



IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASES EM MEMBRANAS DE ÓXIDO DE GRAFENO

Jéssica Menezes de Mélo Luzardo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia da Nanotecnologia.

Orientador(es): Renata Antoun Simão

Joyce Rodrigues Araújo

Rio de Janeiro

Julho de 2019

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASES EM MEMBRANAS DE ÓXIDO DE
GRAFENO

Jéssica Menezes de Mélo Luzardo

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DA NANOTECNOLOGIA.

Examinada por:

Prof. Renata Antoun Simão, Ph.D.

Dr. Joyce Rodrigues de Araújo, Ph.D.

Prof. Tiago Albertini Balbino, Ph.D.

Dr. Rodrigo de Santis Neves, Ph.D.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2019

Luzardo, Jéssica Menezes de Mélo

Imobilização de β -Galactosidases em membranas de óxido de grafeno/ Jéssica Menezes de Mélo Luzardo. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2019.

XV, 68 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Renata Antoun Simão

Joyce Rodrigues Araújo

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia da Nanotecnologia, 2019.

Referências Bibliográficas: p. 62-68.

1. Grafeno 2. Nanotecnologia. 3. B-Galactosidase. I. Simão, Renata Antoun *et al* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia da Nanotecnologia. III. Título.

Dedicatória

Dedico esta dissertação a Deus, toda minha família e amigos.

À Deus por ser o centro de tudo, por sempre guiar os meus caminhos, por ter aberto todas as portas pra que eu chegasse até aqui. Por estar no controle de todas as coisas e reger a minha vida.

Aos meus pais Ronaldo e Elian pelo apoio, por terem me dado a vida, por sempre zelarem pela minha boa educação, por nunca me deixarem desistir nos momentos difíceis, pelo incentivo a sempre ir atrás dos meus sonhos, enfrentar os desafios e lutar, colocando Deus à frente e dando o melhor de mim.

À minha irmã por sempre me ajudar a revisar meus textos e pelas madrugadas em que me fez companhia nos estudos, pela paciência em sempre me ouvir e me apoiar e refletir sobre todas as minhas decisões.

Ao meu noivo Gilmar por toda paciência e compreensão mesmo nos momentos de maior estresse e ansiedade que me ajudou a colocar a cabeça no lugar, respirar e acreditar que tudo ia dar certo.

Agradecimentos

Agradeço a todos os meus professores, em especial às minhas orientadoras Prof.^{as}. Renata Simão e Pesquisadora Joyce Araújo pela orientação, apoio e incentivo.

A toda equipe do Laboratório de Fenômenos de Superfície do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) pelo auxílio na produção deste trabalho, em especial aos meus alunos de IC, Daniele e Lucas, que participaram ativamente dos experimentos, à Letícia, ao Marcelo, à Kelly e à Sanair que sempre que podiam me ajudavam.

Ao Yuri, o Zé, o Heleno e Soraya por toda ajuda que me deram toda vez que eu ia ao Laboratório de Superfícies e Filmes Finos da COPPE/UFRJ.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia (PENt) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sendo representado pelo Prof. Sérgio Camargo e ao secretário do Programa Rafael.

Aos meus amigos do mestrado, em especial à Andressa por tantas noites que passamos estudando e aos trabalhos que realizamos juntas.

Ao INMETRO pelo apoio financeiro.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

IMOBILIZAÇÃO DE β -GALACTOSIDASES EM MEMBRANAS DE ÓXIDO DE GRAFENO

Jéssica Menezes de Mélo Luzardo

Julho/2019

Orientadores: Renata Antoun Simão

Joyce Rodrigues Araújo

Programa: Engenharia da Nanotecnologia

A utilização de enzimas como catalizadores requer a recuperação e reutilização para tornar o processo viável. A imobilização enzimática altera a estabilidade, atividade e especificidade enzimática. Não existe um método ou suporte único aplicável a todas as enzimas e suas várias aplicações. É de suma importância explorar novos substratos para imobilização com composição e estrutura apropriadas de forma a melhorar a eficiência das enzimas imobilizadas. Neste trabalho, a utilização de membranas de óxido de grafeno produzidas por rota química (GO) e eletroquímica (EG) para imobilização de β -Galactosidases foi investigada. Para caracterização das membranas, foram utilizadas as técnicas de microscopia de força atômica, espectroscopia Raman, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X e difração de raios-x. A técnica eletroquímica de voltametria cíclica foi utilizada para acompanhamento da reação de conversão da lactose em glicose assim como para avaliar a influência da utilização de tratamento por plasma nas membranas. As imagens de AFM mostraram que as membranas de EG tiveram uma melhor imobilização das enzimas na superfície. Então essa membrana foi tratada com diferentes plasmas para obtenção de suportes melhorados, porém, o plasma de argônio foi destrutivo e o jato de plasma contribuiu para a diminuição dos defeitos das folhas de grafeno, interferindo na interação entre o mesmo e o centro ativo das enzimas, dificultando avaliação da atividade por voltametria cíclica. Por fim, a membrana de EG sem modificação foi o melhor substrato para imobilização.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (M.Sc.)

IMMOBILIZATION OF β -GALACTOSIDASES ON GRAFENE OXIDE MEMBRANES

Jéssica Menezes de Mélo Luzardo

July/2019

Advisors: Renata Antoun Simão

Joyce Rodrigues Araújo

Department: Nanotechnology Engineering

The use of enzymes as catalysts requires recovery and reuse to make the process viable. Enzymatic immobilization changes enzyme stability, activity and specificity. There is no single method or support applicable to all enzymes and their various applications. It is very important to explore new substrates for immobilization with appropriate composition and structure in order to improve the efficiency of the immobilized enzymes. In this work, the use of graphene oxide membranes produced by chemical route (GO) and electrochemistry (EG) for immobilization of β -Galactosidases was investigated. For the membrane's characterization, the techniques of atomic force microscopy, Raman spectroscopy, X-ray excitation and X-ray diffraction spectroscopy were used. The electrochemical technique of cyclic voltammetry was used to monitor the reaction of conversion of lactose to glucose as well as to evaluate the influence of the use of plasma treatment on the membranes. The AFM images showed that the EG membranes had better immobilization of the enzymes on the surface. This membrane was treated with different plasmas to obtain improved substrates, however, the argon plasma was destructive and the plasma jet contributed to the reduction of the defects of the graphene sheets, interfering in the interaction between the same and the active center of the enzymes, making it difficult to evaluate the activity by cyclic voltammetry. Finally, the unmodified EG membrane was the best substrate for immobilization.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	1
1.1. DEFINIÇÃO DO TEMA E MOTIVAÇÃO	1
1.2. OBJETIVOS.....	2
1.2.1. OBJETIVO GERAL	2
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
1.3. GRAFENO.....	4
1.4. ÓXIDO DE GRAFENO.....	5
1.5. CATÁLISE ENZIMÁTICA	6
1.6. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	7
1.6.1. TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	9
1.6.1.1. ADSORÇÃO	9
1.6.1.1.1. ADSORÇÃO FÍSICA	9
1.6.1.1.2. LIGAÇÃO ELETROSTÁTICA	10
1.6.1.1.3. ADSORÇÃO HIDROFÓBICA	10
1.6.1.2. LIGAÇÃO COVALENTE.....	11
1.6.1.3. ENCAPSULAMENTO.....	12
1.6.1.4. RETICULAÇÃO	12
1.7. β -GALACTOSIDASE.....	13
1.8. SENSORES ELETROQUÍMICOS DE GRAFENO	16
1.8.1. ELETROQUÍMICA DO GRAFENO	20
1.8.2. ELETROQUÍMICA DE ENZIMAS	21
1.8.3. DETECÇÃO DE BIOMACROMOLÉCULAS	21
1.9. TECNOLOGIA DE PLASMA E O GRAFENO	24

MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
1.10. MATERIAIS.....	26
1.11. MÉTODOS.....	26
1.11.1. SÍNTESE DE MATERIAIS A BASE DE GRAFENO	26
1.11.1.1. VIA ELETROQUÍMICA.....	27
1.11.1.2. VIA ROTA QUÍMICA	28
1.11.2. PRODUÇÃO DE MEMBRANAS.....	29
1.11.3. IMOBILIZAÇÃO DE β - GALACTOSIDASE	30
1.11.4. TRATAMENTO COM PLASMA	31
1.11.4.1. PLASMA DE ARGÔNIO EM MEMBRANA.....	31
1.11.4.2. JATO DE PLASMA.....	32
1.11.5. CARACTERIZAÇÃO	33
1.11.5.1. ÂNGULO DE CONTATO	33
1.11.5.2. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	33
1.11.5.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	34
1.11.5.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X (XPS)	34
1.11.5.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX).....	35
1.11.5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	35
1.11.6. ENSAIOS ELETROQUÍMICOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
1.12. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA.....	38
1.12.1. AFM	38
1.12.2. ÂNGULO DE CONTATO	39
1.12.3. XPS.....	40
1.12.4. RAMAN	41
1.12.5. DRX.....	43
1.12.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA	44

1.13.	IMOBILIZAÇÃO.....	46
1.13.1.	ÂNGULO DE CONTATO	46
1.13.2.	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	47
1.14.	ELETROQUÍMICA	49
1.15.	PLASMA	53
1.15.1.	PLASMA DE ARGÔNIO EM MEMBRANA.....	53
1.15.2.	PLASMA DE AR SINTÉTICO.....	54
	CONCLUSÃO.....	59
	TRABALHOS FUTUROS	61
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grafeno como estrutura principal de alguns alótropos de carbono, como fulerenos, nanotubos e grafite [7].	4
Figura 2. Estrutura das folhas de óxido de grafeno e grupos funcionais. Os átomos de carbono estão representados em preto e os de oxigênio em vermelho [16].	6
Figura 3. Comparação entre catálise química e catálise enzimática. A) Conversão de um substrato em seu produto mediada por catalisadores não enzimáticos (orgânico / metal). B) Conversão de um substrato em seu produto mediada enzimaticamente. Os catalisadores não enzimáticos aceleram as reações, mas geralmente exibem um amplo espectro de substrato e produto. Existe um ganho de eficiência na utilização de enzimas que são específicas e menos dependentes da disponibilidade de catalisadores raros [18].	7
Figura 4. Comparação da utilização em reatores contendo enzima livre e enzima imobilizada, onde a utilização do método de imobilização permite uma fácil recuperação da enzima que pode ser novamente utilizada e de purificação do produto que não fica contaminado com a presença da enzima [20].	8
Figura 5. Até agora, vários procedimentos de imobilização foram desenvolvidos para imobilizar enzima em uma superfície sólida. Os diferentes métodos de imobilização enzimática são agrupados da seguinte forma e listados na figura: Adsorção; Ligação covalente; Aprisionamento; Reticulação [22].	13
Figura 6. Mecanismo de absorção da lactose por organismos de indivíduos: A) tolerantes à lactose e B) intolerantes à lactose [28].	14
Figura 7. Mecanismo da hidrólise enzimática da lactose catalisada por β -galactosidase β -galactosidase [30].	15
Figura 8. Resumo da utilização de enzimas como a β -galactosidase em diversas áreas, não só em pesquisa como na indústria.	16
Figura 9. Esquema de reação de síntese de óxido de grafeno via eletroquímica.	27

Figura 10. Mecanismo esquemático da esfoliação eletroquímica do grafeno [45].	28
Figura 11. A) Reagentes iniciais da síntese de óxido de grafeno; B) produto do processo de síntese; C) Solução da síntese filtrada para retirada do grafite não oxidado; D) Óxido de grafite filtrado deixado para decantação; E) Óxido de grafeno decantado; F) Decantado, levado para centrifugação e lavagem; G) Solução final de óxido de grafite; H) Óxido de grafite liofilizado que é posteriormente esfoliado em banho ultrassônico para produção de GO.....	29
Figura 12. Esquema de filtração das membranas de óxido de grafeno, EG e GO.	30
Figura 13. Método de Imobilização das enzimas em membranas.	31
Figura 14. (a) Esquema de representação do reator indutivo. (b) Reator indutivo [46].	32
Figura 15: Sistema de plasma atmosférico PlasmaPen, onde foi realizado o tratamento das amostras de óxido de grafeno em solução.....	32
Figura 16. Um projeto típico de um biossensor eletroquímico modificado por enzimas [38].	37
Figura 17. Imagem de AFM (modo contato intermitente) da membrana de óxido de grafeno crescida por via eletroquímica, EG (A) e membrana de óxido de grafeno pelo método de oxidação química, baseado na metodologia de <i>Hummers</i> , GO (B). Nas duas imagens foi possível perceber as rugas típicas de materiais de grafeno, referentes às folhas de grafeno sobrepostas.....	39
Figura 18. Medidas de ângulo de contato em água da membrana de EG (A) e GO (B).	40
Figura 19. Espectros XPS das amostras de EG e GO na região do C1s.....	41
Figura 20. Espectro Raman de EG e GO.....	42
Figura 21. Padrões DRX das amostras de grafite, óxido de grafite e EG [62].....	43
Figura 22. Padrões de DRX das membranas de GO e de EG.....	44
Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura, onde: A) membrana de EG, B) seção transversal de uma membrana de EG, C) membrana de GO e D) seção transversal de uma membrana de GO.....	45

Figura 24. Medidas de ângulo de contato das membranas de EG (A, B, C, D) e GO (E, F, G, H) em diferentes concentrações de enzimas.....	47
Figura 25. Imagem de AFM da membrana de EG após a imobilização das enzimas em diferentes concentrações.....	48
Figura 26. Imagem de AFM da membrana de GO após a imobilização das enzimas em diferentes concentrações.....	49
Figura 27. Voltamogramas do eletrodo impresso de carbono (A) com as soluções de lactose pura (preto), glicose pura (vermelho), lactose com enzima livre (azul), lactose com enzima livre após 48h (verde) e lactose com imobilizada (magenta). E o mesmo para o eletrodo impresso modificado com EG (B) com as soluções de lactose pura (preto), glicose pura (vermelho), lactose com enzima livre (azul) e lactose com imobilizada (magenta).....	52
Figura 28. Imagem de AFM da membrana de EG tratada por plasma de argônio após imobilização de enzima. Tratamento de 1 min. (A), 3 min. (B) e 5 min. (C).	54
Figura 29. A) Imagem de AFM da membrana de EG e em B) Imagem de AFM da membrana de EG após o tratamento por jato de plasma em solução.	55
Figura 30. Espectro Raman de EG em comparação com o EG tratado com jato de plasma.	56
Figura 31. Voltamograma do eletrodo impresso modificado por EG tratado por jato de plasma.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros analíticos de alguns sensores e biosensores fabricados com grafeno e suas performances [35].	18
Tabela 2 Parâmetros analíticos de alguns sensores e biosensores fabricados com óxido de grafeno (GO) e suas performances [35].	18
Tabela 3. Parâmetros obtidos da deconvolução do espectro em alta resolução de XPS na região do C1s.	41
Tabela 4. Valores médios dos parâmetros de ajuste das bandas D e G para amostras de EG e comparação com parâmetros de óxido de grafeno (GO).	42
Tabela 6: Posição de pico para as moléculas de lactose e glicose.	50
Tabela 5: Nomenclatura dos eletrodos.	52
Tabela 7: Nomenclatura do eletrodo de EG modificado por plasma.	56
Tabela 8: Posição de pico das amostras de EG e EG-Plasma na voltametria cíclica.	58

LISTA DE ABREVIACÕES

GOS -Galactossacarídeos

SAM - Monocamada auto-organizada

GO- Óxido de grafeno produzido por rota química

EG- Material de grafeno produzido por eletroquímica

ECI - LAC- Eletrodo de carbono impresso em solução de lactose 1mM

ECI - GLIC - Eletrodo de carbono impresso em solução de glicose 1mM

ECI – LAC(el) - Eletrodo de carbono impresso em solução de lactose 1mM e enzima livre

ECI(ei) - LAC - Eletrodo de carbono impresso com enzima imobilizada em solução de lactose 1mM

EGI - LAC- Eletrodo de carbono impresso modificado com EG em solução de lactose 1mM

EGI - GLIC - Eletrodo de carbono impresso modificado com EG em solução de glicose 1mM

EGI – LAC(el) - Eletrodo de carbono impresso modificado com EG em solução de lactose 1mM e enzima livre

EGI(ei) - LAC - Eletrodo de carbono impresso modificado com EG com enzima imobilizada em solução de lactose 1mM

EGIP - LAC- Eletrodo de carbono impresso modificado com EG (tratado por plasma) em solução de lactose 1mM

EGIP - GLIC - Eletrodo de carbono impresso modificado com EG (tratado por plasma) em solução de glicose 1mM

EGIP – LAC(el) - Eletrodo de carbono impresso modificado com EG (tratado por plasma) em solução de lactose 1mM e enzima livre

EGIP(ei) - LAC - Eletrodo de carbono impresso modificado com EG (tratado por plasma) com enzima imobilizada em solução de lactose 1mM

INTRODUÇÃO

1.1. DEFINIÇÃO DO TEMA E MOTIVAÇÃO

Enzimas são excelentes catalisadores biológicos, altamente específicos e fundamentais em reações bioquímicas. Aceleram a velocidade de reações sem serem consumidas ou modificadas. Desempenham papéis indispensáveis em organismos vivos, regulando quase todas as reações químicas envolvidas em processos biológicos, como transdução de sinal, expressão gênica, respostas imunes, metástases e metabolismo. Além de seus papéis *in vivo*, as enzimas são amplamente utilizadas na área de saúde, indústria alimentar e ambiental, biocombustíveis, bem como na área de ciências da vida. Portanto, a regulação da atividade e estabilidade enzimática é muito importante e sempre atraiu grande atenção. Foram descobertos reguladores de enzimas variados tais como proteínas e peptídeos. Recentemente, os nanomateriais evoluíram como alternativa promissora para a modulação enzimática [1].

O uso de enzimas como biocatalisadores nas indústrias é atualmente uma solução para muitos problemas da química orgânica moderna, que tenta realizar as reações mais complexas sob as regras da química verde [2]. Essa estratégia se beneficia das excelentes propriedades das enzimas, incluindo condições brandas de reação e alta seletividade. No entanto, enzimas livres sofrem por sua baixa estabilidade, reciclabilidade e reutilização, o que limita as suas aplicações em processos industriais. Esses problemas podem ser resolvidos por imobilização enzimática em substratos. Recentemente, uma série de transportadores, incluindo esferas, membranas, fibras, cápsulas, esponjas foram aplicadas para imobilizar enzimas e construir reatores enzimáticos [3].

Com o desenvolvimento de materiais nanoestruturados, uma série de nanomateriais, com diferentes tamanhos e formas, foram utilizados como substratos para imobilização enzimática demonstrando que sua utilização têm algumas vantagens em relação aos substratos sólidos bulk. O grafeno e o óxido de grafeno (GO) atraíram a atenção dos pesquisadores devido as suas propriedades físicas e químicas interessantes e aplicações amplamente demonstradas em vários campos, incluindo a biotecnologia e a biomedicina [1].

O óxido de grafeno pode ser considerado como o análogo isolante e desordenado do grafeno cristalino altamente condutor. A natureza isolante e defeituosa do GO não permite a observação de efeitos fundamentais de matéria condensada bidimensional (Ex.: efeito Kondo; efeito hall quântico; supercondutividade; plasmon; cristal de Wigner; termoeletricidade), o que limitou o interesse dos físicos no material. Os químicos, no entanto, estão cada vez mais atraídos pelo GO por causa de sua estrutura química e eletrônica heterogênea. Sua estrutura híbrida sp^2 e a presença de vários tipos de grupos funcionais contendo oxigênio no plano basal e na borda da folha permitem que o GO interaja com uma ampla gama de materiais orgânicos e inorgânicos de forma não covalente, covalente e/ou iônicas, sendo assim, um substrato promissor para funcionalização multivalente e carregamento eficiente de pequenas moléculas orgânicas e biomacromoléculas [1,4].

As folhas de GO costumam ser um substrato ideal para o estudo da imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados. Conforme mencionado acima, a folha de GO contém grupos funcionais oxigenados, o que a transforma em substrato ideal para a imobilização de enzimas sem a necessidade de quaisquer modificações superficiais ou uso de quaisquer agentes de acoplamento [5].

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar membranas nanoestruturadas de óxido de grafeno para imobilização de enzimas utilizadas em processos industriais, como é o caso da β -Galactosidase. O óxido de grafeno foi sintetizado por rota química e eletroquímica, o que proporcionou estrutura química diferenciada e, portanto, propriedades diferentes como, por exemplo, o nível de oxidação, a quantidade de defeitos e hidrofobicidade. Dessa forma, espera-se avaliar qual o melhor tipo de suporte a ser empregado para a obtenção de maior seletividade e atividade em processos envolvendo a catálise enzimática.

1.2.2. OBEJTIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir membranas de grafeno a partir de diferentes metodologias, de modo a obter membranas físico-quimicamente diferentes (*Hummers* e rota eletroquímica).
- Realizar a caracterização estrutural, morfológica e química das membranas produzidas.
- Avaliar um método de imobilizar a enzima nos dois tipos de membranas utilizadas e qual a concentração de enzima foi mais eficiente na imobilização.
- Verificar se houve aumento na taxa de conversão de reagentes a produtos nas reações mediadas pela enzima e se houve melhora na atividade.
- Realizar tratamentos com plasma nas membranas e verificar se houve melhora na imobilização e na catálise.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.3. GRAFENO

Grafeno é o nome dado a uma monocamada de átomos de carbono sp^2 , que compõe o grafite. Nesta estrutura os átomos estão organizados em uma estrutura bidimensional, formando hexágonos. O grafeno é considerado a unidade estrutural básica de alguns alótropos de carbono (Figura 1), incluindo os fulerenos, nanotubos de carbono e o grafite [6].

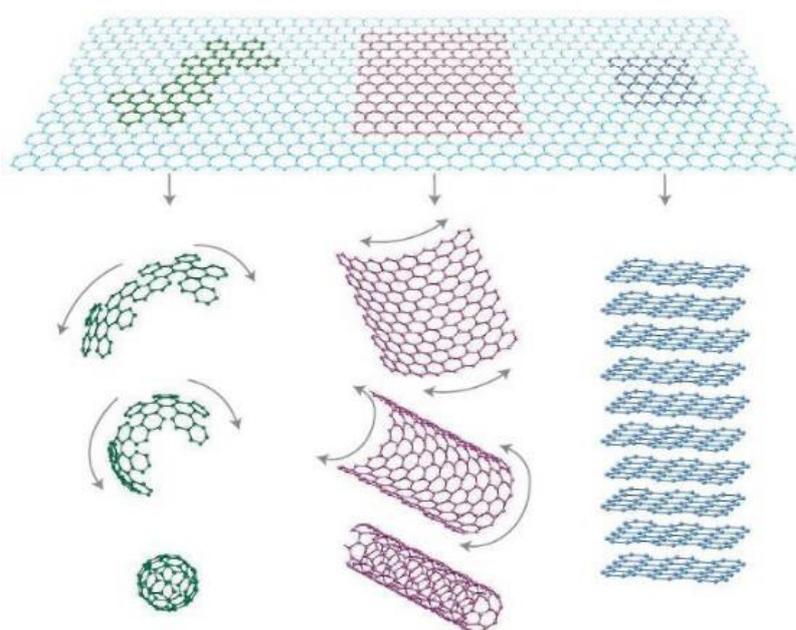


Figura 1. Grafeno como estrutura principal de alguns alótropos de carbono, como fulerenos, nanotubos e grafite [7].

O interesse na utilização do grafeno advém de diferentes razões: além da resistência mecânica e condutividade térmica elevada, este possui propriedades elétricas excelentes devido a sua estrutura de bandas apresentar transporte balístico (pouco espalhamento) e o livre caminho médio dos portadores de carga poder chegar a alguns micrômetros. Isso torna a mobilidade de portadores (elétrons e buracos) muito alta, o tornando um forte candidato a ser o sucessor do silício na indústria eletrônica [8].

1.4. ÓXIDO DE GRAFENO

O óxido de grafite tem uma estrutura em camadas semelhante ao grafite, mas o plano basal de átomos de carbono e as bordas no óxido de grafite têm grupos funcionais oxigenados, que não só expandem a distância entre camadas como também as tornam camadas atômicas espessas e hidrofílicas. Essas camadas oxidadas podem esfoliar em água sob ultrassonicação. O óxido de grafeno (GO) pode ser considerado como o análogo isolante e desordenado do grafeno cristalino altamente condutor [9].

Revisões abrangentes sobre a preparação de dispersões folhas de óxido de grafeno a partir de oxidação do grafite surgiram recentemente. Em geral, o GO é sintetizado pelo método de *Brodie* [10], *Staudenmaier* [11], ou *Hummers* [12], ou alguma variação desses métodos. Todos os três métodos envolvem a oxidação de grafite em vários níveis. *Brodie* [10] e *Staudenmaier* [11] usaram uma combinação de clorato de potássio (KClO₃) com ácido nítrico (HNO₃) para oxidar grafite, e o método *Hummers* [12] envolve o tratamento de grafite com permanganato de potássio (KMnO₄) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) [13]. A oxidação do grafite resulta numa estrutura em camadas de folhas de óxido de grafeno que são fortemente hidrofílicas, de tal modo que a intercalação de moléculas de água entre as camadas ocorre prontamente. A distância entre camadas entre as folhas de óxido de grafeno aumenta reversivelmente de 6 a 12 Å com o aumento da umidade relativa. Notavelmente, o óxido de grafite pode ser completamente esfoliado para produzir suspensões coloidais aquosas de folhas de óxido de grafeno por sonicação simples e agitando a mistura de água / óxido de grafite por um tempo suficientemente longo [14].

Segundo *Hsuet al.*, devido ao tipo de síntese, o plano basal do GO é circundado covalentemente pelos grupos epóxido e hidroxila, enquanto as bordas receberam grupos funcionais carboxílicos. Devido à presença de vários tipos de grupos funcionais contendo oxigênio no plano basal e bordas da folha, o GO aromático pode sofrer interações covalentes e não covalentes com diferentes moléculas. Híbridos e materiais compósitos à base de GO com propriedades melhoradas foram sintetizados com uma gama de moléculas orgânicas e inorgânicas por meio de interações covalentes, não covalentes e iônica [15].

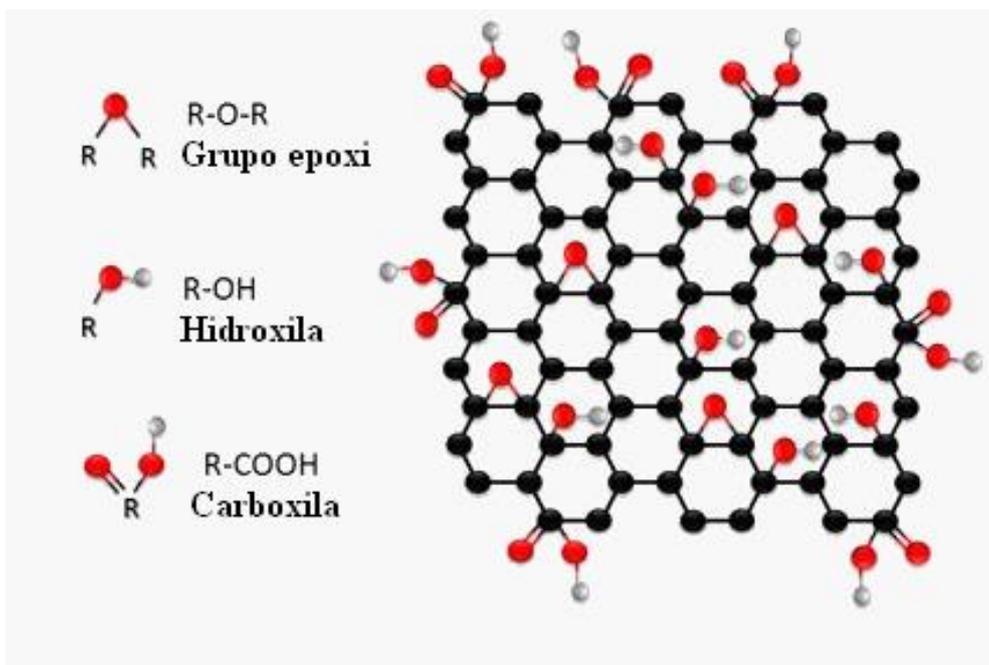


Figura 2. Estrutura das folhas de óxido de grafeno e grupos funcionais. Os átomos de carbono estão representados em preto e os de oxigênio em vermelho [16].

1.5. CATÁLISE ENZIMÁTICA

Industrialmente, as enzimas apresentam melhores características em relação aos catalisadores químicos (Figura 3), pois possuem alta especificidade por dado substrato e promovem a produção de apenas uma reação bioquímica, permitindo a síntese de um produto específico sem juntamente formar co-produtos. Existem inúmeras vantagens na utilização de enzimas, dentre elas, destacam-se à sua alta especificidade, suaves condições de reação e a diminuição de problemas ambientais e toxicológicos. Tratando-se da indústria alimentícia, com vantagens do emprego de enzimas, destacam-se a velocidade de reação, a ausência de toxicidade, a baixa concentração, a atuação sobre um único substrato e o incremento de reações em temperaturas e pH's brandos, que são necessários manter a estrutura desejada e outras propriedades do alimento. A utilização de temperatura e pH's brandos também minimizam o gasto de energia [17].

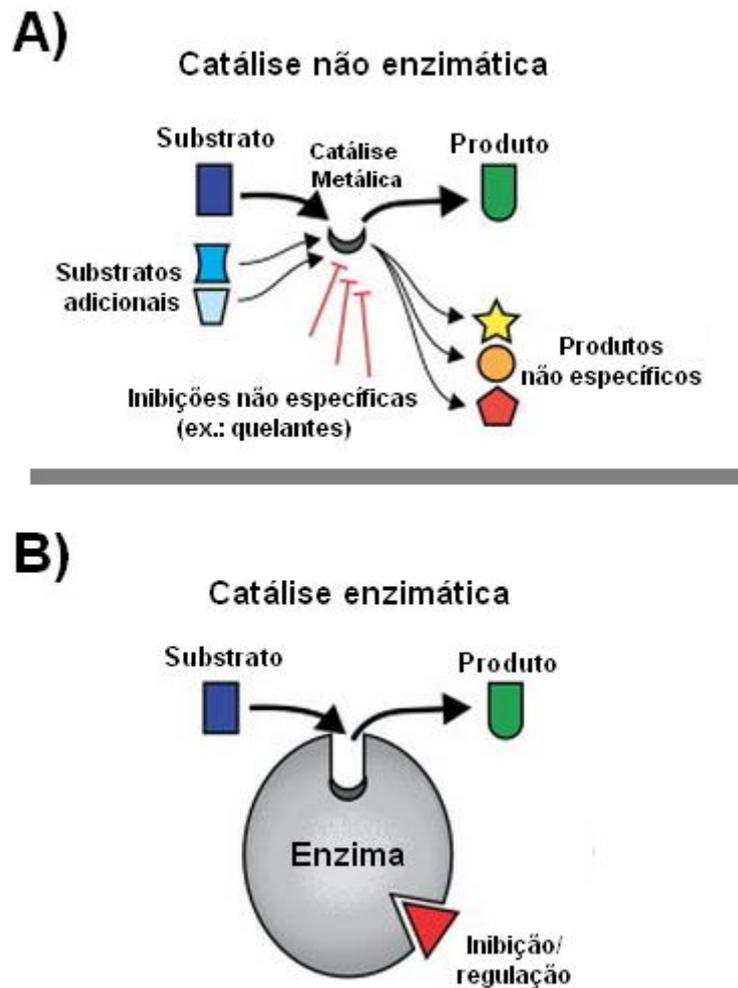


Figura 3. Comparação entre catálise química e catálise enzimática. A) Conversão de um substrato em seu produto mediada por catalisadores não enzimáticos (orgânico / metal). B) Conversão de um substrato em seu produto mediada enzimaticamente. Os catalisadores não enzimáticos aceleram as reações, mas geralmente exibem um amplo espectro de substrato e produto. Existe um ganho de eficiência na utilização de enzimas que são específicas e menos dependentes da disponibilidade de catalisadores raros [18].

1.6. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Apesar das vantagens inquestionáveis, existem alguns problemas práticos no uso de enzimas, são eles: alto custo de isolamento e purificação, instabilidade de suas estruturas, uma vez que são isoladas dos seus ambientes naturais, e sua sensibilidade tanto

a condições de processo quanto a presença de substâncias que podem atuar como inibidores, o que resulta em curta duração da vida útil das enzimas. Além disso, ao contrário dos catalisadores químicos heterogêneos convencionais, as enzimas atuam dissolvidas em meio aquoso em sistemas de catálise homogêneos e, dessa forma, contaminam o produto impossibilitando de serem recuperadas da solução em sua forma ativa para serem reutilizadas [19].

Um dos métodos mais bem sucedidos para superar essas limitações é a imobilização enzimática. A imobilização é alcançada através da fixação de enzimas em suportes sólidos, formando-se sistemas enzimáticos heterogêneos. Ao imitar o modo natural de ocorrência em células vivas, onde as enzimas na maioria dos casos estão ligadas às membranas celulares, esses sistemas estabilizam a estrutura das enzimas, melhorando sua atividade. Assim, em comparação com as enzimas livres, as enzimas imobilizadas em suportes são mais robustas e mais resistentes às mudanças ambientais. Mais importante ainda, os sistemas imobilizados são heterogêneos e permitem uma recuperação fácil tanto da enzima quanto do produto (Figura 4), reutilização múltipla de enzimas, operação contínua de processos enzimáticos, finalização rápida de reações e maior variedade de projetos de biorreator [19].

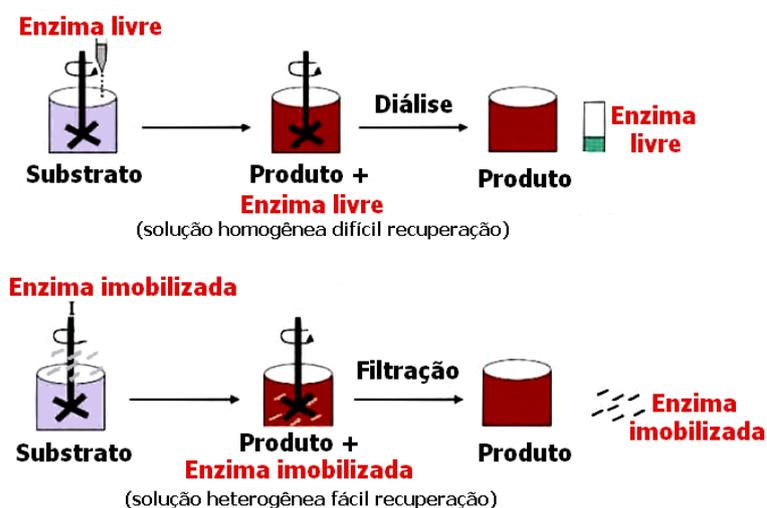


Figura 4. Comparação da utilização em reatores contendo enzima livre e enzima imobilizada, onde a utilização do método de imobilização permite uma fácil recuperação da enzima que pode ser novamente utilizada e de purificação do produto que não fica contaminado com a presença da enzima [20].

1.6.1. TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO

Basicamente, três métodos tradicionais de imobilização enzimática podem ser utilizados: ligação a um suporte (adsorção física ou ligação covalente), aprisionamento (encapsulamento) e reticulação.

1.6.1.1. ADSORÇÃO

As principais vantagens da imobilização por adsorção são a simplicidade da técnica e o baixo custo, pois esta não necessita de ativação do suporte. O método de adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, já que a imobilização ocorre de forma espontânea e a enzima é imobilizada em uma orientação preferencial e energeticamente favorável [21].

A imobilização por adsorção é um processo simples e econômico que é livre de reagentes, de baixo custo e geralmente não destrutivo em relação à atividade enzimática, pois não envolve qualquer funcionalização do suporte. No entanto, esta técnica apresenta desvantagens: as enzimas são fracamente ligadas ao suporte pela fraca ligação física, de modo que mudanças na temperatura, pH ou força iônica podem resultar na dessorção / lixiviação da enzima [22].

A imobilização por adsorção é comumente dividida em três subcategorias. Os detalhes sobre elas serão discutidos abaixo.

1.6.1.1.1. ADSORÇÃO FÍSICA

Esse tipo de imobilização tem sido amplamente utilizado para desenvolver biossensores enzimáticos. As enzimas são absorvidas na matriz de suporte através de forças fracas não específicas, como pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas. No entanto, estas forças relativamente fracas podem resultar num processo reversível em que pode ocorrer a fuga de enzimas da matriz quando forem alteradas as condições que influenciam a força de interação como, por exemplo, pH, força

iônica, temperatura ou polaridade do solvente. Em geral, este método oferece simplicidade, regeneração da superfície e baixo custo. Adicionalmente, a camada enzimática imobilizada obtida não tem homogeneidade na orientação dos sítios ativos da molécula ligada, dessa forma, a ligação ao substrato pode ser dificultada.

1.6.1.1.2. LIGAÇÃO ELETROSTÁTICA

Para utilizar a força eletrostática na imobilização enzimática tem que se levar em consideração o pH da solução de reação e o ponto isoelétrico da enzima (é o valor de pH onde a enzima apresenta carga elétrica líquida igual a zero). A superfície das moléculas enzimáticas pode suportar carga positiva ou negativa, dependendo da diferença comparativa entre o ponto isoelétrico da enzima e o valor do pH da solução, definindo um valor de pH correto, a enzima pode ser imobilizada na superfície do suporte com carga oposta via interações iônicas e fortemente polares. Duas técnicas comuns de imobilização por adsorção eletrostática são deposição de camada por camada e dopagem eletroquímica, que tem sido amplamente empregada no desenvolvimento de biossensores enzimáticos [22].

1.6.1.1.3. ADSORÇÃO HIDROFÓBICA

Outra forma de adsorção de enzimas em um suporte é por meio de interações hidrofóbicas entre as moléculas de suporte e da enzima. Quando uma molécula de enzima desloca um grande número de moléculas de água, tanto do suporte como da sua própria superfície durante a imobilização, há um ganho de entropia resultante das interações hidrofóbicas entre as duas entidades. A força de interação dependerá fortemente da hidrofobicidade do suporte e da enzima [22].

A força das interações depende da hidrofobicidade do adsorvente e da proteína, regulada pelo tamanho da molécula do ligante hidrofóbico e pelo grau de substituição do suporte. A modulação adicional das interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte é alcançada através do ajuste do pH, temperatura e concentração de sal durante a imobilização da enzima [23].

1.6.1.2. LIGAÇÃO COVALENTE

Esse tipo de imobilização consiste na ligação da enzima ao suporte por ligações covalentes. A ligação covalente é um dos métodos mais utilizados para a imobilização irreversível de enzimas. O grupo funcional que faz parte da ligação da enzima geralmente envolve a ligação através das cadeias laterais de lisina (grupo ϵ -amino), cisteína (grupo tiol) e ácidos aspárticos e glutâmicos (grupo carboxílico, imidazol e fenólico são grupos que não essenciais para a atividade catalítica da enzima) [23].

A força desse tipo de ligação é elevada e por envolver vários componentes da enzima, proporciona uma grande rigidez na sua estrutura. Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima sem alterações perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros. Dentre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em proporcionar estabilidade térmica e aumento do tempo de vida das enzimas [24].

A atividade da enzima ligada covalentemente ao substrato depende do tamanho e forma do material de suporte, natureza do método de acoplamento, composição do material de suporte e condições específicas usadas durante o acoplamento. O acoplamento com o suporte pode ser feito de duas maneiras, dependendo dos grupos ativos presentes na molécula que será imobilizada. Os grupos funcionais reativos podem ser adicionados ao suporte sem modificações, ou a matriz de suporte é modificada para gerar grupos ativados [23].

O procedimento de ligação da enzima ao suporte sólido geralmente passa por dois estágios: (1) ativação da superfície usando moléculas ligantes como glutaraldeído ou carbodiimida e (2) acoplamento covalente enzimático ao suporte ativado. As moléculas ligantes são reagentes multifuncionais (glutaraldeído ou carbodiimida) agindo como ponte entre a superfície do suporte e a enzima, via ligação covalente. Essas moléculas se ligam a superfície do substrato formando uma monocamada auto-organizada (SAM), e posteriormente, formando então uma ligação covalente com a enzima. Diferentes ligantes são usados para diferentes superfícies (material inorgânico, natural ou sintético polímero, membranas) e diferentes protocolos de imobilização [22].

Além das vantagens em estabilidade e aumento do tempo de vida, a imobilização covalente fornece alta uniformidade da camada SAM (gerando imobilização uniforme) e

bom controle da quantidade de enzima imobilizada. Entretanto, existe um alto risco de desnaturação da enzima, pois as mesmas devem passar por modificações químicas para possuir um grupo funcional específico. Além disso, o método requer alto volume de bioreagente, mas apenas pequenas quantidades de enzimas podem ser imobilizadas (~ 0,02 gramas por grama de matriz). Em comparação com a adsorção, a ligação covalente requer um tempo de incubação mais longo, uma vez que a formação do SAM e a subsequente ligação das enzimas a esta camada demoram várias horas. O processo também é mais complexo e deve-se tomar cuidado para garantir a pureza química de forma que a SAM seja obtida em alta homogeneidade [22].

1.6.1.3. ENCAPSULAMENTO

A imobilização de enzimas por encapsulamento envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Esse confinamento pode ser feito em uma rede de polímero (rede de gel) tal como um polímero orgânico ou um sol-gel de sílica, ou um dispositivo de membrana, tal como uma fibra oca ou uma microcápsula. As interações físicas geralmente são muito fracas, portanto, uma ligação covalente adicional para evitar o vazamento de enzimas, é geralmente necessária. A diferença entre o aprisionamento e a ligação de suporte geralmente não é clara. Sheldon [25] define a ligação de suporte como a ligação de uma enzima a um suporte pré-fabricado (portador) independentemente de a enzima estar situada na superfície externa ou interna [25].

O encapsulamento requer a síntese da rede polimérica na presença da enzima. Por exemplo, quando uma enzima é imobilizada em uma sílica mesoporosa pré-fabricada, a enzima pode estar situada principalmente nos mesoporos, mas isso não seria o aprisionamento. Por outro lado, quando a enzima está presente durante a síntese de um sol-gel de sílica, a enzima é aprisionada [25].

1.6.1.4. RETICULAÇÃO

Outra forma de imobilização de enzimas é a reticulação. Quioco e Richards [26] foram os primeiros a descrever a formação de cristais de enzima reticulados e

estabilizados. Os autores empregaram o uso de agente reticulante que levaram a formação de cristais insolúveis com elevada atividade catalítica. Existe um interesse crescente pelas enzimas imobilizadas sem transportadores, tais como cristais enzimáticos reticulados (CLECs), e agregados enzimáticos reticulados (CLEAs). Esta abordagem oferece vantagens claras: atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção devido à exclusão de um transportador adicional (caro) [25].

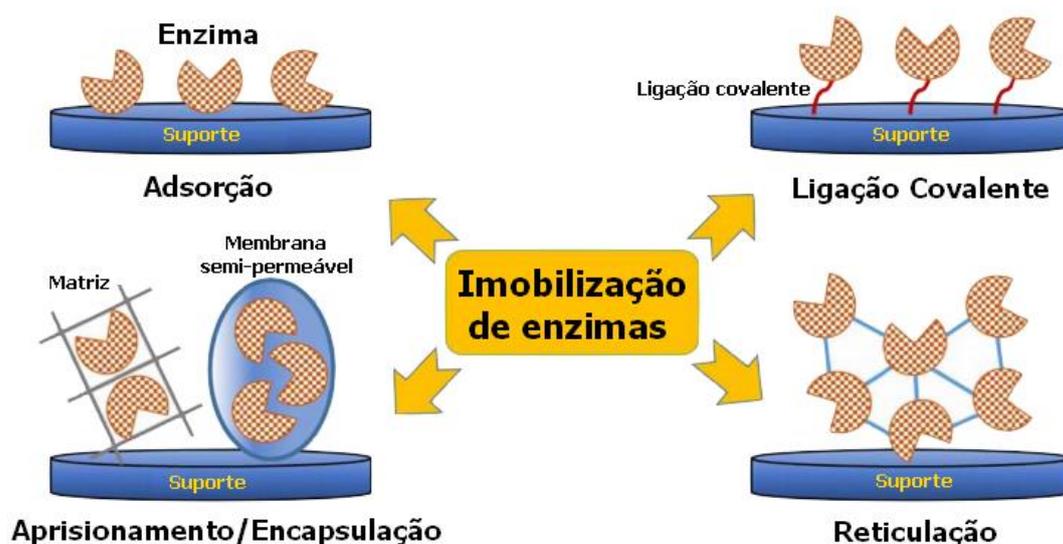


Figura 5. Até agora, vários procedimentos de imobilização foram desenvolvidos para imobilizar enzima em uma superfície sólida. Os diferentes métodos de imobilização enzimática são agrupados da seguinte forma e listados na figura: Adsorção; Ligação covalente; Aprisionamento; Reticulação [22].

1.7. β -GALACTOSIDASE

A β -galactosidase, mais conhecida como lactase, é uma enzima que desempenha a função de hidrolisar os resíduos de D-galactosil dos polímeros, oligossacarídeos ou metabólitos secundários. Estas enzimas têm duas aplicações principais: a remoção de lactose de produtos lácteos para pessoas intolerantes à lactose e a produção de produtos galactosilados [27].

A intolerância à lactose é uma doença comum em que o indivíduo tem dificuldade em processar a lactose. A principal causa dessa doença se resume à baixa concentração de β -galactosidases na mucosa do intestino delgado. Como resultado da má digestão da lactose, ocorre a produção de ácidos graxos de cadeia curta e gases como H_2 , CO_2 e metano. Esses produtos levam a sintomas que incluem dor abdominal, cólica, diarreia e náusea. Segundo Godoy, em uma perspectiva global, estima-se que cerca de 75% da população adulta exiba algum grau de intolerância à lactose [27].

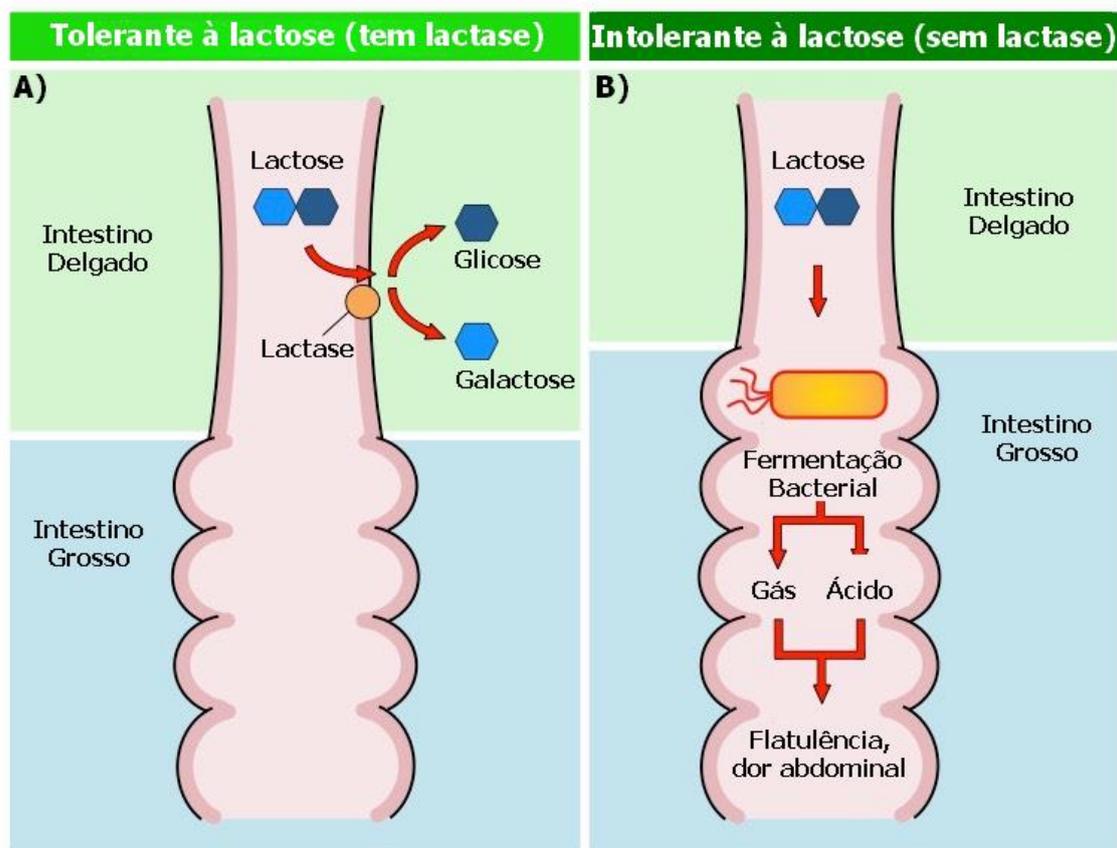


Figura 6. Mecanismo de absorção da lactose por organismos de indivíduos: A) tolerantes à lactose e B) intolerantes à lactose [28].

A lactose é um açúcar higroscópico, um dissacarídeo formado pela galactose e a glicose e tem uma forte tendência a absorver sabores e odores e causa muitos defeitos em produtos refrigerados, como cristalização em alimentos, desenvolvimento de textura arenosa e formação de depósitos. A lactase é amplamente utilizada na indústria para melhorar a doçura, a solubilidade, o sabor e a digestibilidade dos produtos lácteos. A hidrólise enzimática da lactose é uma das tecnologias mais populares para produzir leite com lactose reduzida e produtos lácteos para consumo de pessoas intolerantes à lactose.

Dessa forma, ao hidrolisar a lactose com β -galactosidase, os problemas associados com o descarte de soro, a cristalização em alimentos concentrados congelados e o consumo de leite por indivíduos intolerantes à lactose podem ser eliminados [29].

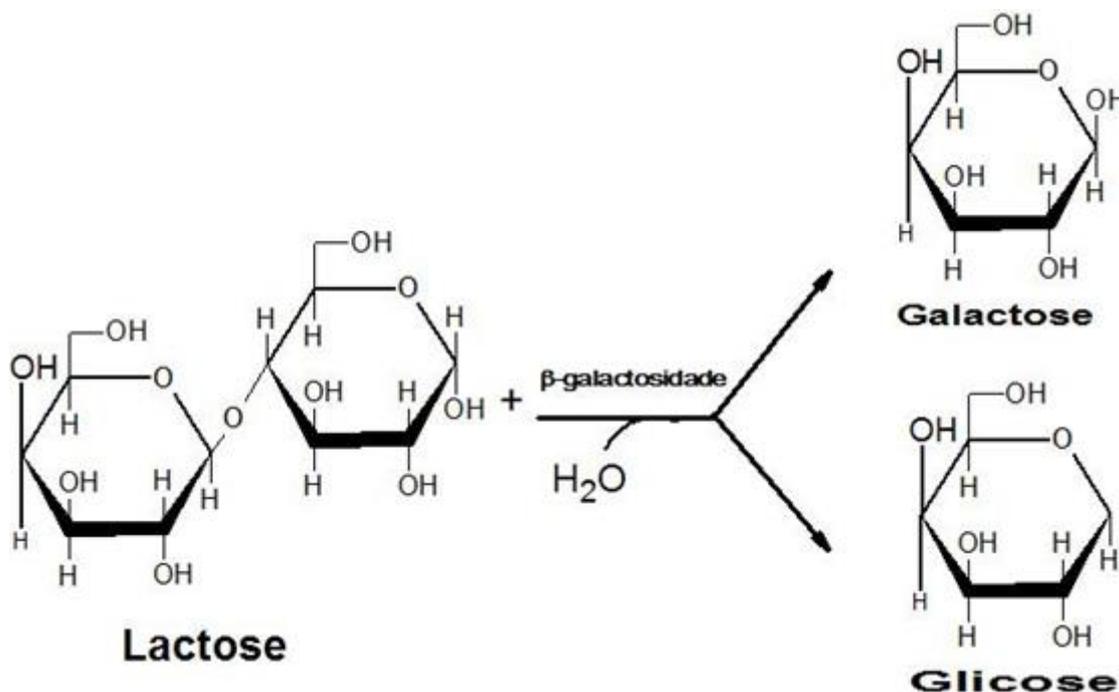


Figura 7. Mecanismo da hidrólise enzimática da lactose catalisada por β -galactosidase β -galactosidase [30].

A imobilização da β -galactosidase oferece inúmeras vantagens como término rápido das reações, formação controlada do produto, facilidade de remoção da enzima da mistura de reação e adaptabilidade a vários projetos de engenharia. Os reatores contendo β -galactosidase imobilizada têm sido extensivamente estudados, porque este é o ponto crítico na produção industrial de leite e soro livres de lactose. Muitos dos reatores enzimáticos usados na hidrólise da lactose incluem sistemas de membrana. Em um biorreator de membrana, o biocatalisador é confinado em uma região do espaço bem definida por meio de uma membrana seletiva, ou imobilizado por adsorção ou aprisionamento dentro da própria membrana. O uso desses sistemas é uma técnica eficaz. Tanto a conversão de lactose como a recuperação de proteínas pode ser realizada em uma única etapa [31]. Apesar de ser um processo relativamente simples, é considerado caro principalmente com relação ao alto custo e a quantidade das enzimas utilizadas. Portanto é de extrema importância para a indústria de laticínios, a caracterização de enzimas mais eficientes, estáveis e com perfis variados de atividade.

Além do seu papel na indústria de laticínios, as β -galactosidases também são amplamente utilizadas na indústria de alimentos funcionais. Isso porque os galactossacarídeos (GOS) são moléculas prebióticas que provocam alterações específicas na composição e/ou atividade da microflora intestinal, promovendo benefícios ao hospedeiro. Moléculas de GOS são tipicamente sintetizadas pela atividade das β -galactosidases sobre a lactose pelo processo de transglicosilação. Em 2005, somente o Japão produziu e comercializou cerca de seis mil toneladas de GOS sintetizadas a partir das β -galactosidases. A transglicosilação também diminui a quantidade de açúcar e aumenta a quantidade de fibras nos alimentos. Por todas essas razões, as β -galactosidases com alta atividade são um importante alvo comercial [27].

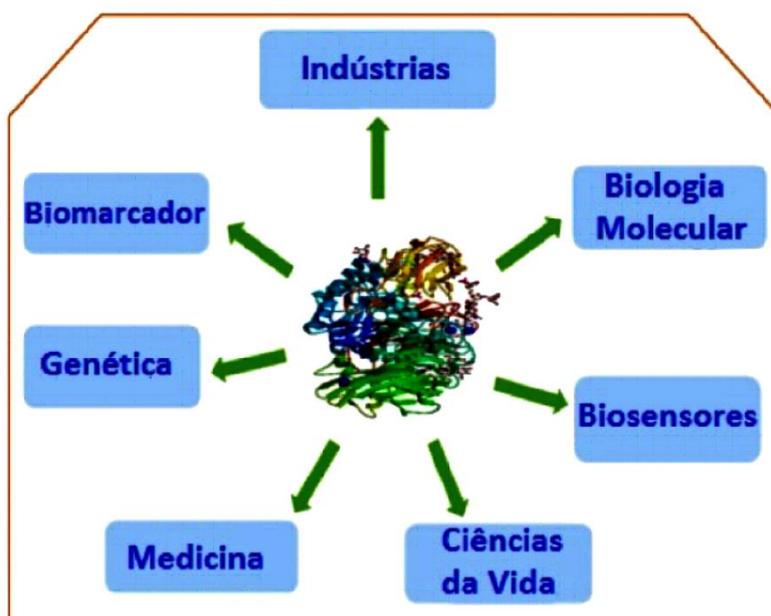


Figura 8. Resumo da utilização de enzimas como a β -galactosidase em diversas áreas, não só em pesquisa como na indústria.

1.8. SENSORES ELETROQUÍMICOS DE GRAFENO

Pesquisa em eletrodos de enzima em vários campos, como física, química, ciência dos materiais e biotecnologia resultou em biossensores mais sofisticados e confiáveis. Eles são adequados para aplicação em medicina, agricultura, biotecnologia, bem como pelos militares na detecção e prevenção de bioterrorismo. Os biossensores podem ser categorizados dependendo do mecanismo de transdução: (i) biossensores ressonantes, (ii) biossensores de detecção óptica, (iii) biossensores de detecção térmica, (iv) biossensores transístores de efeito de campo (FET – field-effect transistors) sensíveis a

íons e (v) biossensores eletroquímicos. Os biossensores eletroquímicos têm vantagens sobre os outros porque seus eletrodos podem detectar materiais presentes em amostras reais sem danificar o sistema. No entanto, o transporte de elétrons lento das biomoléculas limita as eficiências eletroquímicas dos sensores. Isto ocorre devido às características estruturais das proteínas e suas orientações desfavoráveis na superfície dos eletrodos [32].

A nanotecnologia permitiu novas aplicações de nanomateriais em sensores eletroquímicos e biossensores. Vários nanomateriais como nanopartículas metálicas, ligas metálicas com nanopartículas, nanopartículas magnéticas, nanofios, nanotubos de carbono e nanofibras de carbono têm sido utilizados como conectores elétricos entre os eletrodos e os centros redox de biomoléculas [32].

O carbono apresenta um grande potencial para ser o material mais utilizado em eletroanálise e eletrocatalise. Por exemplo, os nanotubos de carbono mostraram um excelente desempenho em biossensores, células de biocombustível e células de combustível de membrana de polímero/eletrólito. Os eletrodos baseados em grafeno mostraram desempenho superior em termos de atividade eletrocatalítica e condutividade em escala microscópica do que os baseados em nanotubos de carbono [33]. Esses indicam que as oportunidades em eletroquímica encontradas pelos nanotubos de carbono podem estar disponíveis para o grafeno. O grafeno é o bloco de construção básico para materiais gráfiticos de todas as outras dimensionalidades (fulerenos, nanotubose grafite) [34].

A descoberta do grafeno, em 2004, levou a uma nova perspectiva nas pesquisas voltadas a biossensores eletroquímicos. Devido à sua forma planar e estrutura química, o grafeno tem várias propriedades vantajosas em comparação com outros materiais para a construção de sensores e biossensores [32]. Sua estrutura química é composta por átomos de carbono contendo hibridização sp^2 , sendo que a ligação σ_{C-C} , no plano, é uma das ligações mais fortes existentes nos materiais enquanto que a ligação π_{C-C} , fora do plano, é responsável pela condução de elétrons do grafeno, proporcionando uma fraca interação entre as camadas de grafeno ou entre uma camada de grafeno e o substrato. Tal configuração eletrônica é a base para a sua grande área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), que é maior que a do grafite ($10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e nanotubos de carbono ($1315 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), alta força mecânica (200 vezes maior do que o aço), alta condutividade elétrica, que é 60 vezes mais elevada do que a do nanotubo de carbono de parede única (*single wall carbon nanotubes*

– SWCNT) e 6 ordens de magnitude maior do que o cobre e, por fim, sua alta elasticidade e condutividade térmica [35].

Tabela 1 Parâmetros analíticos de alguns sensores e biosensores fabricados com grafeno e suas performances [35].

Analito detectado	Tipo de sensor	Material do eletrodo	Material do sensor	Limite de detecção	Sensibilidade (inclinação)
Glicose	Sensor eletroquímico	GCE	Grafeno-NP cobre	0.5 μM (S/N $\frac{1}{4}$ 3)	1234 $\mu\text{A}\text{mM}^{-1}$ cm^{-2}
Colesterol	Biosensor eletroquímico	Grafite	Grafeno	5 μM	443.25 $\mu\text{A}\text{mM}^{-1}$ cm^{-2}
H ₂ O ₂	Biosensor eletroquímico	Óxido de grafite	NP ouro-filme de grafeno	0.11 μM (S/N = 3)	2774.8 $\mu\text{A}\text{mM}^{-1}$ cm^{-2}
Dopamina	Sensor eletroquímico	GCE	Grafeno e PVP	0.2 nM (S/N = 3)	-
Ácido ascórbico	Sensor eletroquímico	GCE	Grafeno	2.00 μM	0.06674 $\mu\text{A}\text{mM}^{-1}$ cm^{-2}
Ácido Úrico	Sensor eletroquímico	GCE	Grafeno	4.82 μM	-
Hidrogênio	Sensor eletroquímico	-	Grafeno-NP de paládio	20 ppm	-

Outros materiais relacionados, que pertencem à família do grafeno, são o óxido de grafeno (GO) e o óxido de grafeno reduzido (rGO). O GO é constituído por folhas de grafeno em camadas que contêm grupos funcionais oxigenados, tais como epóxidos, carboxilas, hidroxilas e alcoóis, localizados na borda e na superfície da folha com uma proporção de carbono para oxigênio de aproximadamente 3:1[35]. A presença desses grupos na superfície do grafeno pode aumentar o elétron deslocalizado e a taxa de transferência de carga e tornar o GO solúvel e biocompatível [35].

Tabela 2 Parâmetros analíticos de alguns sensores e biosensores fabricados com óxido de grafeno (GO) e suas performances [35].

Analito detectado	Tipo de sensor	Materia l do eletrodo	Materia l do sensor	Limite de detecçã o	Sensibilidad e (inclinação)
--------------------------	-----------------------	------------------------------	----------------------------	----------------------------	------------------------------------

Glicose	Biosensor eletroquímico	-	GO-NP de paládio	1 μM até 2 mM	-
Glicose	Sensor eletroquímico	GCE	GO-NP de ouro	0.05 μM	-
Dibutil Ftalato	Sensor eletroquímico	-	GO-MIP-Fe ₃ O ₄ -NP de ouro	8.0x10 ⁻¹⁰ mol L ⁻¹ (S/N = 3)	-
Glicose	Sensor eletroquímico enzimático	-	rGO		1.85 μAmM ⁻¹ cm ⁻¹
Antígeno carcinoembrionário	Immunosensor eletroquímico	GCE	rGO-NP de prata	0.12 pgmL ⁻¹ (S/N = 3)	-
4-nitrofenol	Sensor eletroquímico	GCE	rGO-MIP	0.005 μM (S/N = 3)	-
Pb ²⁺	Sensor eletroquímico	GCE	rGO-NP de Fe ₃ O ₄	1 ppb (S/N = 3)	R ² = 0.9923

Devido à sua forma planar e estrutura química, o grafeno tem várias propriedades vantajosas em comparação com outros materiais para a construção de sensores e biossensores. Por exemplo, a espessura atômica da folha de grafeno e sua relação superfície-volume extremamente alta tornam esse material altamente sensível à mudança das condições do ambiente local, o que é uma vantagem importante no campo de sensoriamento, uma vez que todos os átomos de carbono interagem diretamente com os analitos, promovendo assim maior sensibilidade do que nanofios de silício ou nanotubos de carbono [35]. Além disso, o grafeno exibe excelente capacidade de promover transferência de elétrons para algumas enzimas e excelente comportamento catalítico para pequenas moléculas como H₂O₂, NADH, o que torna o grafeno extremamente atraente para biossensores baseados em enzima [34].

Além disso, o uso de grafeno apresenta vantagem com relação aos outros nanomateriais que geraram avanço no campo de sensoriamento com relação a confiabilidade do sinal apresentado. O uso de nanopartículas metálicas como biossensores é problemático devido à sua amplificação de sinal inconsistente. Já com

relação aos nanotubos de carbono, existem impurezas metálicas oriundas de sua síntese, que acabam sendo a principal desvantagem ao se utilizar o mesmo na modificação do eletrodo. Tais impurezas metálicas são eletroquimicamente ativas e podem dominar a eletroquímica do nanotubo, além de que, impurezas presentes a 50 ppm podem ser tóxicas, já que podem participar de reações redox com as biomoléculas [32].

1.8.1. ELETROQUÍMICA DO GRAFENO

Existem diferentes tipos de nanomateriais baseados em grafeno e seu tipo está intimamente relacionado ao método de produção. O grafeno pode ser produzido de várias maneiras; por deposição química em fase de vapor (CVD), esfoliação mecânica de grafite ou esfoliação de óxido de grafite. Tanto o grafeno produzido via CVD quanto o grafeno esfoliado mecanicamente contêm grandes quantidades de defeitos ou funcionalidades. No entanto, quantidades em massa de nanomateriais à base de grafeno são tipicamente preparadas por diferentes métodos, como a esfoliação térmica do óxido de grafite, que leva a um material chamado grafeno termicamente reduzido ou, por exemplo, esfoliação do óxido de grafite para óxido de grafeno (GO) e o grafeno feito por esfoliação eletroquímica de grafite. Esses tipos de materiais costumam conter grandes quantidades de defeitos e diferem significativamente do grafeno imaculado (grafeno CVD) que possui uma estrutura alveolar perfeita. A presença dos defeitos não é desvantajosa sob o ponto de vista da eletroquímica. Pelo contrário, é bem conhecido que a transferência de elétrons em eletroquímica de carbonos sp^2 ocorre nas bordas e defeitos, e não no plano basal das folhas de grafeno. O óxido de grafeno possui uma estrutura que não é totalmente hexagonal porque a rede de carbono sp^2 foi muito danificada durante o processo de oxidação. Esta contém grandes quantidades de grupos funcionais oxigenados, o que pode ser benéfico para a ação das biomoléculas em eventos de bioreconhecimento através do uso de um biossensor [36]. O óxido de grafeno pode ser quimicamente ou eletroquimicamente reduzido, sendo que a rede sp^2 do carbono vem a ser parcialmente restaurada durante este processo, porém ainda é esperado que permanecessem alguns grupos funcionais oxidados. Os produtos desta redução são tipicamente referidos como óxido de grafeno quimicamente reduzido ou óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente. Todos esses tipos de estruturas de grafite, óxido de grafeno e os mesmos tratados química ou termicamente, nos permitem ter uma grande “caixa de

ferramentas” de grafeno para escolher o tipo certo de acordo com o mecanismo correto de aplicação e transdução [37].

A detecção eletroquímica é altamente sensível a moléculas eletroativas. Além da sensibilidade (que também é uma propriedade da detecção elétrica), ela também oferece seletividade de detecção, já que diferentes moléculas podem ser oxidadas/reduzidas em diferentes potenciais. O grafeno é um excelente condutor de carga elétrica. A transferência eletrônica heterogênea (a transferência de elétrons entre o grafeno e a molécula na solução necessária para a oxidação/redução da referida molécula) ocorre nas extremidades do grafeno ou em defeitos no plano basal. Assim, a alta área superficial do grafeno promove grandes quantidades de defeitos e, portanto, sítios eletroativos abundantes [37].

1.8.2. ELETROQUÍMICA DE ENZIMAS

A eletroquímica direta da enzima refere-se à comunicação eletrônica direta entre o eletrodo e o centro ativo da enzima sem a participação de mediadores ou outros reagentes, o que é muito significativo no desenvolvimento de biossensores, células a biocombustível e dispositivos biomédicos. Entretanto, a realização de eletroquímica direta de enzima redox em eletrodos comuns é muito difícil, porque os centros ativos da maioria das enzimas redox estão localizados profundamente em uma cavidade hidrofóbica da molécula. Nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas exibiram excelente desempenho aumentando a transferência direta de elétrons entre enzimas e eletrodos, e são amplamente utilizados atualmente. Devido à sua extraordinária propriedade de transporte de elétrons e a alta área superficial específica, espera-se que o grafeno funcional promova a transferência de elétrons entre substratos de eletrodos e enzimas [34].

1.8.3. DETECÇÃO DE BIOMACROMOLÉCULAS

Biossensores eletroquímicos acoplados a enzimas são baseados na detecção de um sinal elétrico produzido por uma espécie eletroativa, produzida ou exaurida por uma reação enzimática. O layout relativamente simples consiste em uma camada de bioreconhecimento de enzimas conectadas a um eletrodo de trabalho, um transdutor. As enzimas são moléculas de bioreconhecimento ótimas porque fornecem excelente

seletividade para o substrato alvo e têm alta atividade catalítica. Ao mesmo tempo, as enzimas são o componente de vida mais curta desses biossensores porque perdem gradualmente a atividade, determinando assim a vida útil do biossensor. Enquanto a camada enzimática catalisa a produção ou depleção de uma espécie eletroativa, uma tensão é aplicada ao eletrodo em sensores amperométricos, o que induz a reação redox das espécies eletroativas - gerando um sinal. Este sinal elétrico está correlacionado com a concentração de analito na amostra. Uma mudança no potencial do eletrodo também pode ser usada como a resposta mensurável do transdutor em sensores potenciométricos. Finalmente, um processador de sinal conectado a um transdutor coleta, amplifica e exhibe o sinal. O uso de eletrodos como transdutores de sinal em biossensores é bastante popular devido à alta sensibilidade e simplicidade operacional do método. A detecção eletroquímica também oferece seletividade adicional, pois diferentes moléculas eletroativas podem ser oxidadas/reduzidas em diferentes potenciais. Esse tipo de detecção também é compatível com a maioria dos métodos modernos de miniaturização/microfabricação, tem requisitos mínimos de energia e é independente da turbidez e cor da amostra. A maioria dos biossensores eletroquímicos baseados em enzimas não requer instrumentação extensiva, tornando-os relativamente baratos. Os eletrodos enzimáticos são usados em muitos pontos de atendimento e aplicações clínicas para uma ampla gama de analitos [38].

Os biossensores eletroquímicos também são populares devido a seus tempos de resposta relativamente rápidos e de baixo custo. Há, no entanto, desvantagens com sensores eletroquímicos, particularmente quando acoplados a uma reação enzimática [39]. O principal desafio no desenvolvimento desses biossensores eletroquímicos foi superar a transferência de elétrons, muitas vezes ineficiente, entre a enzima e a superfície do eletrodo. Isto é geralmente devido ao sítio ativo redox estar enterrado profundamente dentro da enzima e a incapacidade da enzima de se orientar favoravelmente em relação à superfície do eletrodo para uma rápida e eficiente transferência de elétrons. Outros desafios associados aos biossensores eletroquímicos que estão sendo abordados pelas pesquisas em andamento incluem a ligação não específica e, às vezes, a capacidade limitada de funcionar adequadamente em amostras reais devido à incrustação do eletrodo ou baixa seletividade do analito em uma matriz de amostra complexa. Há também esforços contínuos para miniaturizar os biossensores e torná-los biocompatíveis para medições *in vivo*. A biocompatibilidade costuma ser importante, uma vez que o sangue

e outros fluidos biológicos são as matrizes de amostras mais comuns para eletrodos enzimáticos em aplicações de química clínica. As principais aplicações dos biossensores eletroquímicos estão no controle de qualidade de alimentos e bebidas, segurança, monitoramento ambiental, bioprocessamento e, mais comumente, na área da saúde. A determinação de glicose no sangue continua sendo a aplicação mais dominante e mais estudada de biossensores eletroquímicos e, como tal, é a aplicação comercial mais bem-sucedida de biossensores acoplados a enzimas [38].

A combinação da bioseletividade e especificidade das enzimas com as numerosas e vantajosas propriedades químicas e físicas das nanopartículas permitiu o desenvolvimento de um novo subconjunto de dispositivos biossensores sensíveis.

A evolução dos biossensores eletroquímicos reflete um esforço para produzir uma via de transdução eficiente e seletiva - uma que forneça um sinal de analito amplificado e rápido e mínima interferência de fundo. Vários esquemas de sucesso foram descritos para estabelecer um contato próximo entre a enzima e o transdutor eletroquímico sem interferir no acesso do substrato ao sítio ativo da enzima ou alterar adversamente a conformação geral da enzima que, por sua vez, pode afetar sua atividade biocatalítica. No entanto, esses avanços fazem relativamente pouco para melhorar as propriedades intrínsecas do próprio transdutor. Ao modificar o transdutor, é possível aumentar ainda mais a seletividade do biossensor, aumentar a relação S/N e diminuir o limite de detecção. Nos últimos anos, a modificação de eletrodos com nanomateriais, como nanopartículas de ouro ou nanotubos de carbono, grafeno, mostrou-se promissora. Estudos recentes mostraram sua capacidade de fornecer uma plataforma amigável para imobilizar enzimas e melhorar ainda mais a transferência de elétrons entre o centro redox da enzima e eletrodo, resultando em tempos de resposta mais rápidos e, muitas vezes, maior sensibilidade [38].

Muitas vezes, a imobilização de enzimas também melhora sua estabilidade minimizando o desdobraimento de enzimas. Portanto, é benéfico investigar os métodos pelos quais esses nanomateriais são usados em biossensores, especificamente, como as enzimas são imobilizadas nesses eletrodos modificados[23].

1.9. TECNOLOGIA DE PLASMA E O GRAFENO

As técnicas baseadas no plasma têm sido predominantemente aplicadas à síntese inicial de materiais à base de carbono. O plasma também tem potencial para a funcionalização pós-síntese de materiais de carbono como é o caso do grafeno e do óxido de grafeno. As descargas de plasma podem permitir a fixação de diferentes espécies químicas do mesmo elemento à estrutura do grafeno. A seletividade associada ao plasma abriu novas dimensões na funcionalização do grafeno em termos de criação defeitos estruturais definidos e precisão no doping. [40]

Além de aplicar o plasma nas folhas de grafeno, as pessoas também usaram a técnica para reduzir e funcionalizar as folhas de óxido de grafeno e foram bem sucedidas. O óxido de grafeno (GO), o óxido de grafeno reduzido (RGO) e os seus compósitos com outros nanomateriais têm sido amplamente utilizados para produzir sensores, supercapacitores, etc. Diferentes gases individuais e as misturas de gases foram usados para criar o plasma. A tecnologia de plasma foi aplicada com uma variedade de condições de temperatura e pressão. O efeito do plasma foi observado para alterar o material em todos os aspectos. Afetou ou melhorou todas as propriedades, como elétrica, eletrônica, óptica e mecânica, etc. Em alguns casos, a aplicação de plasma introduziu algumas novas propriedades no GO. As espécies de plasma também desempenham um papel muito importante na reparação de defeitos de GO. [41]

Recentemente Wang et al. [42] prepararam com sucesso nanopartículas de Pt altamente dispersas em folhas de grafeno usando um plasma de frequência de rádio (ICP - RF) acoplado indutivamente em uma etapa em condições suaves. Essa redução de plasma simplesmente usa Ar, H₂, NH₃, ar, ou outros gases como o gás gerador de plasma, e não requer nenhum produto químico redutor. Usando a irradiação de plasma, a destruição das interações de van der Waals do grafeno em camadas múltiplas e a remoção dos grupos de oxigênio hidrofílico foi realizada ao mesmo tempo. Uma abordagem simples, de baixo custo e que respeita a química verde para preparar grafeno reduzido pelo plasma de H₂ e aplicá-lo como adsorvente para remover o 4,4-diclorobifenil (4,4'-DCB) de soluções aquosas. [42]

Vários métodos são usados para realizar tratamentos de plasma, o tipo de método determina em grande parte o efeito do plasma nas propriedades do óxido de grafeno. Os mais utilizados para a funcionalização do óxido de grafeno são os tratamentos em plasmas de nitrogênio, amônia, oxigênio, metano, hidrogênio e flúor. O tratamento em cada um desses plasmas tem características relacionadas à atividade química dos íons, ativados pela ação da radiação ultravioleta, por elétrons e outras espécies ativas do plasma. O efeito dos tratamentos com plasma nas propriedades GO ainda é pouco compreendido. Se compararmos a quantidade de trabalho dedicada ao tratamento de plasma de grafeno e óxido de grafeno, então este valor para o GO é muito menor. Para utilizar tratamentos de plasma para controlar as propriedades do óxido de grafeno, já que muitos mecanismos de modificação do grafeno em vários meios de plasma não foram totalmente investigados.

[43]

MATERIAIS E MÉTODOS

1.10. MATERIAIS

Para a síntese de GO (óxido de grafeno produzido por rota química) foi utilizado o grafite expandido adquirido da Nacional de Grafite Ltda (São Paulo, Brasil). Nitrato de sódio (NaNO_3), permanganato de potássio (KMnO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). O carbonato de cálcio (CaCO_3 , 98,5%) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para a síntese de EG (óxido de grafeno produzido por eletroquímica) foi utilizada uma folha de grafite de 0.25 mm de espessura obtida da Alfa Aesar, água purificada pelo sistema Milli-Q Millipore system (resistivity $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^2$). As soluções foram feitas a partir de n,n'-dimetilformamida (99%), obtida pela Sigma-Aldrich.

As enzimas utilizadas foram obtidas de amostras comerciais, sendo que para imobilização nas membranas foi utilizada a Lacday 10.000 FCC ALU (comprimido) enquanto que para os ensaios eletroquímicos, foi utilizada a Deslac Lactose Gotas 10.000 FCC ALU (gota).

Os eletrodos utilizados foram do tipo eletrodo impresso de carbono, marca SPE (6.1208.110), fabricante Metrohm, com diâmetro de trabalho de 4mm.

1.11. MÉTODOS

1.11.1. SÍNTESE DE MATERIAIS A BASE DE GRAFENO

No presente trabalho, o grafeno foi sintetizado por duas rotas de síntese: síntese química por oxidação do grafite e síntese eletroquímica utilizando grafite como eletrodo de trabalho. Cada uma das metodologias teve como resultado um grafeno com características físico-químicas diferenciadas.

1.11.1.1. VIA ELETROQUÍMICA

O óxido de grafeno foi sintetizado por esfoliação eletroquímica do grafite que consiste na utilização de um sistema com dois eletrodos onde um fio de platina atua como contra-eletródo e uma folha de grafite atua como eletródo de trabalho. Uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4(0,1 \text{ mol L}^{-1})$ foi utilizada como eletrólito suporte. Uma diferença de potencial de 10 V foi aplicada ao eletródo de grafite por aproximadamente 30 min para completar o processo de esfoliação. Depois da esfoliação, o material obtido foi filtrado a vácuo utilizando membranas de PTFE de 47mm com diâmetros na faixa de $0,45 \mu\text{m}$. Posteriormente, o material foi esfoliado por sonicação em dimetilformamida (DMF) utilizando um banho de ultrassom por 15 minutos [44].

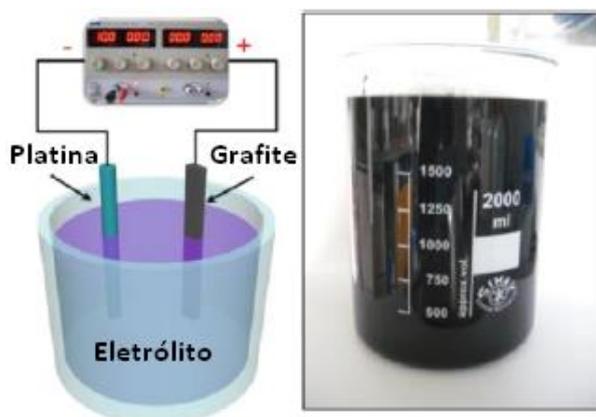


Figura 9. Esquema de reação de síntese de óxido de grafeno via eletroquímica.

Como esquematizado na Figura 10, as folhas de grafeno podem ser esfoliadas a partir do ânodo de grafite carregado positivamente por três etapas principais: (1) a oxidação inicial dos ânodos pelos íons hidroxila nucleofílicos (OH^-) que foram eletrolisados a partir da água, (2) intercalação do ânodo oxidado por ânions ou moléculas de água, (3) esfoliação do ânodo expandido em nanofolhas pelos gases formados a partir da eletro-oxidação dos íons intercalados ou moleculares [45].

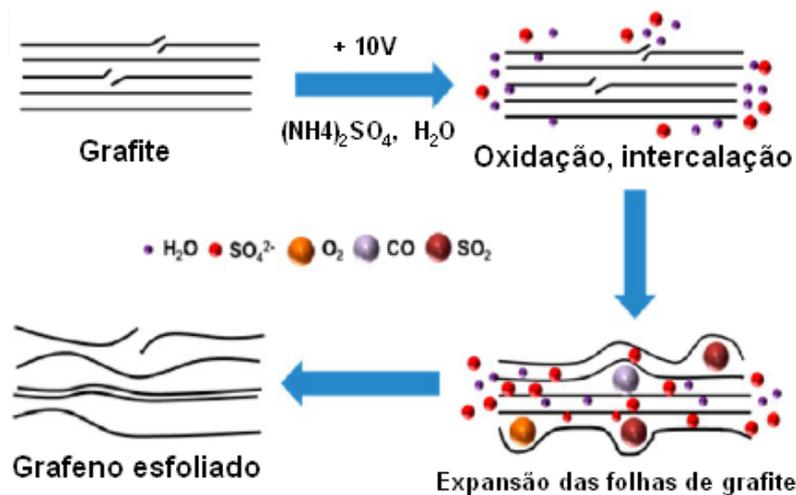


Figura 10. Mecanismo esquemático da esfoliação eletroquímica do grafeno [45].

1.11.1.2. VIA ROTA QUÍMICA

O GO foi preparado usando a metodologia de *Hummers* [12]. Para isto, foram adicionados H_2SO_4 concentrado (92 mL) a uma mistura de grafite expandido (2,0 g) e NaNO_3 (1,0 g). Após a mistura estar homogênea, adicionou-se KMnO_4 (3,0 g) lentamente. A mistura foi, então, aquecida a 35°C e agitada durante 30 min. Em seguida, foi adicionada água (300mL) lentamente ao meio, promovendo uma grande reação exotérmica e aumentando a temperatura para 98°C . O aquecimento externo foi utilizado para manter a temperatura de reação a 98°C durante 15 min e, depois, foi utilizado um banho de gelo para arrefecer o meio durante 10 min. Adicionou-se uma solução de 10 mL de H_2O_2 30% v / v em 90 mL de água para cessar a reação, produzindo outro processo exotérmico. Após a reação de oxidação cessar, obteve-se uma suspensão de cor marrom que foi lavada com solução de HCl 180 mL de água e 20 mL de solução de HCl a 30% (v/v) para remover os íons metálicos. Então, foi realizada uma filtração para separar o grafite que não foi oxidado. A solução filtrada foi deixada decantando por 24h para retirada do sobrenadante ácido. A parte decantada, correspondente ao grafite oxidado, foi então, exaustivamente lavada com água e centrifugada para remover o que restava de solução ácida. A cada lavagem, o pH do sobrenadante foi monitorado até se tornar neutro. A água residual foi removida usando um processo de liofilização. O óxido de grafite obtido nesta etapa foi esfoliado por banho ultrassônico por 30 min para produzir o GO.



Figura 11. A) Reagentes iniciais da síntese de óxido de grafeno; B) produto do processo de síntese; C) Solução da síntese filtrada para retirada do grafite não oxidado; D) Óxido de grafite filtrado deixado para decantação; E) Óxido de grafeno decantado; F) Decantado, levado para centrifugação e lavagem; G) Solução final de óxido de grafite; H) Óxido de grafite liofilizado que é posteriormente esfoliado em banho ultrassônico para produção de GO.

1.11.2. PRODUÇÃO DE MEMBRANAS

As membranas foram produzidas utilizando um sistema de filtração à vácuo do material de grafeno disperso em DMF. A espessura da membrana depende da concentração e do volume da suspensão. Para as membranas feitas com óxido de grafeno produzido via eletroquímica (EG), foram utilizadas soluções de 30 mL com concentração de 4mgmL^{-1} , utilizando DMF como solvente. Já para as membranas de óxido de grafeno produzido por rota química (GO) foram utilizadas soluções de 30 mL com concentração

de 1mg mL^{-1} , utilizando água milli-Q como solvente. Essas soluções foram levadas para filtração, utilizando membrana AnoporeDisc com diâmetro na faixa de $0,2\ \mu\text{m}$. Após o término da filtração as membranas foram levadas à estufa a 60°C até a secagem completa do solvente. Dessa forma a membrana de grafeno se soltou do disco de anodização e foi facilmente removida.

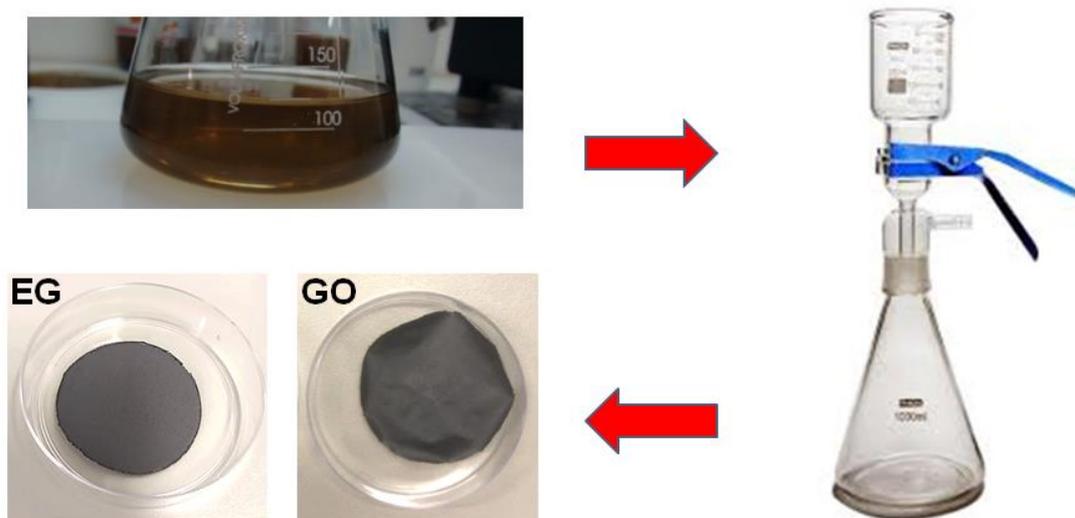


Figura 12. Esquema de filtração das membranas de óxido de grafeno, EG e GO.

1.11.3. IMOBILIZAÇÃO DE β - GALACTOSIDASE

A enzima foi imobilizada pelo método de adsorção. Para imobilização nas membranas, foram feitas soluções de PBS pH 4,5 e concentrações de β -Galactosidases de $0,5\ \text{mg mL}^{-1}$, $2,0\ \text{mg mL}^{-1}$, $5,0\ \text{mg mL}^{-1}$ e $10,0\ \text{mg mL}^{-1}$. Após as soluções ficarem prontas, o suporte sólido (membrana) foi colocado em contato com a solução enzimática por um período de 30 min sob condições adequadas que sustentaram a atividade enzimática, mantendo pH 4,5 e temperatura de 30°C . As moléculas enzimáticas não adsorvidas foram removidas da superfície por lavagem com tampão fosfato. Esse mesmo método foi utilizado pra imobilizar as enzimas nas membranas que posteriormente foram modificadas por plasma.

Para imobilização no eletrodo foi utilizada uma solução de 5 mg de enzima em PBS pH 4,5. Essa solução foi colocada sobre a superfície do eletrodo e deixada em estufa a

60°C até total secagem do solvente. Posteriormente, as moléculas enzimáticas não adsorvidas foram removidas da superfície por lavagem com tampão fosfato.

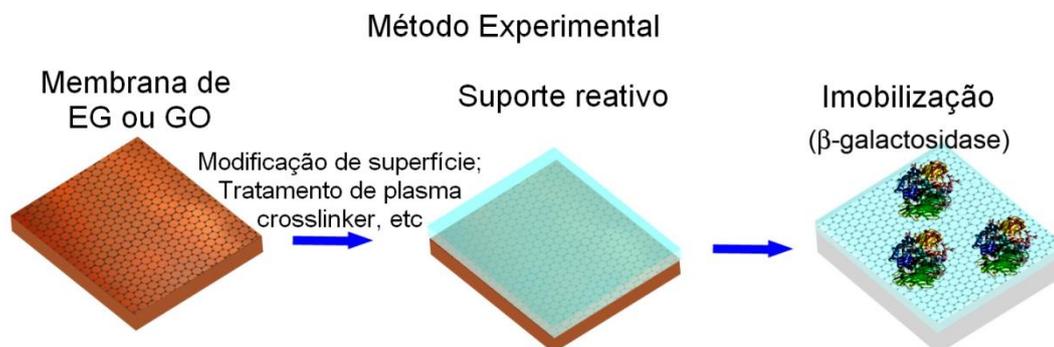


Figura 13. Método de Imobilização das enzimas em membranas.

1.11.4. TRATAMENTO COM PLASMA

1.11.4.1. PLASMA DE ARGÔNIO EM MEMBRANA

O tratamento de plasma foi realizado usando um reator indutivo construído no Laboratório de Superfícies e Filmes Finos da COPPE/UFRJ. O esquema do reator é apresentado na Figura 14a. Ele é composto por um sistema de radio frequência (RF) usando uma bobina indutiva ao redor de uma câmara tubular de vidro borosilicato. Dentro da câmara foi introduzido o porta amostras de vidro contendo as membranas de EG e de GO com um lado específico virado para a superfície, de modo a saber qual lado da membrana ficou em contato com o plasma. A atmosfera na câmara foi controlada por uma bomba de vácuo mecânica em um extremo do reator, e, do outro lado, um fluxo de gás controlado por uma válvula e um medidor de pressão.

O gás utilizado no reator foi o argônio. A potência utilizada foi de 60W, a pressão de base foi $3,3 \times 10^{-2}$ mbar, a pressão de trabalho foi de 1×10^{-1} mbar e o tratamento foi realizado durante 1 minuto para não danificar a superfície da membrana.

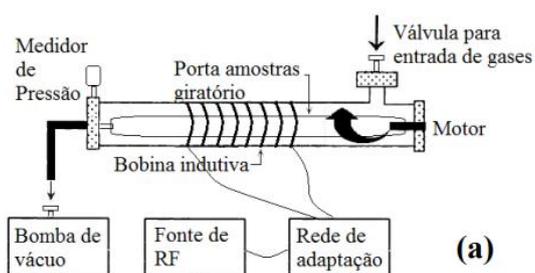


Figura 14. (a) Esquema de representação do reator indutivo. (b) Reator indutivo [46].

1.11.4.2. JATO DE PLASMA

Um sistema de jato de plasma atmosférico PlasmaPen™ PVA TePlaAmerica foi utilizado para modificar o EG em solução. O tratamento foi realizado utilizando ar atmosférico comprimido a 7 bar. A distância entre a solução e o bocal do jato de plasma foi mantida fixa a aproximadamente 1 cm. A solução permaneceu em agitação durante todo o tempo de tratamento a fim de conseguir um tratamento mais homogêneo. A solução de EG utilizada foi preparada da mesma forma descrita no item 1.11.2 e foi mantida em tratamento durante 2 minutos e meio.



Figura 15: Sistema de plasma atmosférico PlasmaPen, onde foi realizado o tratamento das amostras de óxido de grafeno em solução.

1.11.5. CARACTERIZAÇÃO

1.11.5.1. ÂNGULO DE CONTATO

Em geral, a molhabilidade de uma superfície sólida é fortemente influenciada tanto por sua composição química quanto por sua estrutura geométrica (ou rugosidade superficial). [47] As medidas de ângulo de contato foram utilizadas para analisar a molhabilidade das diferentes membranas sintetizadas. Além disso, o ângulo de contato também foi medido após as enzimas terem sido imobilizadas na superfície das membranas, dessa forma podendo verificar se a imobilização realmente ocorreu.

As medidas de ângulo de contato foram obtidas usando um goniômetro Ramé-Hart, EUA, 500. Foram pingadas gotas de 2µl de água destilada nas membranas de EG e de GO. As medidas foram realizadas em diferentes posições da membrana a fim de verificar a homogeneidade na superfície. A gota foi deixada em repouso durante 1 min a fim de ver se a gota seria absorvida pela membrana.

1.11.5.2. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma das técnicas de imagem de superfície em micro e nanoescala. Foi desenvolvida há mais de duas décadas e atualmente oferece amplo espectro de modos de medição. Devido à interação direta sonda-amostra, é possível determinar certas propriedades mecânicas, elétricas, térmicas e ópticas do material. Portanto, a utilização de AFM na investigação de um material tão avançado e de baixa dimensionalidade como o grafeno foi apreciada e tornou-se uma ferramenta padrão em diagnósticos de tecnologia de grafeno [48].

O microscópio de força atômica (AFM) (JPK Nanowizard II) foi utilizado para investigar a topografia das membranas e posteriormente das membranas após a imobilização das enzimas. Imagens de amostras foram obtidas em modo contato intermitente usando um cantilever Bruker RTEP, com frequência de ressonância de 273 kHz e constante elástica de 14 Nm⁻¹, determinada pelo método de *Sader*.

1.11.5.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman tem desempenhado historicamente um papel importante no estudo e caracterização de materiais grafiticos, sendo amplamente utilizado nas últimas quatro décadas para caracterizar grafite, fibras de carbono, carbono vítreo, fulerenos, nanotubos de carbono e grafeno. Para carbonos sp² como grafeno e nanotubos de carbono, a espectroscopia Raman pode fornecer informações sobre o tamanho dos cristalitos, agrupamento da fase sp², a presença de hibridização sp³ e a introdução de impurezas químicas, a magnitude da densidade de massa, dopagem, defeitos e outras desordens do cristal, estrutura da borda, tensão, número de camadas de grafeno, diâmetro do nanotubo, quiralidade, curvatura e finalmente o comportamento metálico versus semicondutor [49].

As análises espectroscópicas Raman foram realizadas em um espectrômetro RenishawInvia, com uma linha de laser de 514,5 nm em uma configuração de retroespalhamento usando um microscópio com objetiva de 100 ×. A potência do laser foi mantida abaixo de 0,1 mW (<2 W mm⁻²) para evitar o calor local e danos às amostras. Todos os espectros foram adquiridos usando 10 s de tempo de integração e 10 acumulações de 100 cm⁻¹ a 3600 cm⁻¹. O espectro final foi obtido pela média de cinco medidas tomadas em pontos aleatórios para avaliar a homogeneidade.

1.11.5.4. ESPECTROSCOPIA DE FOTOELÉTRONS EXCITADOS POR RAIOS X (XPS)

A técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X é utilizada para fornecer informações sobre a composição química de superfície das amostras de óxido de grafeno. Podendo quantificar quais átomos de carbono estão no plano basal do grafe e quais fazem ligação com grupos funcionais oxigenados na superfície como: grupo epóxi, carbonilas, carboxilas e ácidos carboxílicos [50].

As análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) foram realizadas em um meio de ultra-alto vácuo (pressão: 10^{-9} mbar) (fabricante, Scienta Omicron) utilizando fonte de raios-X não-monocromática, ânodo de Al ($K\alpha = 1486.7$ eV), com potência de emissão de 20 mA e tensão de 15 kV. Os espectros de varredura foram obtidos com energia de passo do analisador de 160 eV e passo de aquisição de 1 eV. Os espectros em alta resolução foram coletados na região do C 1s com energia de passo do analisador de 20 eV e passo de aquisição de -0.05 eV.

1.11.5.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A análise por DRX foi usada para caracterizar a natureza cristalina e a pureza de fase do GO sintetizado pelas diferentes rotas de síntese. Segundo Krishnamoorthy et al.[51], o padrão de DRX do grafite mostra um pico de difração a $2\theta = 26,3^\circ$ correspondendo a um espaçamento entre camadas de cerca de 0,34 nm e que com o aumento dos níveis de oxidação a intensidade do pico a $2\theta = 26,3^\circ$ começa a diminuir e, finalmente, desaparece nos níveis de oxidação mais elevados. Simultaneamente, também descreveram que foi possível observar o aparecimento de um novo pico em um ângulo de difração menor que começa a ficar mais intenso com o aumento dos níveis de oxidação, o que corresponde ao padrão de difração do GO. [51]

As análises de difração de raios-X (XRD) foram realizadas num difratômetro D8-Focus Bruker utilizando radiação de Cu- $K\alpha$ Ni-filtrada ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), utilizando um intervalo de exploração de $0,02^\circ$ e 2θ entre 5° e 40° . Uma camada fina de amostra foi preparada por secagem ambiente da suspensão aquosa em placas de Si.

1.11.5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Com o MEV podemos ter informações de superfície das membranas de óxido de grafeno, com uma boa resolução. Podemos diferenciar a morfologia de cada amostra e obter informações como rugosidade e espessura das membranas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura Orion NanoFab - Zeiss. A utilização desse microscópio foi devido a possibilidade da utilização do FloodGun (canhão de elétrons) que é capaz de neutralizar

a carga da superfície, não sendo necessária uma etapa de recobrimento metálico da amostra.

1.11.6. ENSAIOS ELETROQUÍMICOS

Biossensores eletroquímicos acoplados a enzimas são baseados na detecção de um sinal elétrico produzida por uma espécie eletro-ativa, seja produzido ou exaurido por uma reação enzimática. O layout relativamente simples consiste em uma camada de bio-reconhecimento de enzimas ligadas a um eletrodo de trabalho, um transdutor (Figura 16). Enquanto a camada enzimática catalisa a produção ou depleção de uma espécie eletro-ativa, uma tensão é aplicada ao eletrodo em sensores amperométricos, o que induz a reação redox das espécies eletroativas - gerando um sinal. Este sinal elétrico está correlacionado com a concentração de analito na amostra. Uma mudança no potencial do eletrodo também pode ser usada como a resposta mensurável do transdutor em sensores potenciométricos. Finalmente, um processador de sinal conectado a um transdutor coleta, amplifica e exibe o sinal. O uso de eletrodos como transdutores de sinal em biossensores é bastante popular devido à alta sensibilidade e simplicidade operacional do método [38].

A eletroquímica foi utilizada para verificar a atividade catalítica bem como a seletividade da enzima imobilizada sobre o grafeno, tratado e não tratado por plasma, e compará-las com a atividade e seletividade das enzimas livres em solução. O grafeno neste caso não foi utilizado na forma de membranas, pois as mesmas não foram desenhadas para atuarem como eletrodo suporte. Foi feita uma tentativa de utilização de célula específica para que estas membranas atuassem como eletrodo de trabalho, porém os contatos elétricos não foram eficientes em proporcionar uma boa razão sinal/ruído. Portanto, para as medições citadas acima, as amostras de grafeno percussoras, EG, foram solubilizadas em DMF e depositadas por *casting* sobre eletrodos impressos para determinação da atividade catalítica. Vale a pena ressaltar que a solução utilizada para fazer casting foi a mesma da preparação das membranas (4mg mL^{-1}) que foram caracterizadas química e morfológicamente. As medições de voltametria cíclica foram realizadas utilizando um potenciostato Autolab (modelo PGSTAT 204) e o software NOVA 1.11, foi utilizado para aquisição de dados. Os eletrodos utilizados foram: o de trabalho foi um eletrodo impresso de carbono (que foi posteriormente modificado com

EG), o contra-eletrodo foi um fio de platina e o eletrodo de referênciia foi o eletrodo de Ag/AgCl em uma soluçãõ de KCl 3 mol L⁻¹.

A nomenclatura a ser adotada em toda a dissertaçãõ foi: eletrodo impresso de carbono (ECI), eletrodo impresso de carbono com enzima imobilizada (ECI – LAC(ei)), eletrodo impresso de carbono modificado com EG (EGI) e um eletrodo impresso de carbono modificado com EG e enzima imobilizada (EGI- LAC(ei)). As medidas foram realizadas utilizando soluções de lactose 1mmol L⁻¹ e glicose 1mmol L⁻¹.

Os ensaios foram feitos utilizando voltametria cíclica (CV) usando a célula de três eletrodos, em PBS pH 7, na faixa de potencial entre -1,40 e 0,50 V, passo potencial de 2,4 mV e taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. Todas as medidas eletroanalíticas foram realizadas à temperatura ambiente.

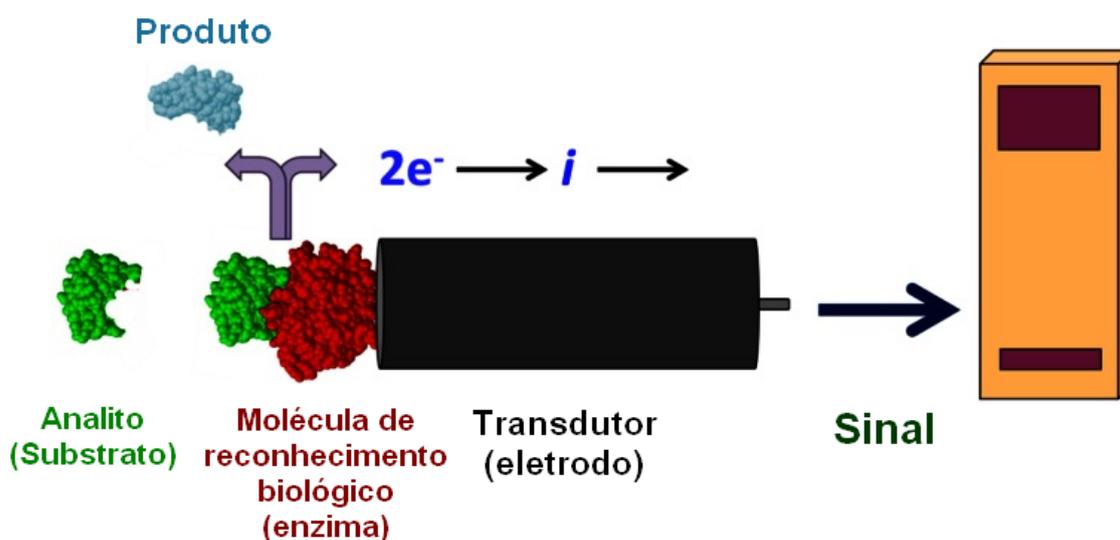


Figura 16. Um projeto típico de um biossensor eletroquímico modificado por enzimas [38].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O material de grafeno foi sintetizado por duas rotas diferentes e as membranas estudadas foram feitas a partir desses materiais. As membranas foram caracterizadas e as enzimas foram imobilizadas em sua superfície, a membrana que teve a melhor imobilização foi escolhida para a realização dos ensaios eletroquímicos e para a modificação por plasma.

1.12. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA

Caracterizações estruturais, químicas e morfológicas das membranas foram realizadas para elucidar sua estrutura eletrônica, pureza e nível de funcionalização usando técnicas AFM, ângulo de contato, Raman, XPS e DRX.

1.12.1. AFM

O AFM foi realizado a fim de verificar as características da superfície das membranas produzidas. A Figura 17 mostra uma imagem de topografia obtida por microscopia de força atômica (AFM) de uma membrana de EG (A) e GO (B). Nesta imagem é possível observar as típicas rugas “wrinkles” do grafeno e algumas regiões mais altas. Sabe-se que o EG apresenta grande heterogeneidade, podendo estar mais oxidado/esfoliado em algumas partes do que em outras, e também é possível encontrar no material algumas regiões não oxidadas/esfoliadas, tal qual o grafite original. Observa-se nesta imagem regiões com diferentes alturas o que indica que a membrana possui regiões com diferentes números de camadas de grafeno, empilhadas umas sobre as outras. Associando esta heterogeneidade da topografia aos diferentes tipos de defeitos existentes na folha de grafeno que constituem esta membrana, provenientes, sobretudo dos processos de oxidação e esfoliação eletroquímica, têm-se sítios de coordenação com potencial atividade para catálise, sendo que o desempenho catalítico depende da mobilidade eletrônica na superfície dos materiais. De tal maneira, espera-se que a membrana tenha ação sinérgica juntamente com as enzimas no processo de catálise, atuando não só como suporte, mas também como co-catalisador.

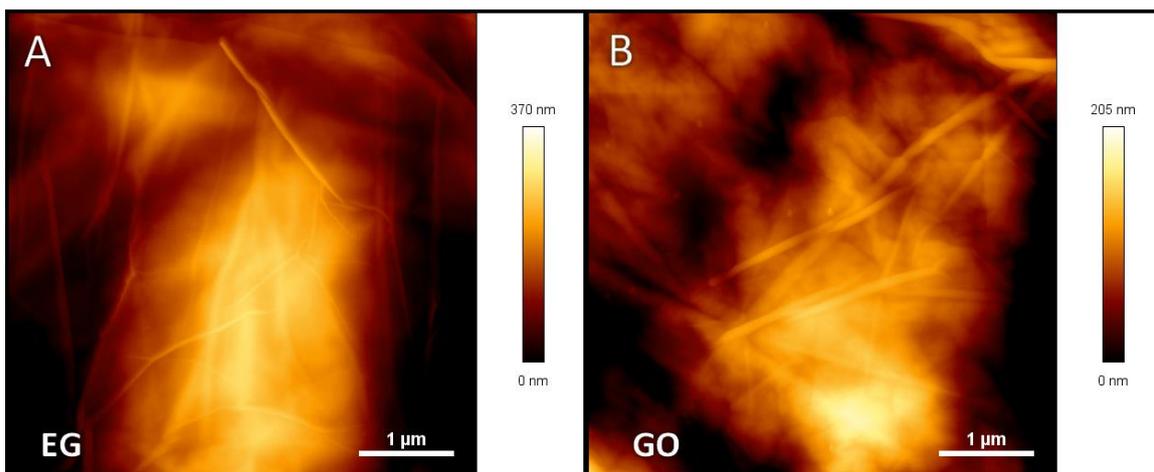


Figura 17. Imagem de AFM (modo contato intermitente) da membrana de óxido de grafeno crescida por via eletroquímica, EG (A) e membrana de óxido de grafeno pelo método de oxidação química, baseado na metodologia de *Hummers*, GO (B). Nas duas imagens foi possível perceber as rugas típicas de materiais de grafeno, referentes às folhas de grafeno sobrepostas.

1.12.2. ÂNGULO DE CONTATO

O ângulo de contato foi utilizado para verificar a molhabilidade das superfícies das membranas. O ângulo que a gota de água faz quando em contato com a superfície mostra se o material é mais hidrofílico ou é mais hidrofóbico. Esse fator está fortemente ligado a química de superfície do material analisado. No caso do óxido de grafeno, quanto maior a quantidade de grupos funcionais de superfície, maior a hidroflicidade, menor o ângulo de contato com a água. [41].

A Figura 18 mostra as medidas de ângulo de contato realizadas a fim de caracterizar o suporte antes da imobilização, utilizando como solvente a água. É possível perceber que a membrana de EG é menos hidrofílica que a membrana de GO devido ao maior valor do ângulo de contato da membrana de EG ($55,6^\circ$) comparado ao valor para a membrana de GO ($22,9^\circ$).

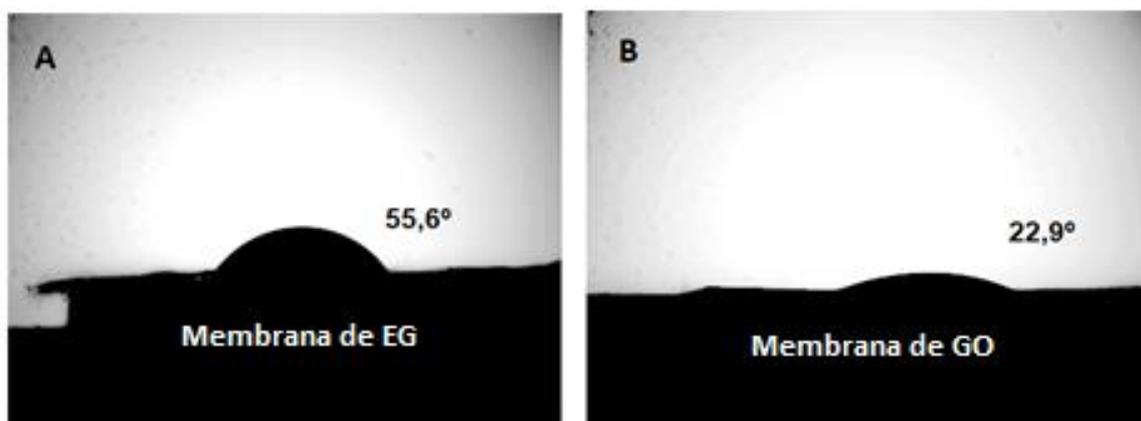


Figura 18. Medidas de ângulo de contato em água da membrana de EG (A) e GO (B).

1.12.3. XPS

A análise de XPS fornece informações valiosas sobre o grau de oxidação do EG e do GO. A Figura 19 mostra os espectros de XPS das amostras na região do C1s. O espectro para o pico C1s foi decomposto em seis componentes (função Gaussiana/Lorentziana na proporção 70:30) centradas nas seguintes energias: 284,6 eV (sp^2 , ligação C=C referente a cadeia carbônica do grafite), 285,5 eV (sp^3 , C-C ligação das cadeias carbônicas de grafite) 286,7 eV (C-OH e COC, grupos hidroxila e epóxi, respectivamente), 287,4 eV (C=O, carbonila), 288,8 eV (C-OOH, carboxila) e 291,4 eV ($\pi-\pi^*$, pico satélite referente à interação dos elétrons π , ou seja, dos elétrons da camada de valência com os elétrons do “core”). A Tabela 3 mostra a porcentagem de área dessas componentes em relação a área total do pico do carbono (C1s).

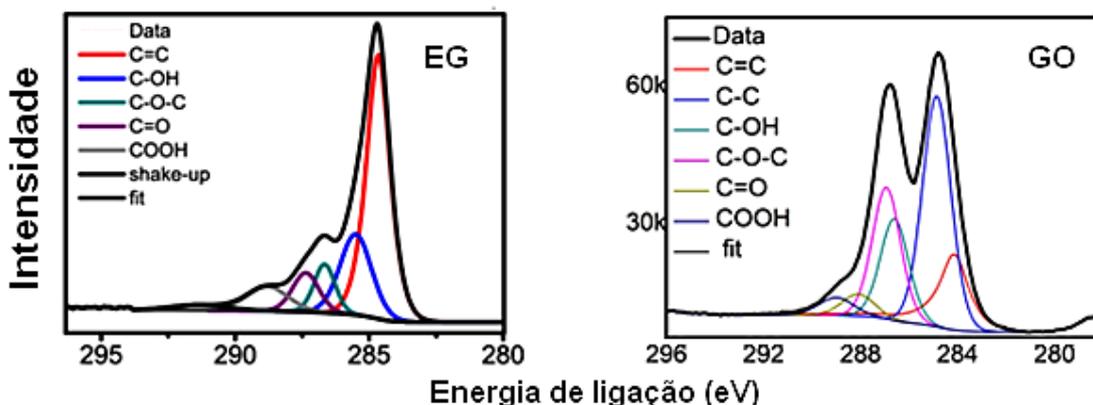


Figura 19. Espectros XPS das amostras de EG e GO na região do C1s.

Tabela 3. Parâmetros obtidos da deconvolução do espectro em alta resolução de XPS na região do C1s.

Amostra	C _{sp²}	C _{sp³}	C-OH C-O-C	C=O	COOH	π - π^*	sp ² /sp ³
EG	53	21	8	8	8	2	1.5
GO	18	32	39	6	5	-	0.2

Pela análise de XPS, é possível observar que o EG possui menor grau de oxidação do que um material típico de óxido de grafeno. O EG mostrou a relação sp^2/sp^3 de $\sim 1,5$, enquanto a razão sp^2/sp^3 para o GO foi de $\sim 0,2$. A componente do pico do satélite, chamada de *shake-up*, típico dos elétrons deslocalizados em sistemas aromáticos [52], é também um indicativo de que a estrutura hexagonal sp^2 do carbono é, em parte, preservada na amostra de EG enquanto que na amostra de GO esta não é presente, pois o processo oxidativo gera muitos defeitos afetando a estrutura hexagonal do grafeno [53].

1.12.4. RAMAN

O espectro Raman das membranas de EG e de GO é mostrado na Figura 20. A faixa a 1580 cm^{-1} , conhecida como banda G, representa o alongamento no plano de

átomos de carbono em estruturas grafíticas [54, 55, 56]. A presença de desordem ou defeitos na rede, como vacâncias, grupos funcionais contendo oxigênio e a adsorção de moléculas na superfície da estrutura grafítica, são reveladas pela presença da banda D, posicionada próxima a 1350 cm^{-1} [57,58]. As bandas posicionadas perto de 2700 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} são conhecidas como uma contribuição de segunda ordem da banda D (nomeada como 2D) e uma combinação de bandas G e D (nomeadas como D + G), respectivamente [59]. Assim, a amostra EG apresenta as bandas típicas atribuídas como bandas de grafeno e os parâmetros de ajuste de pico são característicos da estrutura de grafeno com maior densidade de defeitos do que o óxido de grafeno produzido pelo método químico (GO).

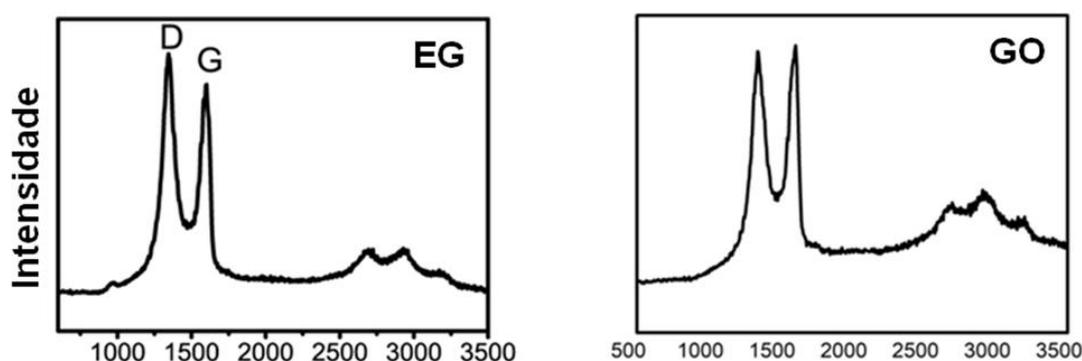


Figura 20. Espectro Raman de EG e GO.

As bandas D e G do material EG e de GO, avaliadas a partir dos espectros Raman, foram ajustadas usando as funções de Lorentzian. A Tabela 4 apresenta os valores médios dos parâmetros de ajuste: frequência (F), FWHM (W) das bandas D e G e intensidade relativa $I(D)/I(G)$. A largura de uma banda Raman pode ser diretamente correlacionada com o grau de desordem em um material [60]. Embora o EG apresente bandas D e G mais amplas do que o GO com defeitos nas bordas de grafeno, causados pela oxidação eletroquímica, este possui uma menor relação ID/IG do que a amostra de GO, que possui defeitos pontuais causados pelos processos de oxidação química e esfoliação ultrassônica contribuindo para o aumento da densidade total de defeitos [61].

Tabela 4. Valores médios dos parâmetros de ajuste das bandas D e G para amostras de EG e comparação com parâmetros de óxido de grafeno (GO).

Amostra	F (D) cm-1	W (D) cm-1	F (G) cm-1	W (G) cm-1	I(D)/I(G)
EG	1344,1	96,4	1584,5	61,3	0,97
GO1	1347,2	130,4	1580,9	89,9	1,05
GO2	1347,6	126,9	1586,3	80,6	1,12

1.12.5. DRX

Os padrões de DRX da amostra de EG em pó indicam a existência do plano de reflexão de Bragg (002) característico do grafite, $2\theta = 26,5^\circ$, Figura 21 [62]. O pico largo pode indicar a existência de algumas camadas de grafeno empilhadas em diferentes orientações, bem como diferentes espaços interplanares entre elas [62]. Castro *et al.* [62] relataram que quanto menor o tamanho médio da folha inicial de grafeno, maior é a largura do pico de DRX. Este resultado reflete que folhas de grafeno menores produzem sequências de empilhamento mais desordenadas.

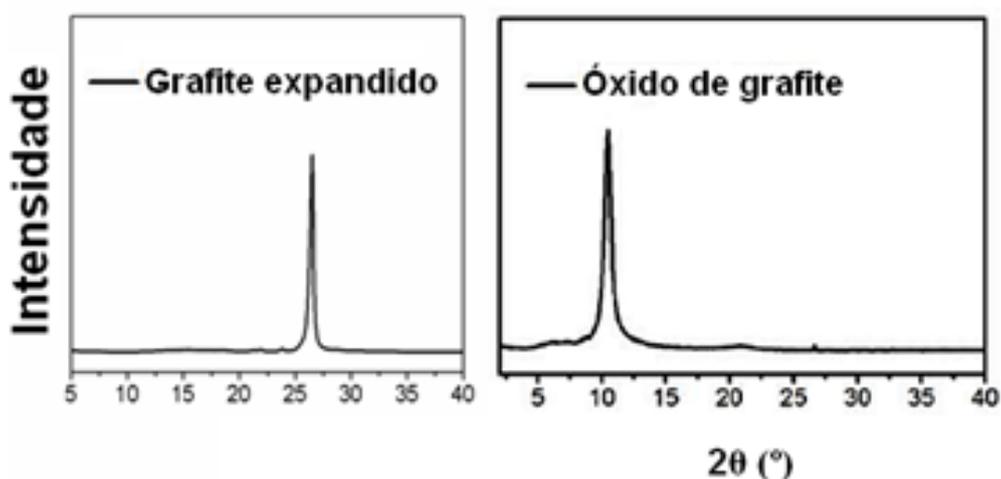


Figura 21. Padrões DRX das amostras de grafite, óxido de grafite e EG [62].

Ao observar o padrão de DRX da membrana de EG na Figura 22-A, o pico do grafite expandido em 26° para a radiação $\text{CuK}\alpha$, esse valor é equivalente a uma distância interplanar em torno de 0,34 nm, valor que pode ser calculado através da equação de Bragg (Equação 1). Já no caso da membrana de GO, Figura 22-B, vemos um pico na região de 11° para a radiação $\text{CuK}\alpha$, já esse valor é equivalente a uma distância

interplanar de 0,82 nm. Essa diferença entre as distâncias interplanares é devido ao processo de oxidação, que no GO é muito mais intenso que na esfoliação eletroquímica. A permeação dos grupos oxigenados entre as folhas de grafeno que ocasionam esse aumento da distância interplanar. No caso da membrana de EG, é possível perceber que existem picos também em ângulos menores, correspondentes a distâncias interplanares maiores. Isso porque durante a esfoliação eletroquímica, ocorre um processo de oxidação, suficiente para oxidar parte do material. Com o DRX pode-se perceber a diferença entre os materiais produzidos, onde se tem o GO, muito mais oxidado e o EG, um material grafitizado, porém, parcialmente oxidado, ou seja, mais heterogêneo.

Equação 1: Lei de Bragg

$$d = \frac{n\lambda}{2\text{sen}\theta}$$

Onde d é o espaçamento interplanar, n é igual a 1 e λ é o comprimento de onda da radiação do Cu é 1,54059 Å.

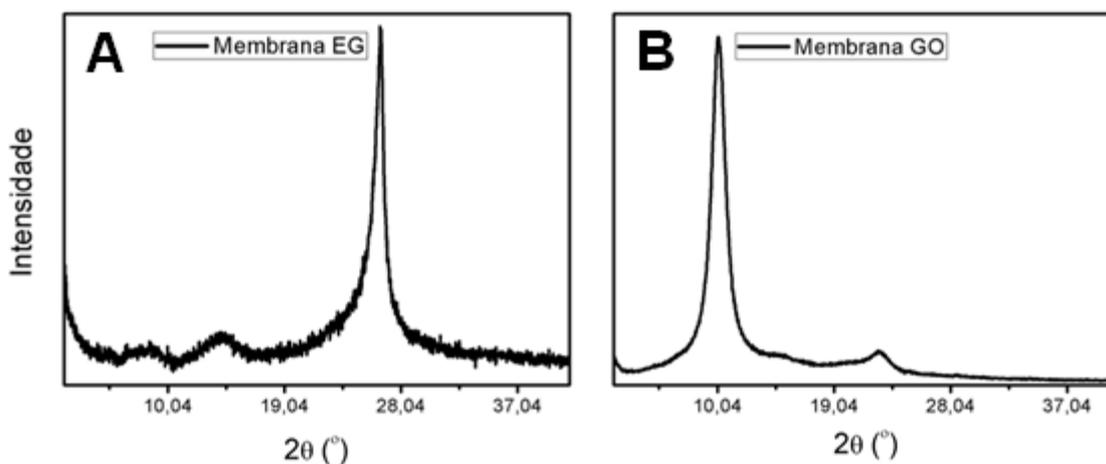


Figura 22. Padrões de DRX das membranas de GO e de EG.

1.12.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As imagens de microscopia das membranas apresentadas na Figura 23 mostram uma estrutura típica de folhas de grafeno amassadas e enrugadas antes da imobilização das enzimas na superfície. Na membrana de GO, (Figura 23 - C) é possível perceber que as folhas se encontram muito mais compactadas, diferentemente da estrutura da membrana de EG, onde a superfície é muito mais heterogênea (Figura 23-A). As Figura 23-B e D, mostram a seção transversal das membranas de grafeno onde se podem observar

algumas camadas de grafeno empilhadas umas sobre as outras, o que é condizente com o resultado encontrado na difração de raios-X. Nessas imagens também é possível perceber que a membrana de EG tem uma espessura maior (148,446 μm) com relação à membrana de GO (23,283 μm), evidenciando novamente uma maior compactação, além da morfologia que é visivelmente diferente nas duas membranas. Acredita-se que essa heterogeneidade da membrana de EG será favorável ao processo de imobilização, facilitando a ligação da enzima com a superfície da membrana.

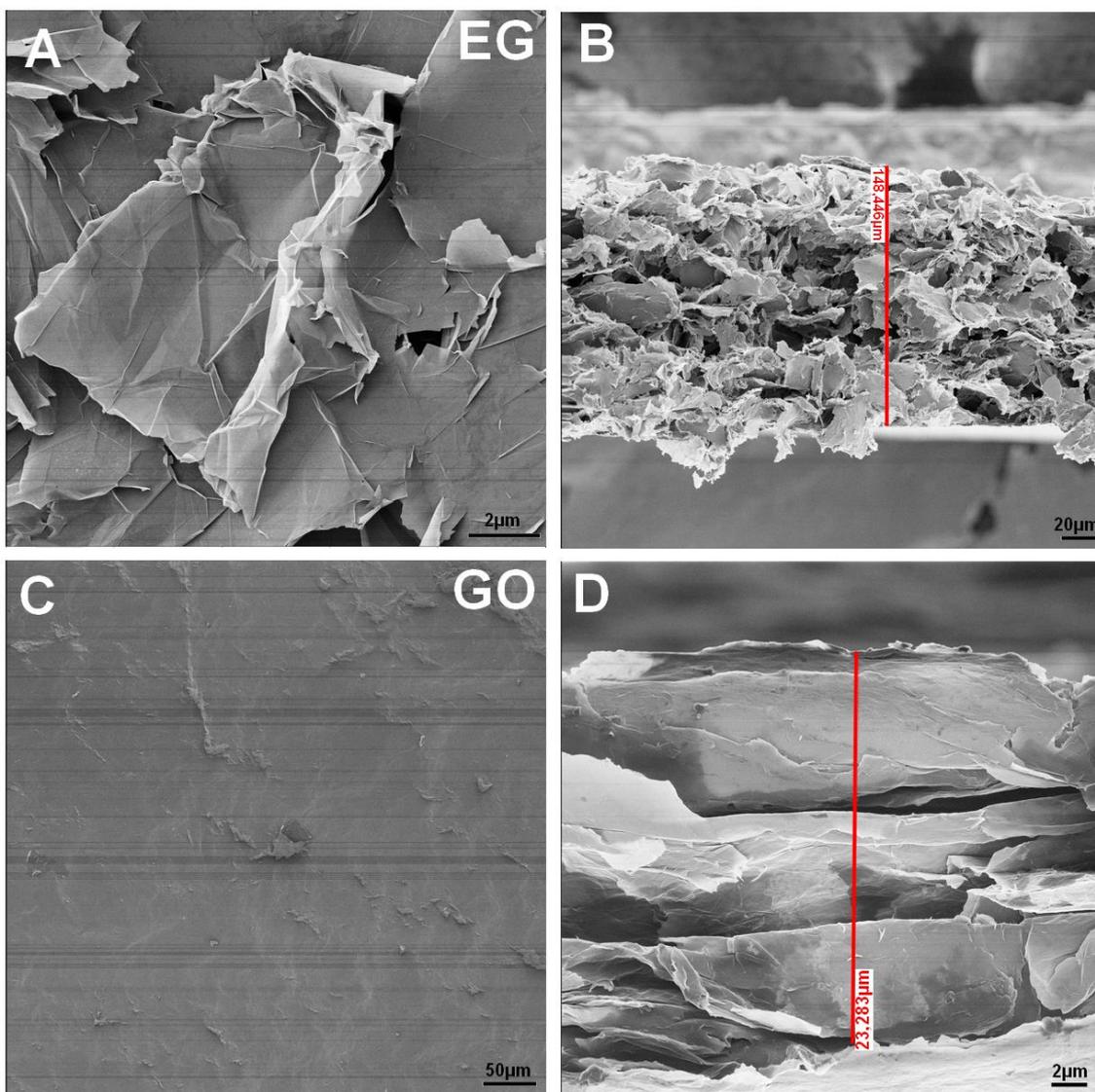


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura, onde: A) membrana de EG, B) seção transversal de uma membrana de EG, C) membrana de GO e D) seção transversal de uma membrana de GO.

1.13. IMOBILIZAÇÃO

A imobilização foi realizada em diferentes concentrações e depois para verificar a presença das enzimas na superfície das membranas, foram feitas medidas de ângulo de contato e microscopia de força atômica. Dessa forma foi possível obter uma análise qualitativa da distribuição das enzimas sobre a superfície das membranas.

1.13.1. ÂNGULO DE CONTATO

As medidas de ângulo de contato foram realizadas também após a imobilização das enzimas e foi possível perceber mudanças significativas, principalmente na membrana de GO (Figura 24E, F e G) que antes da imobilização apresentou ângulo de contato próximo à 20°. Isso se deve à presença das enzimas na superfície. Com a adsorção dessas moléculas, a superfície dessas membranas é modificada, o que torna as membranas menos hidrofílicas. Porém, acredita-se que com o aumento da concentração de enzima utilizada, ocorra uma aglomeração de partículas, levando a uma má distribuição das enzimas pela superfície, o que foi possível observar nas duas membranas estudadas Figura 24-D e H. Na imobilização de enzimas (concentração 10 mg mL⁻¹) sob a membrana de EG, foi possível perceber que a distribuição das partículas foi tão heterogênea que nas duas medidas realizadas na mesma superfície, porém em regiões diferentes, em uma delas, a gota da água se espalhou completamente, não sendo possível medir o ângulo de contato, Figura 24-D, enquanto que na outra, a gota apresentou ângulo de contato com a superfície de 50,3°. O mesmo efeito de heterogeneidade foi observado na membrana de GO, sendo que a maior concentração de enzima teve o menor ângulo medido, 21,7°. Supõe-se que isso ocorre porque com o aumento da concentração, a dispersão fica menos homogênea devido a formação de aglomerados de enzimas.

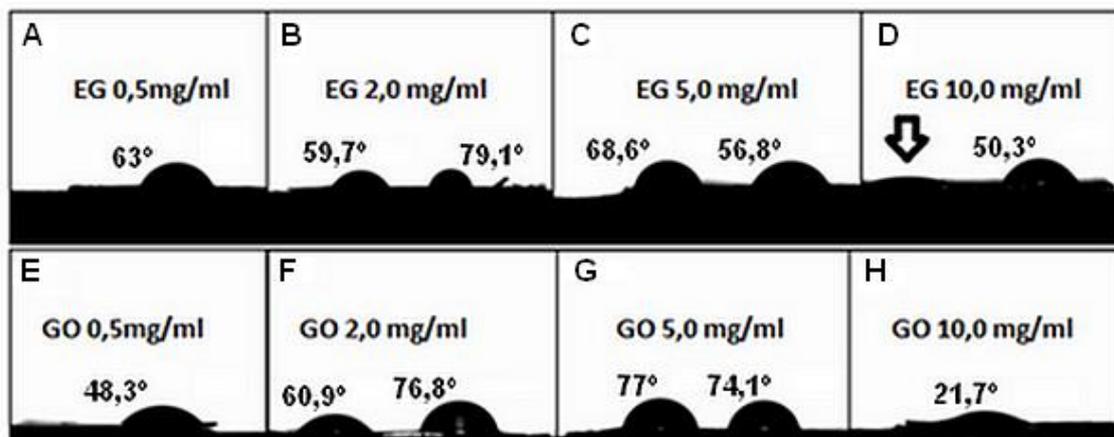


Figura 24. Medidas de ângulo de contato das membranas de EG (A, B, C, D) e GO (E, F, G, H) em diferentes concentrações de enzimas.

1.13.2. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A microscopia de força atômica também foi utilizada para avaliar a presença das enzimas na superfície das membranas depois da imobilização. Através dessa técnica foi possível perceber como as lactases se organizam e se distribuem na superfície de cada tipo de membrana. A Figura 25 mostra a presença das enzimas imobilizadas na membrana de EG nas diferentes concentrações utilizadas. É possível perceber que existe uma maior quantidade de partículas nas membranas onde as enzimas imobilizadas foram solubilizadas nas concentrações de 0,5 mg/ml e 2,0 mg/ml. Acredita-se que com o aumento na concentração das enzimas em solução tampão, estas tendem a aglomerar-se, o que piora a sua distribuição na superfície das membranas.

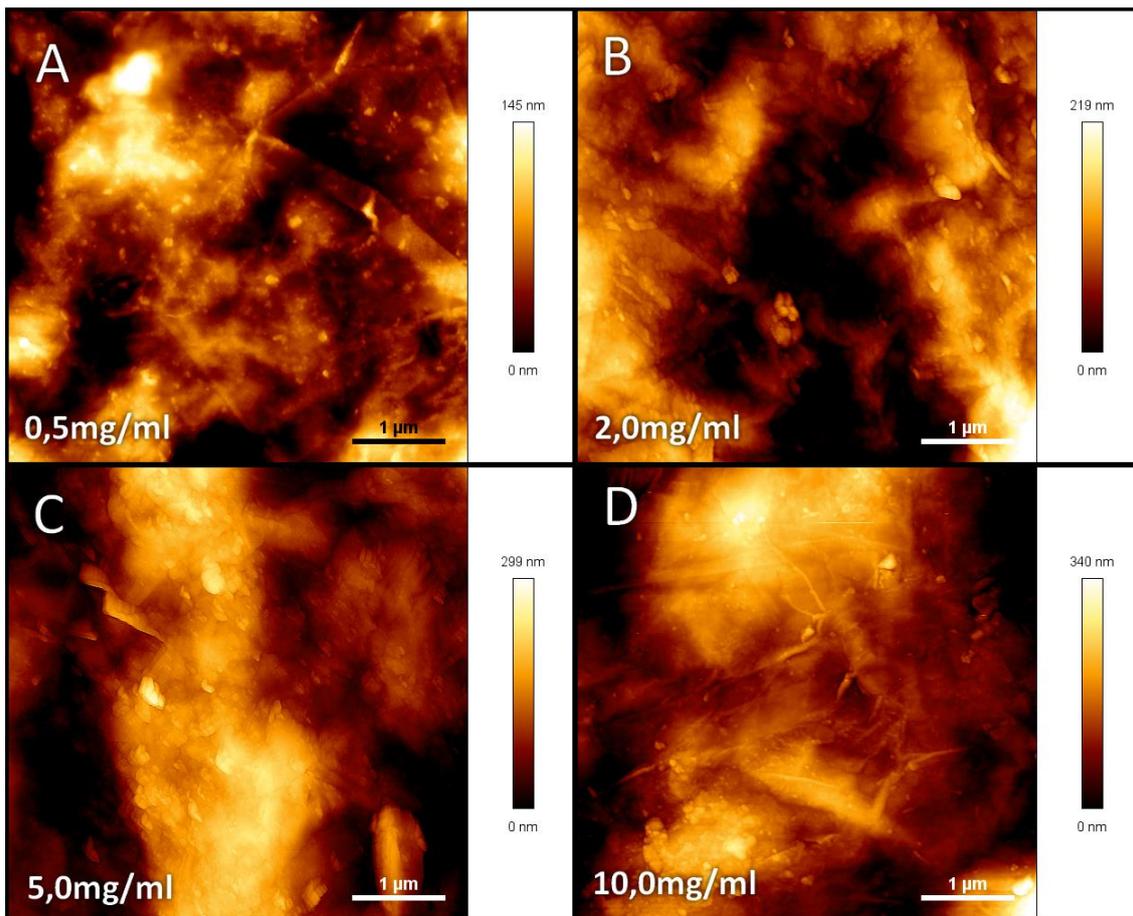


Figura 25. Imagem de AFM da membrana de EG após a imobilização das enzimas em diferentes concentrações.

No caso da membrana de GO, Figura 26, é possível ver presença de partículas na superfície, porém em menor quantidade comparada à membrana de EG. Isso se deve ao fato que a exposição dos sítios hidrofóbicos das enzimas, em meios hidrofílicos, como o tampão PBS, seja desfavorável, o que faz com que as enzimas, nestes meios aquosos, se encontrem com seus sítios hidrofóbicos fechados. No entanto, na presença de um suporte com a superfície hidrofóbica, a enzima abre este sítio ativo para se adsorver no suporte, mecanismo chamado de ativação interfacial da enzima. Como pôde ser visto através das medidas de ângulo de contato, a membrana de EG tem maior hidrofobicidade do que a membrana de GO, dessa forma, é esperado que uma maior quantidade de enzimas adsorvesse na superfície da membrana de EG, como foi possível perceber pelas imagens de AFM, Figura 25.

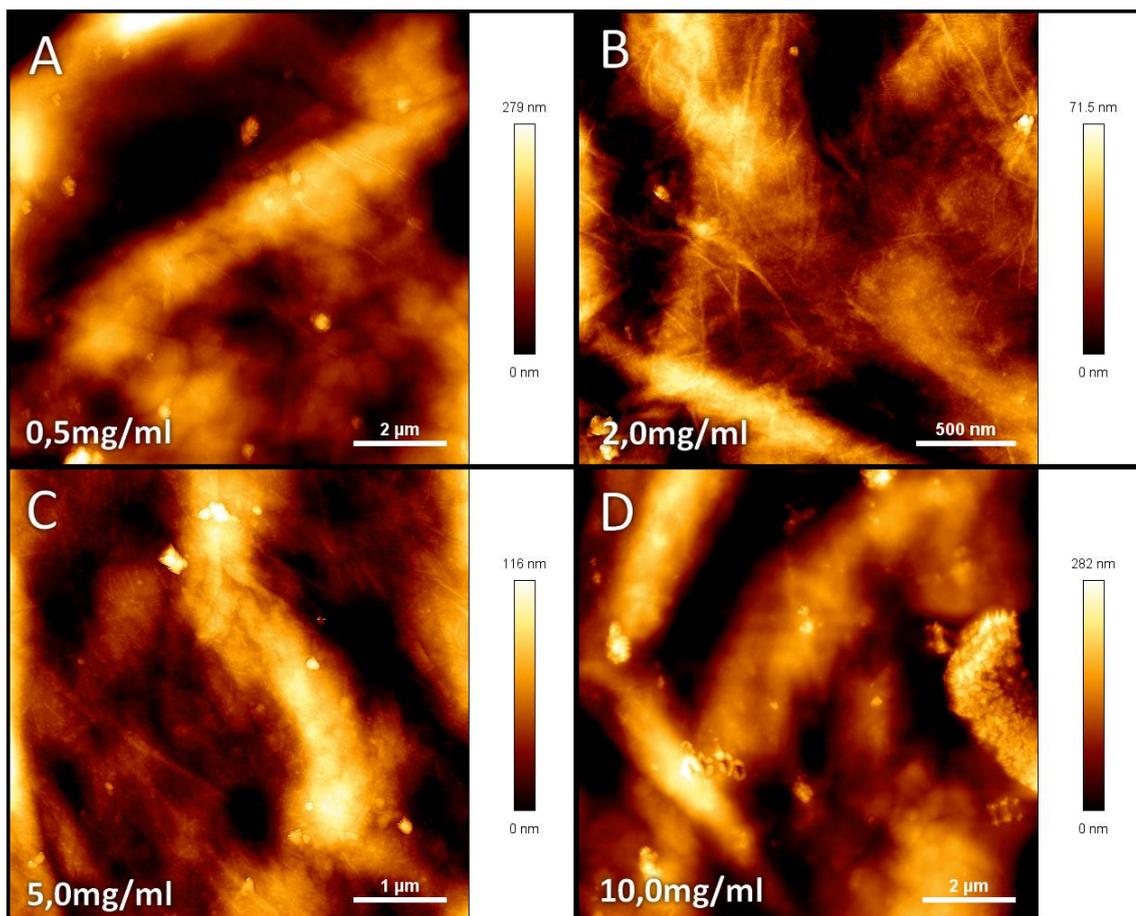


Figura 26. Imagem de AFM da membrana de GO após a imobilização das enzimas em diferentes concentrações.

1.14. ELETROQUÍMICA

Os resultados anteriores (ângulo de contato e imagens de AFM) mostraram que a membrana de EG teve uma maior afinidade com a enzima, resultando em uma melhor imobilização da mesma, portanto, essa foi a membrana escolhida para a realização dos testes catalíticos visando a conversão da lactose em glicose. O acompanhamento desta reação de conversão foi feito por medidas de voltametria cíclica assim como para a avaliação dos efeitos da modificação por plasma na atividade catalítica das membranas. Espera-se que a modificação por plasma venha a ativar a superfície das membranas e possivelmente proporcionar uma melhor imobilização.

Eletrodos de carbono são comumente utilizados para realizar técnicas eletroquímicas, além disso, possuem características como boa condutividade elétrica, estabilidade térmica e robustez, destacando-os como materiais mais adequados para a

formação de eletrodos com superfície modificada [63]. Para a análise da eficiência catalítica é necessário um dispositivo com resposta adequada. A modificação do eletrodo se faz necessária, pois normalmente confere a este as características físico-químicas do agente modificador, como reatividade e seletividade [64]. Como nosso interesse era verificar a eficiência catalítica da membrana, foi feita a modificação do eletrodo com EG, dessa forma, a curva obtida representa a interação da enzima com a membrana.

A β -galactosidase é a enzima responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose. A fim de verificar se houve ação da enzima foi necessário conhecer a posição do pico de lactose e de algum dos produtos da reação, no caso, a glicose. As medidas de voltametria foram realizadas no eletrodo de carbono impresso (EI) e no eletrodo de carbono impresso modificado (EI EG) cujas posições de pico foram identificadas para a lactose e glicose e estão representadas na tabela abaixo:

Tabela 5: Posição de pico para as moléculas de lactose e glicose.

Posição do pico (V)	Lactose	Glicose
EI	-0,465	-0,371
EIG	-0,458	-0,373

Conhecendo a posição do pico da lactose e da glicose é possível rastrear a reação catalítica em diferentes condições. Para todos os voltamogramas apresentados foram mantidas as mesmas condições iniciais em todas as amostras, tanto a lactose quanto a glicose com a mesma concentração de 1mmol L^{-1} . Para entender a imobilização vai ser satisfatória, é necessário verificar a atuação da enzima quando esta se encontra livre em solução. O pico da lactose se encontra em $-0,465\text{ V}$ no eletrodo impresso e em $-0,458$ no eletrodo impresso modificado. Como é possível observar na Figura 27-A, quando a enzima é colocada livre na solução, o pico da lactose diminuiu, o que indica a decréscimo da concentração de lactose na solução e, além disso, houve um pequeno deslocamento em direção ao potencial da glicose, o que indica que possivelmente a hidrólise está acontecendo. A solução foi guardada e uma nova medida foi realizada após 48h. Nessa nova voltametria o pico presente se encontra em $-0,361\text{ V}$, referente ao potencial da glicose. Então, com a ausência do pico da lactose e o surgimento do pico da glicose, conclui-se que após as 48h toda a lactose havia sido hidrolisada. Já para o eletrodo

modificado, quando a enzima é colocada livre em solução, instantaneamente já é possível perceber um pico em $-0,361\text{ V}$, referente à presença da glicose em solução e nenhum pico próximo de $-0,45\text{ V}$, o que evidencia que a catálise ocorreu imediatamente, não necessitando 48h para a conversão total. Isso se deve ao fato de que mesmo livre em solução, a enzima interage com a superfície dos eletrodos, e é possível que exista uma melhor interação com o grafeno presente no eletrodo modificado, e essa ligação mesmo que fraca, estabilizou a enzima já que em meios biológicos a mesma se apresenta ligada em estruturas celulares e isso possibilitou a melhora na catálise no sistema EGI.

Para simular um sistema real equivalente à membrana, foi necessário imobilizar a enzima no EGI. Para efeito de comparação, essa imobilização também foi feita no ECI e verificar se a imobilização em grafeno é suficientemente forte para estabilizar a enzima e melhorar a atividade catalítica, podendo-se assim avaliar se o tipo de suporte escolhido também é importante no processo, atuando como um co-catalisador. Por fim, os dois últimos voltamogramas mostram a enzima imobilizada nos dois tipos de eletrodos. No ECI, não foi possível verificar a presença de nenhum pico, como a imobilização foi feita por adsorção, a enzima se liga ao suporte da forma que seja mais energeticamente favorável. Dessa forma, não é possível selecionar qual sítio da enzima vai se ligar ao suporte. É possível que o sítio ativo da enzima, responsável pela hidrólise, tenha sido utilizado para a ligação da mesma com a superfície do ECI, sendo assim, a mesma perderia o seu poder catalítico sendo totalmente inativada. Já no sistema EGI é possível perceber que a conversão acontece instantaneamente, com o surgimento do pico em $0,373\text{ V}$, pico que como foi mencionado se refere ao potencial da glicose. Todos esses resultados mostram que o EG tem potencial para ser um excelente suporte para imobilização de enzimas.

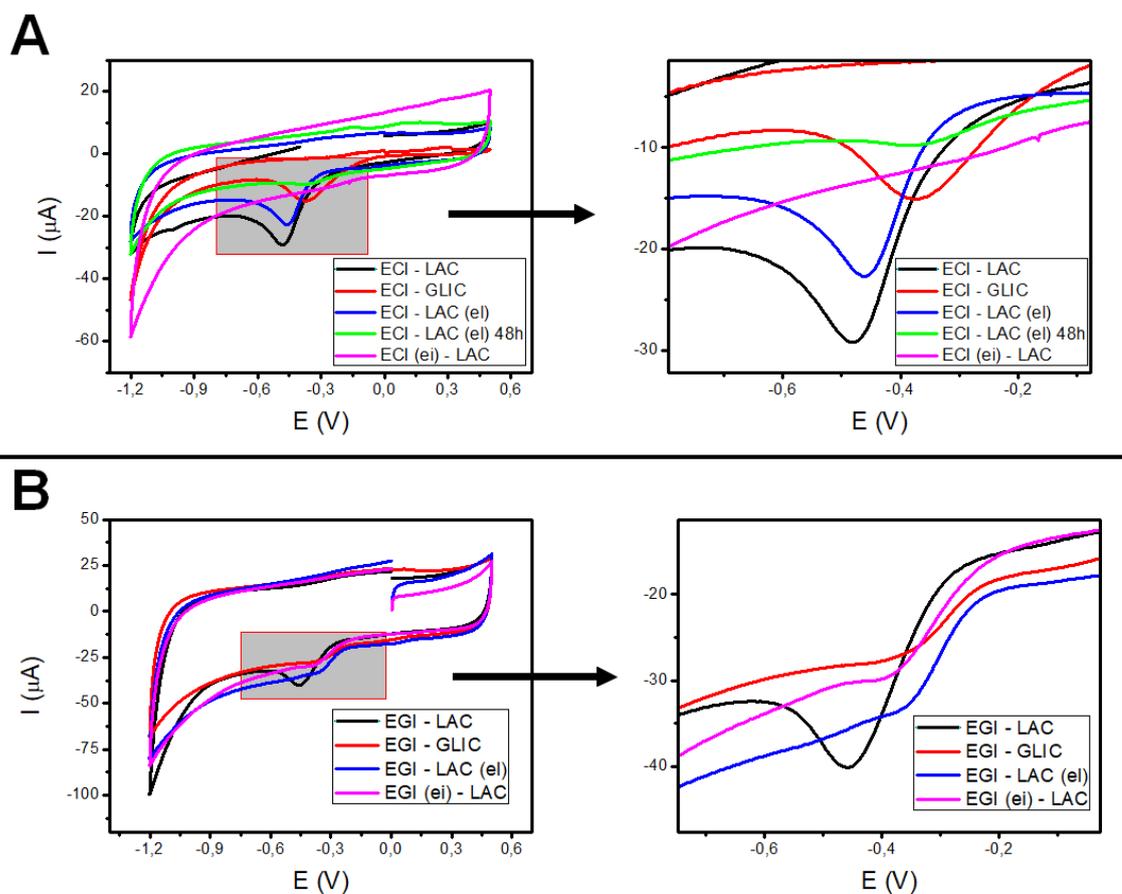


Figura 27. Voltamogramas do eletrodo impresso de carbono (A) com as soluções de lactose pura (preto), glicose pura (vermelho), lactose com enzima livre (azul), lactose com enzima livre após 48h (verde) e lactose com imobilizada (magenta). E o mesmo para o eletrodo impresso modificado com EG (B) com as soluções de lactose pura (preto), glicose pura (vermelho), lactose com enzima livre (azul) e lactose com imobilizada (magenta).

Tabela 6: Nomenclatura dos eletrodos.

Nomenclatura Eletrodo de carbono impresso	Nomenclatura Eletrodo de grafeno	Solução	Enzima
ECI – LAC	EGI - LAC	Lactose	Não
ECI – GLIC	EGI - GLIC	Glicose	Não
ECI-LAC(el)	EGI-LAC(el)	Lactose	Livre
ECI(ei) – LAC	EGI(ei) - LAC	Lactose	Imobilizada

Onde ECI corresponde ao eletrodo de carbono impresso, EGI corresponde a eletrodo de carbono impresso modificado com o EG, LAC corresponde à lactose, GLIC corresponde à glicose, (el) corresponde à enzima livre em solução e (ei) corresponde à enzima imobilizada.

1.15. PLASMA

A tecnologia de plasma é um processo utilizado com o objetivo de modificar a superfície de materiais. A modificação da superfície é um tratamento não reativo quando o gás de argônio é usado. Efeitos do tratamento por plasma de argônio em nanotubos de carbono foi investigado por AHN et. al. O plasma produziu um eficiente processo de corrosão e limpeza (*etching*) dos filmes de nanotubos e causou mudanças estruturais que levou ao aumento da capacidade de emissão de campo. Além disso, o plasma de Ar também foi utilizado para ativação da superfície de nanotubos de carbono, permitindo a subsequente funcionalização por outras moléculas (*grafting*) [31,65].

1.15.1. PLASMA DE ARGÔNIO EM MEMBRANA

Nas membranas, o tratamento por plasma foi realizado durante 1, 3 e 5 min. O bombardeamento da superfície das membranas pelas espécies reativas do plasma de Ar causou uma ablação (remoção de material superficial) que induziu na formação de uma superfície mais rugosa como é possível observar através das imagens de AFM (Figura 28). Quanto maior o tempo de tratamento, maior a rugosidade da superfície. No caso da membrana, em tempos de tratamento acima de 1 min., a ablação é tão grande que destrói a estrutura do grafeno e inviabiliza a utilização da mesma. Além disso, o plasma de Ar também ativou a superfície da membrana, que foi colocada em solução de enzima imediatamente após o tratamento, a fim de verificar se essa ativação melhoraria a adesão das enzimas em sua superfície. A Figura 28-A, mostra que a estrutura do grafeno não foi destruída pelo tratamento por plasma durante 1 min. É possível perceber nesta imagem também a presença das partículas de enzima na superfície, em maior quantidade e melhor distribuição em comparação com as membranas que não foram tratadas por plasma (Figura 25Figura 25).

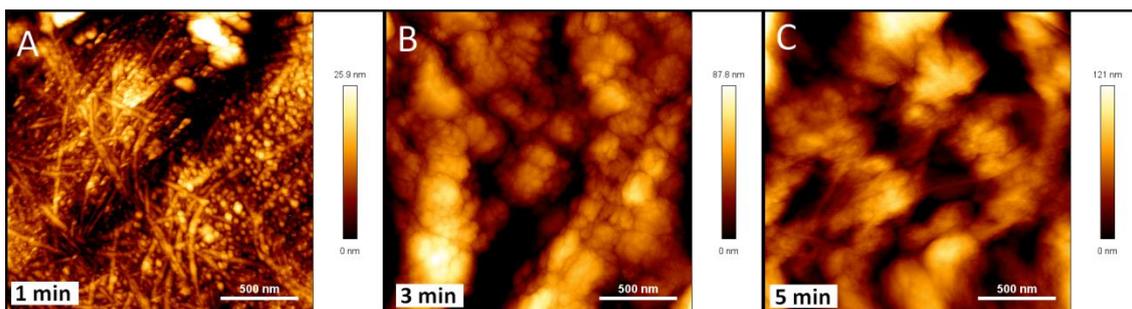


Figura 28. Imagem de AFM da membrana de EG tratada por plasma de argônio após imobilização de enzima. Tratamento de 1 min. (A), 3 min. (B) e 5 min. (C).

1.15.2. PLASMA DE AR SINTÉTICO

Como foi possível perceber na Figura 28, o tratamento utilizando o plasma de argônio acabou afetando fortemente a estrutura do EG, inviabilizando a utilização da técnica. Porém, a presença de partículas de enzima imobilizadas na superfície foi substancialmente maior que na membrana sem nenhum tratamento. Como forma de tentar evitar esse dano e ainda conseguir aproveitar a vantagem de se utilizar a tecnologia de plasma, uma forma de não danificar a estrutura morfológica do grafeno foi planejada para modificar sua superfície melhorando a imobilização da enzima. Para isso o tratamento foi realizado no grafeno antes de produzir as membranas. Um jato de plasma de ar foi aplicado à solução que posteriormente seria filtrada para a formação da membrana.

A fim de verificar a morfologia das membranas após o tratamento por plasma de ar sintético, foi realizada a microscopia de força atômica para fazer um comparativo com as membranas sem tratamento algum. Como é possível perceber pela Figura 29-B, mesmo após o tratamento com plasma ainda é possível perceber a estrutura do grafeno, bem caracterizada pelas rugas correspondentes as folhas amassadas e empacotadas umas sobre as outras.

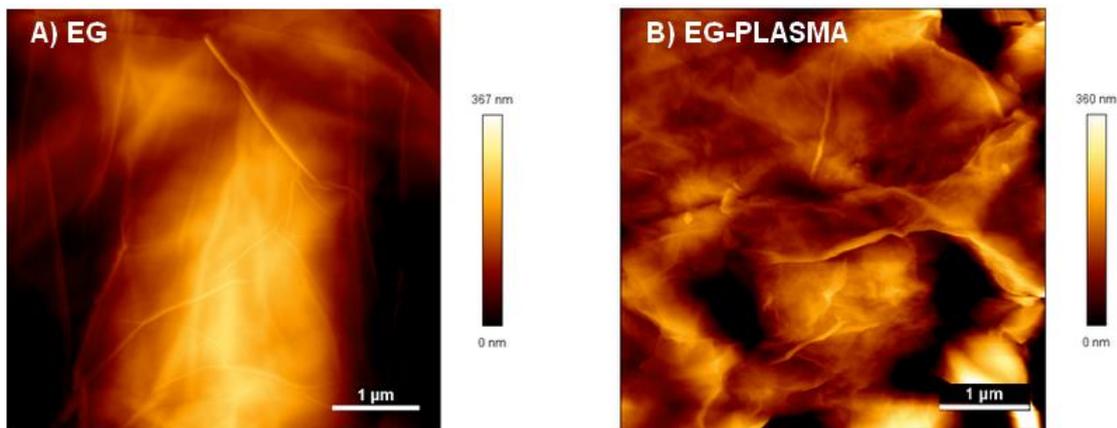


Figura 29. A) Imagem de AFM da membrana de EG e em B) Imagem de AFM da membrana de EG após o tratamento por jato de plasma em solução.

A Figura 30 mostra o espectro Raman do EG em comparação com espectro do EG após o tratamento por jato de plasma. Como já foi mencionado no item 1.12.4, a existência de desordem ou defeitos na rede é revelada pela presença da banda D, posicionada próxima a 1350 cm^{-1} . Isso significa que o tratamento acabou contribuindo para a diminuição dos defeitos na estrutura do grafite. Como foi descrito por PUMERA, a presença de defeitos na estrutura do grafeno é vantajosa dependendo de sua aplicação. A transferência de elétrons entre o grafeno e a molécula, no caso, a enzima imobilizada, é necessária para oxidação/redução da referida molécula e isso ocorre nas extremidades do grafeno e em defeitos do plano basal. Então mesmo que esse tipo de tratamento não mude as características morfológicas do grafeno, ainda assim ocorre uma mudança na sua estrutura. É bem possível também que tenha havido uma mudança nos grupos funcionais presentes em sua superfície já que o plasma acaba formando radicais livres que podem interagir inclusive com o DMF, solvente utilizado na solução, que recebeu o tratamento.

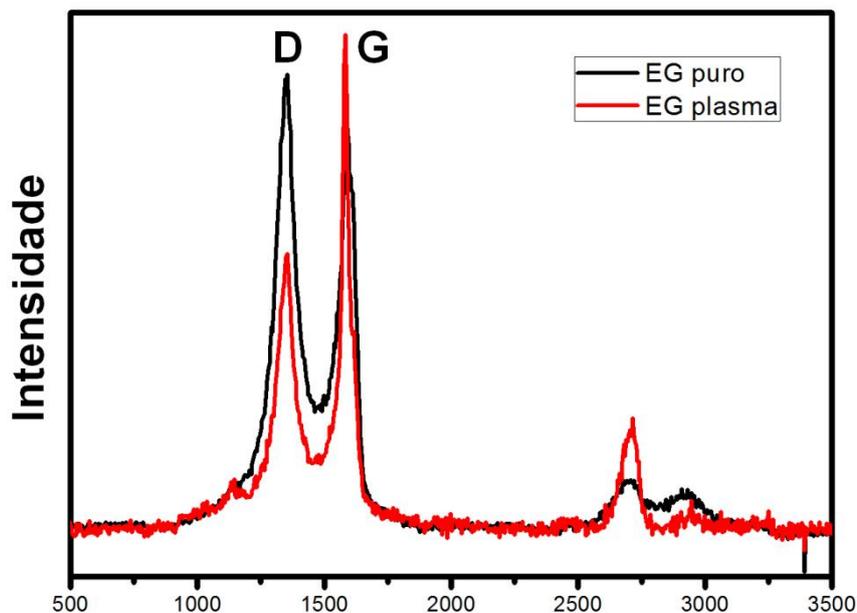


Figura 30. Espectro Raman de EG em comparação com o EG tratado com jato de plasma.

SHAO et al [34], também descreveram que os sítios ativos da maioria das enzimas redox, estão localizados profundamente em uma cavidade hidrofóbica das moléculas, o que dificulta a interação com qualquer substrato. Então a realização de eletroquímica direta de enzima é muito difícil, é exatamente por isso que se faz necessária a utilização de um material que aumente a transferência direta de elétrons entre enzimas e eletrodos, como o grafeno. Já que o tratamento por plasma diminui a quantidade de defeitos da estrutura, era esperado que esse novo sistema fosse prejudicado.

Tabela 7: Nomenclatura do eletrodo de EG modificado por plasma.

Nomenclatura Eletrodo de EG	Solução	Enzima
EGIP – LAC	Lactose	Não
EGIP – GLIC	Glicose	Não
EGIP-LAC(el)	Lactose	Livre
EGIP(ei) – LAC	Lactose	Imobilizada

A Figura 31 mostra um voltamograma feito utilizando o eletrodo impresso com o novo EG que foi tratado pelo jato de plasma. Ao observar a figura é possível perceber que o sistema foi sim afetado pelo tratamento de forma negativa. A perda dos defeitos existentes no EG resultou na diminuição da seletividade do nosso eletrodo. É possível afirmar isso devido ao fato de que todas as medidas apresentaram picos na mesma faixa de potencial. Até mesmo a glicose e a lactose, que deveriam apresentar potenciais diferentes. Dessa forma, fica claro que tentativa de melhorar a imobilização das enzimas e aumentar sua atividade e seletividade com o tratamento de plasma não é possível, o material de grafeno sem tratamento tem melhores resultados. A Tabela 8 mostra o potencial e a altura de cada pico mostrado na Figura 31 assim como os do eletrodo de EG sem o tratamento.

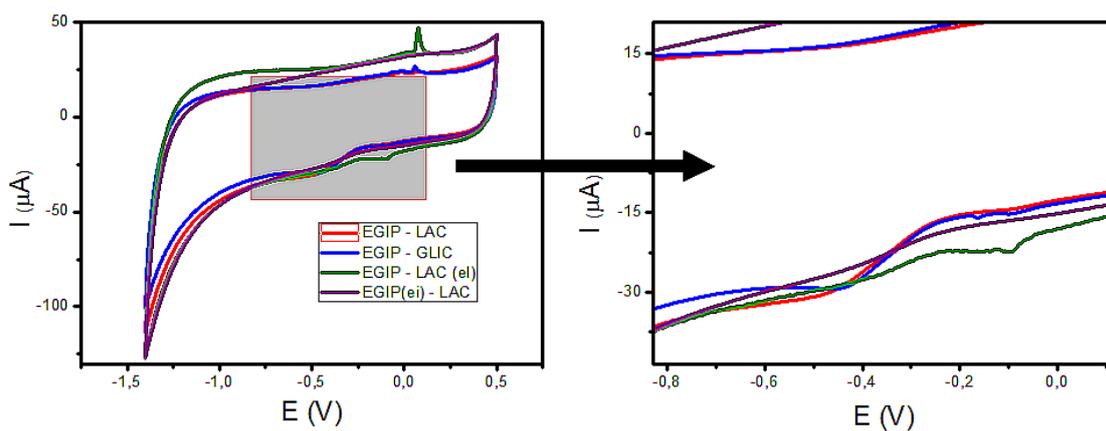


Figura 31. Voltamograma do eletrodo impresso modificado por EG tratado por jato de plasma.

Tabela 8: Posição de pico das amostras de EG e EG-Plasma na voltametria cíclica.

Curva	Posição do pico (V)	Altura do pico (eV)	Largura a meia altura (eV)
EGI – LAC	-0,451	$-1,661 \times 10^{-5}$	0,1622
EGI – GLIC	-0,373	$-4,158 \times 10^{-6}$	0,2054
EGI – LAC (el)	-0,361	$-6,807 \times 10^{-6}$	0,2573
EGI (ei) – LAC	-0,373	$-5,161 \times 10^{-6}$	0,1447
EGIP – LAC	-0,457	$4,490 \times 10^{-6}$	0,2327
EGIP – GLIC	-0,44	$6,426 \times 10^{-6}$	0,2231
EGIP – LAC(el)	Indetectável	Indetectável	Indetectável
EGIP(ei) – LAC	-0,5069	$2,052 \times 10^{-6}$	0,2038

CONCLUSÃO

Foi desenvolvido nesse trabalho a síntese e caracterização de membranas de materiais de grafeno produzidos por duas rotas distintas. As membranas foram utilizadas para imobilização de enzimas β -galactosidases a fim de verificar se o método de imobilização estabilizaria a enzima e aumentaria a eficiência catalítica.

A imobilização da enzima β -galactosidase foi efetuada em duas membranas com propriedades químicas de superfície distintas, EG (mais hidrofóbica) e GO (mais hidrofílica) e a eficiência da imobilização mostrou ser dependente da estrutura química da membrana e da concentração de enzima na solução. A enzima estudada foi melhor imobilizada na membrana de EG do que na de GO. Isso ocorreu, pois os sítios ativos da enzima, hidrofóbicos, se encontraram mais disponíveis para interagir com o suporte no caso de uma membrana com característica mais hidrofóbica tal qual a membrana de EG, enquanto que estes sítios se encontravam fechados quando em contato com a membrana de GO, considerando que a solução de dispersão da enzima utilizada, tampão fosfato, é tipicamente hidrofílica. Além disso, observou-se que concentrações elevadas de enzima em solução são desfavoráveis por promover a aglomeração das mesmas e, conseqüentemente, sua má distribuição pelo substrato.

De tal maneira, a superfície de contato e a concentração da enzima em solução constituem fatores chave para a eficiência da imobilização e posterior atividade catalítica em reações de conversão da lactose em derivados da glicose.

Apesar de a tecnologia de plasma ser uma ferramenta eficiente utilizada para a modificação de superfícies, quando o plasma foi aplicado, corroborou para a ativação da superfície das membranas o que contribuiu para o aumento da imobilização das enzimas, porém, para materiais como o óxido de grafeno, que tem uma estrutura bem definida, essa técnica agride fortemente a morfologia do material, o que inviabilizou a utilização da mesma para ativação da superfície. Como forma de minimizar os danos à superfície, foi utilizado um sistema de jato de plasma para tratar o óxido de grafeno em solução. O uso do jato de plasma se mostrou uma forma eficiente de tratar líquidos e possibilitou a realização do tratamento na solução que foi usada na produção das membranas. Nesse caso, utilizar a tecnologia de plasma contribuiu para a diminuição dos defeitos da

estrutura do óxido de grafeno, como foi possível perceber pela espectroscopia Raman, atuando semelhantemente aos tratamentos feitos para redução do óxido de grafeno a óxido de grafeno reduzido. Esse resultado não foi eficiente para esse trabalho, já que os defeitos são necessários para auxiliar na interação com as enzimas e a detecção eletroquímica, mas pode ser um material interessante para outras aplicações, além de abrir a possibilidade para outras formas de redução do óxido de grafeno.

Por fim, como método de imobilização, o trabalho demonstrou que o óxido de grafeno produzido por eletroquímica foi o melhor substrato para imobilização. Os ensaios eletroquímicos mostraram uma melhora na atividade da β -Galactosidase em comparação com a utilização da enzima livre em solução e a enzima imobilizada em eletrodo de carbono vítreo que é o tipo mais comumente utilizado. A presença dos grupos funcionais do EG e seus defeitos no plano basal e nas bordas auxiliam a transferência de elétrons que permite acessar os sítios redox das enzimas, auxiliando na detecção dos produtos pelos eletrodos. Além disso, o método utilizado foi por adsorção ao substrato, o que permitiu que a enzima se imobilizasse da forma que fosse mais energeticamente favorável à mesma, estabilizando sua estrutura e auxiliando em sua atividade.

TRABALHOS FUTUROS

- Fazer uma análise quantitativa da conversão da lactose em glicose, utilizando uma curva de calibração por eletroquímica.
- Utilizar outras técnicas como espectroscopia UV-Vis para a análise da concentração de produto/reagente nas soluções enzimáticas.
- Verificar outros métodos de imobilização de enzimas como o método de ligação covalente.
- Verificar outras formas de tratamento da membrana para um melhor acoplamento das enzimas na superfície.
- Testar a membrana para imobilizar outros tipos de enzimas e verificar a sua eficiência.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] JIN, L., YANG, K., YAO, K., ZHANG, S., TAO, H., LEE, S.-T., LIU, Z. and PENG, R., "Functionalized Graphene Oxide in Enzyme Engineering: A Selective Modulator for Enzyme Activity and Thermostability", **ACS Nano** v.6, n. 6, pp. 4864-4875, Jun. 2012.
- [2] FERNANDEZ-LAFUENTE, R., "Special Issue: Enzyme Immobilization 2016", **Molecules** (Basel, Switzerland) v.22, n. 4, pp. 601, 2016.
- [3] FAN, J., LUO, J. and WAN, Y., "Membrane chromatography for fast enzyme purification, immobilization and catalysis: A renewable biocatalytic membrane", **Journal of Membrane Science** v.538, n. pp. 68-76 Oct. 2017.
- [4] LOH, K. P., BAO, Q., EDA, G. and CHHOWALLA, M., "Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications", **Nature Chemistry** v.2, n. pp. 1015 Nov. 2010.
- [5] ZHANG, J., ZHANG, F., YANG, H., HUANG, X., LIU, H., ZHANG, J. and GUO, S., "Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization", **Langmuir** v.26, n. 9, pp. 6083-6085, May. 2010.
- [6] TARLEY, C. R. T. and KUBOTA, L. T., "Molecularly-imprinted solid phase extraction of catechol from aqueous effluents for its selective determination by differential pulse voltammetry", **Analytica Chimica Acta** v.548, n. 1, pp. 11-19, Aug. 2005.
- [7] GEIM, A. K. and NOVOSELOV, K. S., "The rise of graphene", **Nature Materials** v.6, pp. 183, Mar. 2007
- [8] SELLERGRÉN, B., "Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials", **TrAC Trends in Analytical Chemistry** v.16, n. 6, pp. 310-320, Jun.1997.
- [9] Ray, S. C., Ray, S. C., "Application and Uses of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide" **Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials**, chapter 2, Oxford, William Andrew Publishing, 2015.
- [10] BRODIE, B., "Sur le poids atomique du graphite", **Ann. Chim. Phys** v.59, n. 466, pp. e472, 1860.

- [11] STAUDENMAIER, L., "Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure", **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft** v.31, n. 2, pp. 1481-1487, May.1898.
- [12] HUMMERS, W. S. and OFFEMAN, R. E., "Preparation of Graphitic Oxide", **Journal of the American Chemical Society** v.80, n. 6, pp. 1339-1339, Mar. 1958.
- [13] ZHU, Y., MURALI, S., CAI, W., LI, X., SUK, J. W., POTTS, J. R. and RUOFF, R. S., "Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications", **Advanced Materials** v.22, n. 35, pp. 3906-3924, Oct. 2010.
- [14] PARK, S. and RUOFF, R. S., "Chemical methods for the production of graphenes", **Nature Nanotechnology** v.4, pp. 217, Mar. 2009.
- [15] HSU, H.-C., SHOWN, I., WEI, H.-Y., CHANG, Y.-C., DU, H.-Y., LIN, Y.-G., TSENG, C.-A., WANG, C.-H., CHEN, L.-C., LIN, Y.-C. and CHEN, K.-H., "Graphene oxide as a promising photocatalyst for CO₂ to methanol conversion", **Nanoscale** v.5, n. 1, pp. 262-268, Jan. 2013.
- [16] CHIU, N. F., HUANG, T. Y. and LAI, H.-C., "Graphene Oxide Based Surface Plasmon Resonance Biosensors", **Advances in Graphene Science**, 2013
- [17] COELHO, M., COELHO, M. A. Z., SALGADO, A. M., RIBEIRO, B. D., **Tecnologia Enzimatica**, 1^a ed., EPUB: Rio de Janeiro, 2008
- [18] KELLER, M. A., PIEDRAFITA, G. and RALSER, M., "The widespread role of non-enzymatic reactions in cellular metabolism", **Current Opinion in Biotechnology** v.34, n. pp. 153-161, Aug. 2015.
- [19] KRAJEWSKA, B., "Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review", **Enzyme and Microbial Technology** v.35, n. 2, pp. 126-139, Aug. 2004.
- [20] GULRAJANI, M. and GUPTA, D., "Emerging techniques for functional finishing of textiles", **Indian Journal of Fibre and Textile** v.36, Dec. 2011.
- [21] ZHOU, Z., INAYAT, A., SCHWIEGER, W. and HARTMANN, M., "Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas", **Microporous and Mesoporous Materials** v.154, n. pp. 133-141, May. 2012.

- [22] NGUYEN, H. H. and KIM, M., "An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization", **Applied Science and Convergence Technology** v.26, n. 6, pp. 157-163, Nov. 2017.
- [23] MOHAMAD, N. R., MARZUKI, N. H. C., BUANG, N. A., HUYOP, F. and WAHAB, R. A., "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes", **Biotechnology, biotechnological equipment** v.29, n. 2, pp. 205-220, Mar. 2015.
- [24] SOUZA, L., VERÍSSIMO, L. A., PESSELA, B., MATOS SANTORO, M., R. RESENDE, R. and MENDES, A., "Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte", p. 529 -568. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.
- [25] SHELDON, R. A., "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance", **Advanced Synthesis & Catalysis** v.349, n. 8- 9, pp. 1289-1307, 2007.
- [26] QUIOCHO, F. A. and RICHARDS, F. M., "Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.52, n. 3, pp. 833-839, Oct. 1964.
- [27] GODOY, A. S. D., 2016, Estudos estruturais e funcionais das enzimas beta-galactosidases de bactérias, Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-04012017-145940/>>
- [28] BIONINJA, Lactose Intolerance, Disponível em: <<https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/25-enzymes/lactose-intolerance.html>> 02 apr. 2019, 15:42
- [29] HUSAIN, Q., "Beta galactosidases and their potential applications: a review", **Crit Rev Biotechnol** v.30, n. 1, pp. 41-62, Mar. 2010.
- [30] VIEIRA, D. C. "Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação." Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, SP – Brasil, 2009.

- [31] XIE, X.-L., MAI, Y.-W. and ZHOU, X.-P., "Dispersion and alignment of carbon nanotubes in polymer matrix: A review", **Materials Science and Engineering: R: Reports** v.49, n. 4, pp. 89-112, May. 2005.
- [32] KUILA, T., BOSE, S., KHANRA, P., MISHRA, A. K., KIM, N. H. and LEE, J. H., "Recent advances in graphene-based biosensors", **Biosensors and Bioelectronics** v.26, n. 12, pp. 4637-4648, Aug. 2011.
- [33] ALWARAPPAN, S., ERDEM, A., LIU, C. and LI, C.-Z., "Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications", **The Journal of Physical Chemistry C** v.113, n. 20, pp. 8853-8857, May. 2009.
- [34] SHAO, Y., WANG, J., WU, H., LIU, J., AKSAY, I. A. and LIN, Y., "Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review", **Electroanalysis** v.22, n. 10, pp. 1027-1036, May. 2010.
- [35] JUSTINO, C. I. L., GOMES, A. R., FREITAS, A. C., DUARTE, A. C. and ROCHA-SANTOS, T. A. P., "Graphene based sensors and biosensors", **TrAC Trends in Analytical Chemistry** v.91, n. pp. 53-66, Jun. 2017.
- [36] DREYER, D. R., PARK, S., BIELAWSKI, C. W. and RUOFF, R. S., "The chemistry of graphene oxide", **Chemical Society Reviews** v.39, n. 1, pp. 228-240, 2010.
- [37] PUMERA, M., "Graphene in biosensing", **Materials Today** v.14, n. 7, pp. 308-315, Jul. 2011.
- [38] PUTZBACH, W. and RONKAINEN, J. N., "Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review", **Sensors** v.13, n. 4, 2013.
- [39] DZIĄBOWSKA, K., CZACZYK, E. and NIDZWORSKI, D., "Application of Electrochemical Methods in Biosensing Technologies", May. 2018.
- [40] Dey, A., Chronos, A., Braithwaite, N. St. J., Gandhiraman, Ram P., Krishnamurthy, S. "Plasma engineering of graphene", **American Institute of Physics** v.3, n.2, pp. 021301, Jun. 2016.
- [41] Kumar, P., "Interaction of plasma with Graphene Oxide: A review", **International Journal of Engineering Trends and Technology** v.49, pp. 128-136, Jul. 2017.

- [42] Wang, Q., Li, J., Song, Y., Wang, X., “Facile Synthesis of High-Quality Plasma-Reduced Graphene Oxide with Ultrahigh 4,4'-Dichlorobiphenyl Adsorption Capacity”, **Chem. Asian J.** v.8, n.1, pp. 225-231, Jan. 2013.
- [43] Neustroev, E. P., “Plasma Treatment of Graphene Oxide”, **Graphene Oxide - Applications and Opportunities**, chapter 2, IntechOpen, 2018.
- [44] PARVEZ, K., WU, Z.-S., LI, R., LIU, X., GRAF, R., FENG, X. and MÜLLEN, K., "Exfoliation of Graphite into Graphene in Aqueous Solutions of Inorganic Salts", **Journal of the American Chemical Society** v.136, n. 16, pp. 6083-6091, Apr. 2014.
- [45] WU, W., ZHANG, C. and HOU, S., "Electrochemical exfoliation of graphene and graphene-analogous 2D nanosheets", **Journal of Materials Science** v.52, n. 18, pp. 10649-10660, Sep. 2017.
- [46] CRISTANCHO, J. P. F., 2017, *Elaboração e caracterização de blendas biodegradáveis a base amido de milho com polihidroxibutirato (PHB)* Dissertação* de M.Sc., COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil Disponível em: <<http://www.metalmat.ufrj.br/index.php/br/pesquisa/producao-academica/-7/2017/102--93/file>> 04 mai. 2019, 13:47
- [47] Rafiee, J., Rafiee, M. A., Yu, Z., Koratkar, N., “Superhydrophobic to Superhydrophilic Wetting Control in Graphene Films” **Advanced Materials**, v.22, n.19, pp. 2151-2154, May. 2010.
- [48] Sikora, A., Woszczyna, M., Friedemann, M., Ahlers, F. J., Kalbac, M. “AFM diagnostics of graphene-based quantum Hall devices”, **Micron** v.43, n.2, pp. 479-486, Feb. 2012.
- [49] Jorio, A., Dresselhaus, M. S., Saito, R., Dresselhaus, G. “Raman Spectroscopy Applied to sp² Nanocarbons” **Raman Spectroscopy in Graphene Related Systems**, John Wiley & Sons, 2011.
- [50] Park, S., Bielawski, C. W., Ruoff, R. S. “The chemistry of graphene oxide.” **Chemical Society reviews**, v. 39, n.1, Jan. 2010.

- [51] Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., Kim, S.-J. "The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation", **Carbon**, v.53, pp. 39-49, Mar. 2013.
- [52] ARAUJO, J., SILVA, A., GOUVÊA, C., S. LOPES, E., A.A. SANTOS, R., TERRAZOS, L., CAPAZ, R., A. ACHETE, C. and MACIEL, I., "Phosphorous Bonding in Single Wall Carbon Nanotubes Studied by X-Ray Photoelectron Spectroscopy and DFT calculations", **Carbon**, Dec. 2015.
- [53] CASTRO, K. L. S., CURTI, R. V., ARAUJO, J. R., LANDI, S. M., FERREIRA, E. H. M., NEVES, R. S., KUZNETSOV, A., SENA, L. A., ARCHANJO, B. S. and ACHETE, C. A., "Calcium incorporation in graphene oxide particles: A morphological, chemical, electrical, and thermal study", **Thin Solid Films** v.610, n. pp. 10-18, 2016.
- [54] KANIYOOR, A. and SUNDARA, R., "A Raman spectroscopic investigation of graphite oxide derived graphene" **AIP Advances** v.2, Sep. 2012.
- [55] KRISHNAMOORTHY, K., KIM, G. S. and KIM, S. J., "Graphene nanosheets: Ultrasound assisted synthesis and characterization", **Ultrason Sonochem** v.20, n. 2, pp. 644-9, Mar. 2013.
- [56] RIBEIRO-SOARES, J., "Structural analysis of polycrystalline graphene systems by Raman spectroscopy", **Carbon** v.v. 95, n. pp. pp. 646-652-2015 v.95, Dec. 2015.
- [57] CANÇADO, L. G., JORIO, A., FERREIRA, E. H. M., STAVALE, F., ACHETE, C. A., CAPAZ, R. B., MOUTINHO, M. V. O., LOMBARDO, A., KULMALA, T. S. and FERRARI, A. C., "Quantifying Defects in Graphene via Raman Spectroscopy at Different Excitation Energies", **Nano Letters** v.11, n. 8, pp. 3190-3196, Aug. 2011.
- [58] SAITO, R., HOFMANN, M., DRESSELHAUS, G., JORIO, A. and DRESSELHAUS, M. S., "Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes", **Advances in Physics** v.60, n. 3, pp. 413-550, Jun. 2011.
- [59] MENDOZA, M. E., FERREIRA, E. H. M., KUZNETSOV, A., ACHETE, C. A., AUMANEN, J., MYLLYPERKIÖ, P., JOHANSSON, A., PETTERSSON, M. and ARCHANJO, B. S., "Revealing lattice disorder, oxygen incorporation and pore formation in laser induced two-photon oxidized graphene", **Carbon** v.143, n. pp. 720-727, Mar. 2019.

- [60] MARTINS FERREIRA, E. H., MOUTINHO, M. V. O., STAVALE, F., LUCCHESI, M. M., CAPAZ, R. B., ACHETE, C. A. and JORIO, A., "Evolution of the Raman spectra from single-, few-, and many-layer graphene with increasing disorder", **Physical Review B** v.82, n. 12, pp. 125429, Sep. 2010.
- [61] FERRARI, A. C. and ROBERTSON, J., "Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon", **Physical Review B** v.61, n. 20, pp. 14095-14107, May. 2000.
- [62] L. S. CASTRO, K., "Electrochemical Response of Glassy Carbon Electrodes Modified using Graphene Sheets of Different Sizes", **International Journal of Electrochemical Science** v.13, pp 71-87, Jan. 2018.
- [63] MALEKI, H., COJOCARU, C. D., BRETT, C. M. A., JENKINS, G. M. and SELMAN, J. R., "Changes in the electrochemical behavior of polymeric carbon induced by heat-treatment and doping with lithium ions", **Journal of the Electrochemical Society** v.145, n. 3, pp. 721-730, Mar. 1998.
- [64] MOSES, P. R., WIER, L. and MURRAY, R. W., "Chemically modified tin oxide electrode", **Analytical Chemistry** v.47, n. 12, pp. 1882-1886, Oct. 1975.
- [65] AHN, K. S., KIM, J. S., KIM, C. O. and HONG, J. P., "Non-reactive rf treatment of multiwall carbon nanotube with inert argon plasma for enhanced field emission", **Carbon** v.41, n. 13, pp. 2481-2485, Jan. 2003.