphene oxide. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 3, n. 29, p. 7632–7641, 2015.
- 55 BUCHSTEINER, A.; LERF, A.; PIEPER, J. Water dynamics in graphite oxide investigated with neutron scattering. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 45, p. 22328–22338, 2006.
- 56 TUNG, V. C. et al. High-throughput solution processing of large-scale graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25–29, 2009.
- 57 KE, C. C.; YANG, Y. C.; TSENG, W. L. Synthesis of blue-, green-, yellow-, and red-emitting graphene-quantum-dot-based nanomaterials with excitation-independent emission. **Particle & Particle Systems Characterization**, v.33, n.3, p.132–139, 2016.
- 58 LIN, Y.; JIN, J.; SONG, M. Preparation and characterisation of covalent polymer functionalized graphene oxide. **Journal of Materials Chemistry**, v.21, n.10, p.3455–3461, 2011.
- 59 GEORGAKILAS, V. et al. Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications. **Chemical Reviews**, v.116, n. 9, p. 5464–5519, 2016.
- 60 WOLF, E. L. Practical Productions of graphene, supply and cost. In:_____. **Applications of graphene: an overview**. Cham: Springer International Publishing, 2014. cap 2, p.19-38.
- 61 LIANG, H. F. et al. The band structure of graphene oxide examined using photoluminescence spectroscopy. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 3, n. 48, p. 12484–12491, 2015.
- 62 SHIN, H. J. et al. Efficient reduction of graphite oxide by sodium borohydride and its effect on electrical conductance. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 12, p. 1987–1992, 2009.

- 63 MAHANTA, N. K.; ABRAMSON, A. R. Thermal conductivity of graphene and graphene oxide nanoplatelets. In: INTERSOCIETY CONFERENCE ON THERMAL AND THERMOMECHANICAL PHENOMENA IN ELECTRONIC SYSTEMS, 13., 2012, San Diego, CA, USA. **Proceedings**....San Diego: ICTTPEC, 2012. p. 1–6.
- 64 GÓMEZ-NAVARRO, C. et al. Atomic structure of reduced graphene oxide. **Nano Letters**, v.10, n. 4, p. 1144–1148, 2010.
- 65 ZHANG, J. et al. A high-performance asymmetric supercapacitor fabricated with graphene-based electrodes. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 10, p. 4009–4015, 2011.
- 66 XUE, D. J. et al. Improving the Electrode performance of ge through ge@c core–shell nanoparticles and graphene networks. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 5, p.2512–2515, 2012.
- 67 YIN, Z. et al. Electrochemical deposition of zno nanorods on transparent reduced graphene oxide electrodes for hybrid solar cells. **Small**, v.6, n.2, p.307–312, 2010.
- 68 YANG, K. et al. Graphene in Mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3318–3323, 2010.
- 69 KUMAR, P. V et al. New insights into the thermal reduction of graphene oxide: impact of oxygen clustering. **Carbon**, v.100, p.90–98, 2016. doi:10.1016/j.carbon.2015.12.087
- 70 RAMESHA, G. K.; SAMPATH, S. Electrochemical reduction of oriented graphene oxide films: an in situ raman spectroelectrochemical study. **Journal of Physical Chemistry C**, v.113, n.19, p.7985–7989, 2009.
- 71 LAI, L. et al. One-step synthesis of NH₂-graphene from in situ graphene-oxide reduction and its improved electrochemical properties. **Carbon**, v.49, n.10, p.3250–3257, 2011.
- 72 FERNÁNDEZ-MERINO, M. J. et al. Vitamin C is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions. **Journal of Physical Chemistry C**, v.114, n.14, p.6426–6432, 2010.
- 73 FENG, H., et al. A low-temperature method to produce highly reduced graphene oxide. **Nature Communications**, v.4, p.1539, 2013. doi:10.1038/ncomms2555
- 74 UMRAO, S. et al. Microwave-assisted synthesis of boron and nitrogen co-doped reduced graphene oxide for the protection of electromagnetic radiation in ku-band. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, n.35, p.19831–19842, 2015.
- 75 TORRICELLI, F. et al. Ultra-high gain diffusion-driven organic transistor. **Nature Communications**, v.7, p.10550, 2016. doi:10.1038/ncomms10550
- 76 BAUGHMAN, R. H. et al. A. Carbon nanotubes--the route toward applications. **Science**, v.297, n.5582, p.787-792, 2002.
- 77 LEMME, M. C. et al. A Graphene field-effect device. **IEEE Electron Device Letters**, v.28, n.4, p.282–284, 2007.

78 KATSNELSON, M. I.; NOVOSELOV, K. S. Graphene: new bridge between condensed matter physics and quantum electrodynamics. **Solid State Communications**, v.143, n.1, p.3–13, 2007.

79 LI, X. et al. Chemically derived, ultrasmooth graphene nanoribbon semiconductors. **Science**, v.319, n.5867, p.1229–1232, 2008.

80 BASU, D. et al. Effect of edge roughness on electronic transport in graphene nanoribbon channel metal-oxide-semiconductor field-effect transistors. **Applied Physics Letters**, v.92, n.4, p.42114, 2008.

81 SZAFRANEK, B. N. et al. High on/off ratios in bilayer graphene field effect transistors realized by surface dopants. **Nano Letters**, v.11, n.7, p.2640–2643, 2011.

82 XIA, F. et al. Graphene field-effect transistors with high on/off current ratio and large transport band gap at room temperature. **Nano Letters**, v.10, n.2, p.715–718, 2010.

83 STOLYAROVA, E. et al. High-resolution scanning tunneling microscopy imaging of mesoscopic graphene sheets on an insulating surface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9209–12, 2007.

84 CHEN, J. H. et al. Charged-impurity scattering in graphene. **Nature Physics**, v.4, n.5, p. 377–381, 2008.

85 SABIO, J. et al. Electrostatic interactions between graphene layers and their environment. **Physical Review B**, v. 77, n. 19, p.195409, 2008.

86 CHEN, J. H. et al. Intrinsic and extrinsic performance limits of graphene devices on SiO₂ the linear dispersion relation in graphene. **Nature Nanotechnology**, v.3, p. 206–209, 2008. doi:10.1038/nnano.2008.58

87 MAYOROV, A. S. et al. Micrometer-scale ballistic transport in encapsulated graphene at room temperature. **Nano Letters**, v.11, n. 6, p. 2396–2399, 2011.

88 BOLOTIN, K. I. et al. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. **Solid State Communications**, v. 146, n. 9, p.351–355, 2008.

89 BERGVELD, P. Thirty years of ISFETOLOGY: what happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. **Sensors and Actuators B: chemical**, v.88, n.1, p.1–20, 2003.

90 SOHN, I. Y. et al. pH sensing characteristics and biosensing application of solution-gated reduced graphene oxide field-effect transistors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.45, p.70–76, 2013. doi:10.1016/j.bios.2013.01.051

91 ZHENG, G. et al. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. **Nature Biotechnology**, v.23, n.10, p.1294–1301, 2005.

92 JACOBS, C. B.; PEAIRS, M. J.; VENTON, B. J. Review: carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v.662, n.2, p.105–127, 2010.

93 VASHIST, S. K. et al. Advances in carbon nanotube based electrochemical sensors for bioanalytical applications. **Biotechnology Advances**, v.29, n.2, p.169–188, 2011.

- 94 FU, W. et al. Graphene transistors are insensitive to pH changes in solution. **Nano Letters**, v.11, n.9, p.3597–3600, 2011.
- 95 PICCININI, E. et al. Enzyme-polyelectrolyte multilayer assemblies on reduced graphene oxide field-effect transistors for biosensing applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v.92, p.661–667, 2017. doi:10.1016/j.bios.2016.10.035
- 96 REINER-ROZMAN, C. et al. Graphene-based liquid-gated field effect transistor for biosensing: theory and experiments. **Biosensors and Bioelectronics**, v.70, p.21–27, 2015. doi:10.1016/j.bios.2015.03.013
- 97 OHNO, Y. et al. Electrolyte-gated graphene field-effect transistors for detecting pH and protein adsorption. **Nano Letters**, v.9, n.9, p.3318–3322, 2009.
- 98 XIA, J. et al. Measurement of the quantum capacitance of graphene. **Nature Nanotechnology**, v.4, n.8, p.505–509, 2009.
- 99 SONG, E. Y.; LEE, K. Understanding IEEE 1451-Networked smart transducer interface standard - what is a smart transducer? **IEEE Instrumentation & Measurement Magazine**, v.11, n.2, p.11–17, 2008.
- 100 HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p.1247–1250, 1991.
- 101 TURNER, A. P. F.; KARUBE, I.; WILSON, G. S. **Biosensors : fundamentals and applications**. Oxford: Oxford University Press, 1987.
- 102 THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 Electroanalytical. **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, n.1, p.121–131, 2001.
- 103 DAMBORSKÝ, P.; ŠVITEL, J.; KATRLÍK, J. Optical biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, n.1, p. 91–100, 2016.
- 104 SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.79, p.127–133, 2016. doi:10.1016/j.trac.2015.12.009
- 105 XIE, B. et al. Thermal biosensor and microbiosensor techniques. In:_____ **Handbook of biosensors and biochips**. New York: John Wiley & Sons, 2008. doi:10.1002/9780470061565.hbb065
- 106 MOSBACH, K. Thermal biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 6, n. 3, p. 179–182, 1991.
- 107 BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; JOHANSSON, G. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v.13, n. 3, p.173–180, 2001.
- 108 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 02, p. 29–45, 1962. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x

- 109 KOST, G. J.; TRAN, N. K. Point-of-care testing and cardiac biomarkers: the standard of care and vision for chest pain centers. **Cardiology Clinics**, v. 23, n. 4, p. 467–490, 2005.
- 110 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997.
- 111 DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210–211, p.831–835, 1992.
- 112 MATOSEVIC, S.; PAEGEL, B. M. Layer-by-layer cell membrane assembly. **Nature Chemistry**, v. 5, n. 11, p. 958–963, 2013.
- 113 RICHARDSON, J. J. et al. Innovation in layer-by-layer assembly. **Chemical Reviews**, v.116, n. 23, p. 14828–14867, 2016.
- 114 NETZER, L.; SAGIV, J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v.105, n. 3, p. 674–676, 1983.
- 115 ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 21, n. 6, p.569–594, 1966.
- 116 KHARLAMPIEVA, E.; KOZLOVSKAYA, V.; SUKHISHVILI, S. A. Layer-by-layer hydrogen-bonded polymer films: from fundamentals to applications. **Advanced Materials**, v. 21, n. 30, p. 3053–3065, 2009.
- 117 BUJDÁK, J. Layer-by-layer assemblies composed of polycationic electrolyte, organic dyes, and layered silicates. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 13, p. 7152–7162, 2014.
- 118 OLIVEIRA, J. et al. Layer-by-layer polyelectrolyte-based thin films for electronic and photonic applications. In: TRIPATHY, S. K.; KUMAR, J.; NALWA, S. (Ed.) **Handbook of polyelectrolytes and their applications** New York: American Scientific Publishers, 2002.
- 119 HOPTION CANN, S. A.; VAN NETTEN, J. P.; VAN NETTEN, C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. **Postgraduate Medical Journal**, v. 79, n. 938, p. 672–680, 2003.
- 120 GARRETT, C. L.; DRAPER, D. O.; KNIGHT, K. L. Heat distribution in the lower leg from pulsed short-wave diathermy and ultrasound treatments. **Journal of Athletic Training**, v. 35, n. 1, p. 50–55, 2000.
- 121 SONG, C. W. et al. Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures. **International Journal of Hyperthermia**, v. 25, n. 2, p. 91–95, 2009.
- 122 GRIFFIN, R. J. et al. Mild temperature hyperthermia and radiation therapy: role of tumour vascular thermotolerance and relevant physiological factors. **International Journal of Hyperthermia**, v.26, n.3, p.256–263, 2010.
- 123 CUI, Z. G. et al. Molecular and cellular pharmacology molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by withaferin A. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 99–107, 2014. doi:10.1016/j.ejphar.2013.11.031

- 124 LIU, Y. et al. Ultrasound-induced hyperthermia increases cellular uptake and cytotoxicity of p-glycoprotein substrates in multi-drug resistant cells. **Pharmaceutical Research**, v.18, n.9, p.1255–1261, 2001.
- 125 DEWITT, M. R. et al. Influence of hyperthermia on efficacy and uptake of carbon nanohorn-cisplatin conjugates. **Journal of Biomechanical Engineering**, v.136, n.2, p.21003, 2014.
- 126 KRAWCZYK, P. M. et al. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 24, p. 9851–6, 2011.
- 127 SKITZKI, J. J.; REPASKY, E. A.; EVANS, S. S. Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v.10, n. 6, p. 550–8, 2009.
- 128 TORAYA-BROWN, S.; FIERING, S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. **International Journal of Hyperthermia**, v.30, n.8, p.531–539, 2014.
- 129 NEELGUND, G. M.; OKI, A. R. Influence of carbon nanotubes and graphene nanosheets on photothermal effect of hydroxyapatite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 484, p. 135–145, 2016. doi:10.1016/j.jcis.2016.07.078
- 130 JAQUE, D. et al. Nanoparticles for photothermal therapies. **Nanoscale**, v. 6, n.16, p. 9494–9530, 2014.
- 131 WELCH, A. J. et al. Laser thermal ablation. **Photochemistry and Photobiology**, v.53, n.6, p.815–823, 1991.
- 132 WELCH, A. The thermal response of laser irradiated tissue. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 20, n. 12, p. 1471–1481, 1984.
- 133 DEWHIRST, M. W.; ABRAHAM, J.; VIGLIANTI, B. Evolution of thermal dosimetry for application of hyperthermia to treat cancer. **Advances in Heat Transfer**, v. 47, p.397-421,2015. doi:10.1016/bs.aiht.2015.09.001
- 134 FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v.7, n.1, p.1–37, 2010.
- 135 GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.
- 136 MORNET, S. et al. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v.14, n.14, p.2161, 2004.
- 137 O'NEAL, D. P. et al. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. **Cancer Letters**, v.209, n.2, p.171–176, 2004.
- 138 HUANG, X. et al. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n.6, p. 2115-2120, 2006.

- 139 CHEN, H. et al. Understanding the photothermal conversion efficiency of gold nanocrystals. **Small**, v. 6, n. 20, p. 2272–2280, 2010.
- 140 KOBAYASHI, H. et al. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. **Chemical Reviews**, v.110, n.5, p.2620–2640, 2010.
- 141 ZHANG, G. et al. Gold/Chitosan nanocomposites with specific near infrared absorption for photothermal therapy applications. **Journal of Nanomaterials**, v.2012, p.1, 2012. doi:10.1155/2012/853416.
- 142 LI, Y. et al. Copper sulfide nanoparticles for photothermal ablation of tumor cells. **Nanomedicine**, v. 5, n. 8, p.1161–1171, 2010.
- 143 CHEN, Z. et al. Applications of functionalized fullerenes in tumor theranostics. **Theranostics**, v. 2, n. 23, p. 238–250, 2012.
- 144 YANG, X. et al. Gold nanomaterials at work in biomedicine. **Chemical Reviews**, v.115, n.19, p.10410–10488, 2015.
- 145 CHEN, Y. W. et al. Functionalized graphene nanocomposites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p.190–204, 2016. doi:10.1016/j.addr.2016.05.022.
- 146 ACIK, M. et al. Unusual infrared-absorption mechanism in thermally reduced graphene oxide. **Nature Materials**, v.9, n.10, p.840–845, 2010.
- 147 ROBINSON, J. T. et al. In Vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window with long circulating carbon nanotubes capable of ultrahigh tumor uptake. **Journal of the American Chemical Society**, v.134, n.25, p.10664–10669, 2012.
- 148 ANTARIS, A. L. et al. Ultra-low doses of chirality sorted (6,5) carbon nanotubes for simultaneous tumor imaging and photothermal therapy. **ACS Nano**, v. 7, n. 4, p. 3644–3652, 2013.
- 149 UMRAO, S. et al. Microwave-assisted synthesis of boron and nitrogen co-doped reduced graphene oxide for the protection of electromagnetic radiation in ku-band. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 35, p. 19831–19842, 2015.
- 150 VOIRY, D. et al. High-quality graphene via microwave reduction of solution-exfoliated graphene oxide. **Science**, v. 353, n. 6306, p. 1413–1416, 2016.
- 151 WATTS, J. F.; WOLSTENHOLME, J. Electron spectroscopy: some basic concepts. In: _____ **An introduction to surface analysis by xps and aes**. New York: John Wiley & Sons, 2003. doi:10.1002/0470867930.ch1
- 152 PARK, S.; RUOFF, R. S. Chemical methods for the production of graphenes. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 4, p. 217–224, 2009.
- 153 YUAN, W.; VAN OOIJ, W. J. Characterization of organofunctional silane films on zinc substrates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 185, n. 1, p.197–209, 1997.

- 154 HOU, S. et al. Formation of highly stable dispersions of silane-functionalized reduced graphene oxide. **Chemical Physics Letters**, v. 501, n. 1–3, p.68–74, 2010.
- 155 MEI, X.; OUYANG, J. Ultrasonication-assisted ultrafast reduction of graphene oxide by zinc powder at room temperature. **Carbon**, v. 49, n.15, p. 5389–5397, 2011.
- 156 FUENTE, E. et al. Infrared spectroscopy of carbon materials: a quantum chemical study of model compounds. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 26, p. 6350–6359, 2003.
- 157 IQBAL, M. Z. et al. Effect of solvent on the uncatalyzed synthesis of aminosilane-functionalized graphene. **RSC Advances**, v. 4, n. 13, p. 6830–6839, 2014.
- 158 CHEN, W.; YAN, L.; BANGAL, P. R. Chemical reduction of graphene oxide to graphene by sulfur-containing compounds. **Journal of Physical Chemistry C**, v.114, n. 47, p.19885–19890, 2010.
- 159 VAN KHAI, T. et al. Significant enhancement of blue emission and electrical conductivity of N-doped graphene. **Journal of Materials Chemistry**, v.22, n.34, p.17992, 2012.
- 160 VAN KHAI, T. et al. Influence of N-doping on the structural and photoluminescence properties of graphene oxide films. **Carbon**, v. 50, n. 10, p. 3799–3806, 2012.
- 161 LI, X. et al. Simultaneous nitrogen doping and reduction of graphene oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 43, p. 15939–15944, 2009.
- 162 SHANG, Y. et al. Preparation of N-doped graphene by hydrothermal method and interpretation of n-doped mechanism. **Nano**, v. 12, n. 2, p.1750018, 2017.
- 163 SHEN, K. et al. One-step synthesis of band-tunable N, S co-doped commercial TiO₂ /graphene quantum dots composites with enhanced photocatalytic activity. **RSC Advances**, v.7, n. 38, p.23319–23327, 2017.
- 164 DIMIEV, A. et al. Pristine graphite oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 5, p. 2815–2822, 2012.
- 165 LIN, Z. et al. Facile synthesis of nitrogen-doped graphene via pyrolysis of graphene oxide and urea, and its electrocatalytic activity toward the oxygen-reduction reaction. **Advanced Energy Materials**, v.2, n.7, p.884–888, 2012.
- 166 LUO, Z. et al. Pyridinic N doped graphene: synthesis, electronic structure, and electrocatalytic property. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 8038, 2011.
- 167 GANGULY, A. et al. Probing the thermal deoxygenation of graphene oxide using high-resolution in situ x-ray-based spectroscopies. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 34, p.17009–17019, 2011.
- 168 REDDY, A. L. M. et al. Synthesis of nitrogen-doped graphene films for lithium battery application. **ACS Nano**, v. 4, n.11, p. 6337–6342, 2010.
- 169 FAN, X. et al. Deoxygenation of exfoliated graphite oxide under alkaline conditions: a green route to graphene preparation. **Advanced Materials**, v. 20, n. 23, p. 4490–4493, 2008.

- 170 WANG, X. et al. Covalent functionalization of graphene with organosilane and its use as a reinforcement in epoxy composites. **Composites Science and Technology**, v.72, n. 6, p. 737–743, 2012.
- 171 SCAFFARO, R. et al. Surface modification of poly(ethylene-co-acrylic acid) with amino-functionalized silica nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3849–3857, 2011.
- 172 KONKENA, B.; VASUDEVAN, S. Understanding aqueous dispersibility of graphene oxide and reduced graphene oxide through pka measurements. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v.3, n.7, p.867–872, 2012.
- 173 NIETO, A. et al. Functionalization degree of SBA-15 as key factor to modulate sodium alendronate dosage. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, n. 1–3, p.4–13, 2008.
- 174 LIU, Q. et al. Layer-by-layer assembly of polyelectrolyte and nanoparticles, monitored by capillary electrophoresis. **Chemistry: a european journal**, v.15, n. 46, p. 12828–12836, 2009.
- 175 CRESPILO, F. N. et al. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing pamam-encapsulated gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 35, p.17478–17483, 2006.
- 176 ANG, P. K. et al. High-throughput synthesis of graphene by intercalation–exfoliation of graphite oxide and study of ionic screening in graphene transistor. **ACS Nano**, v. 3, n. 11, p. 3587–3594, 2009.
- 177 WANG, S. et al. High mobility, printable, and solution-processed graphene electronics. **Nano Letters**, v.10, n.1, p.92–98, 2010.
- 178 CHEN, T. Y. et al. Label-free detection of DNA hybridization using transistors based on CVD grown graphene. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 103–109, 2013. doi:10.1016/j.bios.2012.07.059
- 179 DASA. et al. Monitoring dopants by Raman scattering in an electrochemically top-gated graphene transistor. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 4, p. 210–215, 2008.
- 180 WANG, H. et al. Hysteresis of electronic transport in graphene transistors. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7221–7228, 2010.
- 181 CHEN, F.; XIA, J.; TAO, N. Ionic screening of charged-impurity scattering in graphene. **Nano Letters**, v. 9, n. 4, p. 1621–1625, 2009.
- 182 HELLER, I. et al. Influence of electrolyte composition on liquid-gated carbon nanotube and graphene transistors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 48, p.17149–17156, 2010.
- 183 LATE, D. J. et al. Characteristics of field-effect transistors based on undoped and B- and N-doped few-layer graphenes. **Solid State Communications**, v.150, n.15–16, p.734–738, 2010.
- 184 LI, H. et al. Layer-by-layer assembly and uv photoreduction of graphene–polyoxometalate composite films for electronics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 24, p. 9423–9429, 2011.

- 185 EDA, G.; CHHOWALLA, M. Graphene-based composite thin films for electronics. **Nano Letters**, v. 9, n. 2, p. 814–818, 2009.
- 186 KOBAYASHI, T. et al. Channel-length-dependent field-effect mobility and carrier concentration of reduced graphene oxide thin-film transistors. **Small**, v. 6, n. 11, p. 1210–1215, 2010.
- 187 MINOT, E. D. et al. Carbon nanotube biosensors: the critical role of the reference electrode. **Applied Physics Letters**, v. 91, n. 9, p. 93507, 2007.
- 188 MIŠKOVIC, Z. L.; UPADHYAYA, N. Modeling electrolytically top-gated graphene. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 3, p. 505, 2010.
- 189 SOHN, I. Y. et al. pH sensing characteristics and biosensing application of solution-gated reduced graphene oxide field-effect transistors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 45, p. 70–76, 2013. doi:10.1016/j.bios.2013.01.051
- 190 ALPUIM, N. C. S. V. et al. Graphene field-effect transistor array with integrated electrolytic gates scaled to 200 nm. **Journal of Physics: condensed matter**, v. 28, n. 8, p. 85302, 2016.
- 191 ARTYUKHIN, A. B. et al. Controlled electrostatic gating of carbon nanotube fet devices. **Nano Letters**, v. 6, n. 9, p. 2080–2085, 2006.
- 192 FILLER, G. et al. Cystatin C as a marker of GFR—history, indications, and future research. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2005.
- 193 FINNEY, H.; NEWMAN, D. J.; PRICE, C. P. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 49–59, 2000.
- 194 DEY SARKAR, P. Cystatin C a novel marker of glomerular filtration rate review. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 139–144, 2005.
- 195 CONTI, M. et al. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 3, p. 288, 2006.
- 196 DONG, X. et al. Electrical detection of DNA hybridization with single-base specificity using transistors based on cvd-grown graphene sheets. **Advanced Materials**, v. 22, n. 14, p. 1649–1653, 2010.
- 197 LIN, X.; LI, Y. A sensitive determination of estrogens with a Pt nano-clusters/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 2, p. 253–259, 2006.
- 198 SONG, J.; YANG, J.; HU, X. Electrochemical determination of estradiol using a poly(l-serine) film-modified electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 38, n. 6, p. 833–836, 2008.
- 199 KIM, Y. S. et al. Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2525–2531, 2007.

- 200 LI, D. et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p.101–105, 2008.
- 201 LIU, X.; WONG, D. K. Y. Electrocatalytic detection of estradiol at a carbon nanotube|Ni(Cyclam) composite electrode fabricated based on a two-factorial design. **Analytica Chimica Acta**, v.594, n.2, p.184–191, 2007.
- 202 DU, D.; LI, P.; OUYANG, J. Nitrogen-doped reduced graphene oxide prepared by simultaneous thermal reduction and nitrogen doping of graphene oxide in air and its application as an electrocatalyst. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, n. 48, p.26952–26958, 2015.
- 203 ECH-CHAMIKH, E. et al. XPS study of amorphous carbon nitride (a-C:N) thin films deposited by reactive RF sputtering. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 90, n.10, p.1420–1423, 2006.
- 204 KUNDU, S. et al. Thermal stability and reducibility of oxygen-containing functional groups on multiwalled carbon nanotube surfaces: a quantitative high-resolution xps and tpd/tpv study. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 43, p. 16869–16878, 2008.
- 205 DESIMONI, E.; CASELLA, G. I.; SALVI, A. M. XPS/XAES study of carbon fibres during thermal annealing under UHV conditions. **Carbon**, v. 30, n. 4, p. 521–526, 1992.
- 206 SANDOVAL, S. et al. Tuning the nature of nitrogen atoms in N-containing reduced graphene oxide. **Carbon**, v. 96, p. 594–602, 2016. doi:10.1016/j.carbon.2015.09.085
- 207 SHEN, J. et al. Layer-by-layer self-assembly of graphene nanoplatelets. **Langmuir**, v. 25, n.11, p. 6122–6128, 2009.
- 208 PAWLUKOJC, A. et al. L-glutamine: dynamical properties investigation by means of INS, IR, RAMAN, 1H NMR and DFT techniques. **Chemical Physics**, v. 443, p. 17–25, 2014. doi:10.1016/j.chemphys.2014.08.003
- 209 MU, Q. et al. Size-dependent cell uptake of protein-coated graphene oxide nanosheets. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 4, p. 2259–2266, 2012.
- 210 LIU, S. et al. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets. **Langmuir**, v. 28, n. 33, p.12364–12372, 2012.
- 211 MOERZ, S. T. et al. Formation mechanism for stable hybrid clusters of proteins and nanoparticles. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 6696–6705, 2015.
- 212 CHONG, Y. et al. Reduced cytotoxicity of graphene nanosheets mediated by blood-protein coating. **ACS Nano**, v. 9, n. 6, p. 5713–5724, 2015.
- 213 ROPER, D. K.; AHN, W.; HOEPFNER, M. Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v.111, n. 9, p. 3636–3641, 2007.
- 214 REN, Q. et al. SnS nanosheets for efficient photothermal therapy. **New Journal of Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 4464–4467, 2016.

- 215 PATTANI, V. P.; TUNNELL, J. W. Nanoparticle-mediated photothermal therapy: a comparative study of heating for different particle types. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.44, n. 8, p. 675–684, 2012.
- 216 SAVCHUK, O. A., et al. Determination of photothermal conversion efficiency of graphene and graphene oxide through an integrating sphere method. **Carbon**, v. 103, p. 134–141, 2016. doi:10.1016/j.carbon.2016.02.075
- 217 AYALA-OROZCO, C. et al. Au nanomatryoshkas as efficient near-infrared photothermal transducers for cancer treatment: benchmarking against nanoshells. **ACS Nano**, v. 8, n. 6, p. 6372–6381, 2014.
- 218 JANEGITZ, B. C. et al. Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate. **Materials Science and Engineering C**, v. 37, p. 14–19, 2014. doi:10.1016/j.msec.2013.12.026