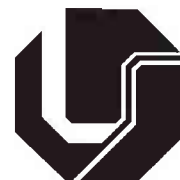




UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL



Sínteses e caracterizações dos óxidos de grafeno funcionalizado com cisteamina e óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro, com potencial aplicação em biossensores.

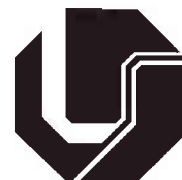
Bárbara Costa de Saint Just Fontes Ribeiro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL



Sínteses e caracterizações dos óxidos de grafeno funcionalizado com cisteamina e óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro, com potencial aplicação em biossensores.

Bárbara Costa de Saint Just Fontes Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro.

Co- Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jussara Vieira da Silva.

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Química Industrial.

UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL



Sínteses e caracterizações dos óxidos de grafeno funcionalizado com cisteamina e óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro, com potencial aplicação em biossensores.

Bárbara Costa de Saint Just Fontes Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro.

Instituto de Química.

Co- Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jussara Vieira da Silva.

Instituto de Química.

UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO, 2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL



**Sínteses e caracterizações dos óxidos de grafeno funcionalizado com cisteamina e
óxidos de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro, com potencial
aplicação em biossensores.**

Bárbara Costa de Saint Just Fontes Ribeiro

Aprovado pela Banca Examinadora em: 13/12/17 Nota: 97,0

Prof. Dr. Sidnei Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Renata Cristina de Lima
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. João Marcos Madurro
Universidade Federal de Uberlândia
Presidente da Banca Examinadora

UBERLÂNDIA - MG
DEZEMBRO, 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Simone e Carlos, e também ao meu irmão Pedro, pois sem eles seria impossível chegar até aqui e estudar durante esses cinco anos. Apesar de todos os momentos difíceis que passamos, a maioria conseguimos contornar com sucesso.

Ao meu orientador, professor João Marcos pela confiança no meu trabalho e compreensão de que a carga horária da graduação não nos permite estar o tempo todo no laboratório.

Agradeço a todos os membros do LAFIP e BIOSENS por todo companherismo durante esses dois anos e meio que estive com vocês. Em especial à Jussara, pois sem ela esses trabalho não teria acontecido tão bem, pela orientação quando eu não sabia mais para onde correr, pela força mesmo nos momentos tão difíceis que passou na reta final deste trabalho.

Aos meus amigos, tanto os antigos parceiros de Goiânia, em especial à Patrícia, Arthur, João, Amanda, Andressa e Thamires. Quanto aos amigos que fiz em Uberlândia, em especial à Victor, Luiza, Yasmim, Larissa, Marina, Carol, Leonardo, Fernando e Lívia. Aos meus colegas de sala e de atlética, que além das festas juntos e viagens, também me proporcionaram muitos momentos de aprendizado acadêmico e pessoal. À Débora, por aguentar morar comigo durante esses quatro longos anos e mesmo assim continuar sendo uma grande parceira. À Gabriela por estar comigo durante dois anos até mesmo nos momentos mais difíceis da vida aguentando todo meu choro.

À todos os professores e técnicos do Instituto de Química por todos os momentos de aprendizado tanto acadêmico, quanto pessoal que me proporcionaram. À banca examinadora, professores Renata e Sidnei. À UFU, Rede Mineira de Química, FAPEMIG, CAPES, CNPQ, pelo apoio.

Quem me conhece sabe o quanto me esgotei, me estressei e realmente quase desisti de tudo e por isso agradeço imensamente à todos que de alguma forma me proporcionaram crescimento como pessoa e como profissional, que me agregaram conhecimento, e direta ou indiretamente permitiram a realização e finalização deste trabalho.

RESUMO

O Grafeno é um material que tem sido extensivamente explorado devido as suas propriedades singulares e notáveis como, excelentes propriedades mecânicas, térmicas, ópticas, elétrica e boa biocompatibilidade. Devido a estas propriedades, o grafeno e seus derivados vem sendo aplicado em diversas áreas, como sensores químicos e biológicos. O presente trabalho estuda alguns nanomateriais derivados do grafeno, sendo o óxido grafeno funcionalizado com cisteamina e o óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro. Para a síntese do primeiro, utiliza-se de duas rotas sintéticas diferentes com o objetivo de analisar se o mecanismo utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS) em relação a rota que utiliza cloreto de tionila poderia ser uma alternativa mais simples e menos poluente, gerando o mesmo material final. Para a síntese do óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro, utilizou-se basicamente a mesma rota sintética, com pequenas modificações, sempre visando otimizar a síntese do material de estudo. Para a caracterização utilizou-se a espectroscopia no infravermelho, microscopia de força atômica e técnica eletroquímica a partir de eletrodos de grafite modificados com os nanomateriais. Visando a aplicações dos materiais produzidos, um oligonucleotídeo específico para *Neisseria meningitidis*, agente etiológico da meningite, foi imobilizado sobre a superfície modificada e analisada por meio de voltametria de pulso diferencial, foi observado um aumento nos valores de corrente para os eletrodos de grafite modificados quando comparado aos eletrodos de grafite sem modificação.

Palavras-chave: nanomateriais, nanopartículas de ouro, eletrodos de grafite, biossensores.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	página 14
1.1. Nanocompósitos.....	página 14
1.2. Grafeno e óxido de grafeno	página 14
1.3. Obtenção do óxido de grafeno - Método de Hummers	página 16
1.4. Nanopartículas de ouro.....	página 18
1.5. Método de Turkevich.....	página 18
1.6. Funcionalização do óxido de grafeno com cisteamina.....	página 18
1.7. Biossensores.....	página 22
1.8. Técnicas de caracterização dos nanomateriais.....	página 23
1.8.1. Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	página 23
1.8.2. Microscopia de força atômica (AFM)	página 24
1.8.3. Eletroquímica.....	página 25
1.8.3.1. Células eletroquímicas.....	página 25
1.8.3.2. Voltametria Cíclica.....	página 26
1.8.3.3. Voltametria de pulso diferencial.....	página 28
2. Objetivos.....	página 30
2.1. Objetivos gerais.....	página 30
2.2. Objetivos específicos.....	página 30
3. Parte experimental.....	página 31
3.1. Reagentes.....	página 32
3.2. Limpeza dos materiais.....	página 32
3.3. Metodologias.....	página 32
3.3.1. Síntese do óxido de grafeno(OG)	página 33
3.3.2. Funcionalização do óxido de grafeno com cisteamina (OGcis e OGcis*)	página 33
3.3.2.1. Metodologia com cloreto de tionila (OGcis):.....	página 33
3.3.2.2. Metodologia utilizando EDC/NHS (OGcis*):.....	página 35
3.3.3. Síntese das nanopartículas de ouro (NpAu)	página 36
3.3.4. Modificação do óxido de grafeno funcionalizado	página 37
3.3.5. Caracterização dos nanomateriais.....	página 38
3.3.6. Preparação dos eletrodos de grafite.....	página 39
3.3.7. Modificação dos eletrodos de grafite com o nanomaterial.....	página 40

3.3.8. Caracterização dos eletrodos modificados com sonda aniônica (ferro/ferricianeto de potássio):	página 41
3.3.9. Interação com a sonda NM1, imobilização e detecção:	página 41
4. Resultados e Discussão.....	página 42
4.1. Caracterização por técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	página 43
4.2. Caracterização por microscopia de força atômica.....	página 47
4.3. Caracterização eletroquímica por voltametria cíclica.....	página 49
4.4. Imobilização e detecção da sonda NM1.....	página 53
5. Conclusão.....	página 55
6. Perspectivas.....	página 55
7. Referências.....	página 55

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS:

AFM – Microscopia eletrônica de varredura.

ATR– Reflectância total atenuada.

CE – Contra-eletrodo.

EDC – 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

EG – Eletrodo de grafite.

EG/OGcis – Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina sintetizado pelo método utilizando cloreto de tionila.

EG/OGcis* – Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina sintetizado pelo método utilizando EDC/NHS.

EG/OG_rNpAu – Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro sintetizado pelo método utilizando cloreto de tionila.

EG/OG_rNpAu* – Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro sintetizado pelo método utilizando EDC/NHS.

ER – Eletrodo de referência.

ET – Eletrodo de trabalho.

FT-IR – Espectroscopia de absorção no infravermelho por Transformada de fourier.

I – Corrente.

NHS - N-hidroxissuccinimida.

OG – Óxido de grafeno.

OGcis – Óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina sintetizado pelo método utilizando cloreto de tionila.

OGcis* –Óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina sintetizado pelo método utilizando EDC/NHS.

OG_rNpAu – Óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro sintetizado pelo método utilizando cloreto de tionila.

OG_rNpAu* – Óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro sintetizado pelo método utilizando EDC/NHS.

V – Potencial

VC – Voltametria cíclica.

v – Vibração de estiramento axial

ω – Vibração molecular de deformação angular simétrica fora do plano ("Wagging")

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Representação esquemática do grafeno como precursor dos alótropos fulereno, nanotubos de carbono e grafite.

Figura 2: Representação comparativa da estrutura do grafeno e do óxido de grafeno.

Figura 3: Exemplo de uma molécula diatômica heteronuclear, representando simplificada a diferença de dipolo que ocorre.

Figura 4 : Representação do princípio de funcionamento de um AFM.

Figura 5: Esquema de uma célula eletroquímica de três compartimentos.

Figura 6: Forma de onda característica da voltametria cíclica, com potencial elétrico em função do tempo. Cada ciclo é composto por dois segmentos: um que varia o potencial de A a B e outro que vai de B a A.

Figura 7: Exemplo de voltamograma cíclico, com um pico de oxidação próximo a +0,3V e um de redução próximo a +0,2V.

Figura 8: Forma de onda característica da voltametria de pulso diferencial .

Figura 9: Exemplo de voltamograma de pulso diferencial

Figura 10: Representação esquemática da metodologia empregada para a síntese do óxido de grafite.

Figura 11: Esquema da rota sintética para formação do OGCis a partir do OG.

Figura 12: Esquema da rota sintética para formação do OGCis* a partir do OG.

Figura 13: Esquema da rota sintética para formação das nanopartículas de ouro.

Figura 14: Esquema da rota sintética para formação do OGrNpAu a partir do OGCis.

Figura 15: Esquema da rota sintética para formação do OGrNpAu* a partir do OGCis*.

Figura 16: esquema de gotejamento no EG.

Figura 17: Estrutura química esperada do óxido de grafeno, óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina, e óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro.

Figura 18 : FT-IR obtidos em pastilha de KBr para A) OG , B) OGCis, C) OGrNpAu ; e D) sobreposição de C, B e A .

Figura 19 : ATR-FTIR para para E) OG; F) OGCis* ; G) OGrNpAu*; e H) sobreposição de F, G e E.

Figura 20: AFM do composto OG em superfície de mica recém clivada.

Figura 21: AFM dos compostos OGrNpAu (a) e OGrNpAu* (b) em superfície de mica recém clivada.

Figura 22: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos descoberto (preto) e modificado com 30 μL de OGrNpAu (vermelho) em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Figura 23: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos descoberto (preto) e modificado com 30 μL de OGrNpAu* (vermelho) em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Figura 24: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com OGrNpAu (1mg/ml) 15 μL (verde), 30 μL (rosa) e 45 μL (azul) em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Figura 25: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com OGrNpAu 30 μL (rosa), e 45 μL (azul); em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

Figura 26: Voltamograma de pulso diferencial (subtraído) da imobilização da NM1 sobre os eletrodos modificados OGrNpAu 15 μL (verde), 30 μL (rosa), e do padrão OG (preto). Eletrólito: tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH = 7,0; Amplitude = 70 mV, $V = 30 \text{ mV s}^{-1}$.

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Métodos de oxidação do grafite para obtenção do óxido de grafeno.

Tabela 2: Atribuições para os estiramentos de interesse para os compostos OG, OGcis, OGcis*, OGrNpAu, e OGrNpAu*.

Tabela 3 : Frequências (cm^{-1}) correspondentes às principais bandas dos compostos sintetizados e atribuições do espectro infravermelho.

*“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como
você o encara é que faz a diferença.”*

Benjamin Franklin

*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não
existirão resultados”*

Mahatma Gandhi

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanocompósitos

Os nanocompósitos são formados a partir de dois ou mais compostos, sendo pelo menos um deles em dimensões nanométricas. A interação entre as duas classes de materiais pode levar a formação de um novo material com propriedades melhores, quando comparado aos componentes puros. Sendo assim, os nanocompósitos representam uma classe de materiais onde duas ou mais substâncias combinadas passam a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. (OLIVEIRA *et al.* 2006). No presente trabalho, tem-se o intuito de estudar as propriedades de um nanocompósito, o óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro.

Essa classe de materiais são projetados para as mais diversas finalidades, como a produção de plásticos que retardam a chama (IDUMAH; HASSAN; AFFAM, 2015), entrega de medicamentos em nanocápsulas (MERINO *et al.* 2015), tratamento de água (SUBRAMANI e JACANGELO, 2015), embalagem de alimentos (BUMBUDSANPHAROKKE e KO, 2015), cirurgias e transplantes de órgãos (CROWLEY.; BIRCHALL.; SEIFALIAN; 2015) e dispositivos eletrônicos (RATH e KUNDU, 2015).

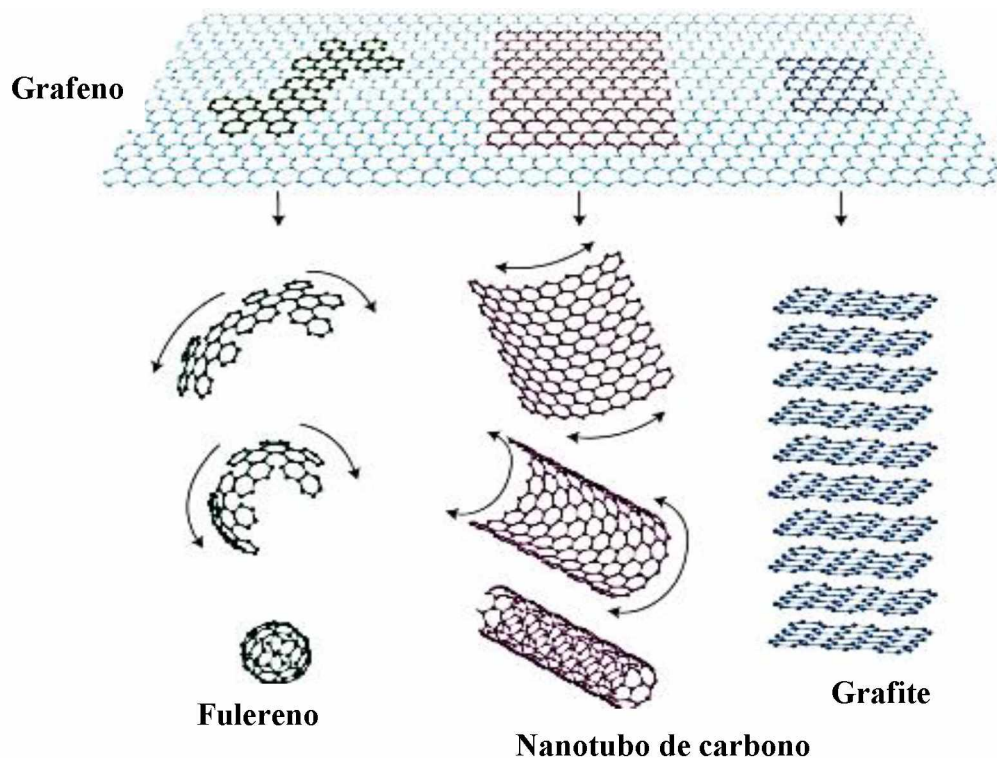
Vários materiais nanoestruturados vêm sendo utilizados na preparação de nanocompósitos, recentemente, o grafeno e seu derivado, o óxido de grafeno reduzido, têm se destacado devido a suas propriedades únicas (LEE *et al.* 2008), que serão descritas no item 1.2 deste trabalho.

1.2. Grafeno e óxido de grafeno

O Grafeno é um dos alótropos do carbono e a sobreposição de várias folhas de grafeno dão origem ao grafite, e a outros alótropos do carbono (Figura 1). O grafeno é formado por uma camada de átomos de carbonos estruturados de forma hexagonal e hibridizados na forma sp^2 , com espessura de aproximadamente 1 Angstrom ($\text{\AA}$) = 10^{-8} cm. Este material tem sido extensivamente explorado devido as suas propriedades singulares e notáveis como, excelentes propriedades mecânicas, térmicas, ópticas, elétricas (ALLEN; TUNG; KANER, 2010) e boa biocompatibilidade (JIN; . *et al.*, 2016). Sua alta condutividade térmica ($\sim 5.000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) favorece uma mobilidade de transportadores de cargas a temperatura ambiente ($200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e além disso, exibe uma elevada área superficial ($\sim 2.600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) (BALANDIN *et al.*,

2008; BOLOTIN *et al.*, 2008; XIANG; YU; JARONIEC, 2012 ; YEH *et al.*, 2013). Devido a isso, o grafeno tem sido aplicado em diversas áreas tais como: super-capacitores (SUN *et al.*, 2015), eletrocatalise (SHI *et al.*, 2015), biomedicina (PODILA *et al.*, 2013) e sensores químicos e biológicos (VASHIST, 2012).

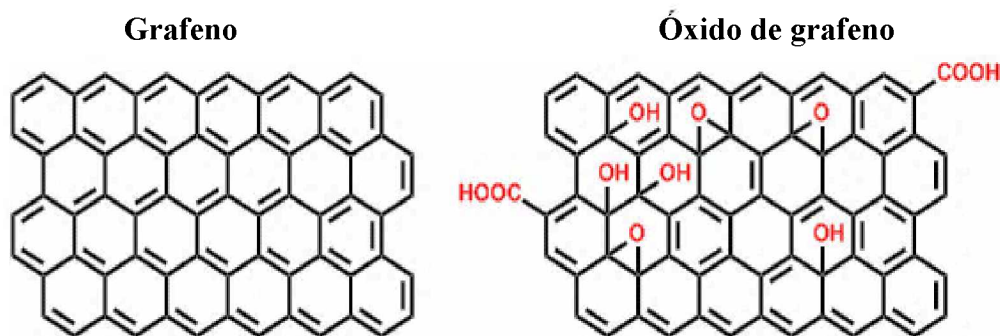
Figura 1: Representação esquemática do grafeno como precursor dos alótropos fulereno, nanotubos de carbono e grafite.



Fonte: Adaptado de GEIM e NOVOSELOV, 2007

Originado a partir do grafeno, o óxido de grafeno (OG) possui carbonos hibridizados na forma sp^3 e vários grupos contendo oxigênio como epóxidos, hidroxilas, carbonilas e carboxilas (Figura 2). Os epóxidos estão localizados principalmente no meio da rede de carbonos, já as carbonilas e carboxilas estão nas extremidades, enquanto que as hidroxilas podem estar em toda a estrutura (LERF *et al.*, 1998). Os grupos de oxigênio aumentam a solubilidade deste material em água, bem como, a funcionalização com outras substâncias químicas e ainda, permite interações como a de ligação de hidrogênio com polímeros e materiais biológicos.

Figura 2: Representação comparativa da estrutura do grafeno e do óxido de grafeno.



Fonte : Adaptado do site TCI Chemicals <http://bit.ly/2tIDTe9>

1.3. Obtenção do óxido de grafeno - Método de Hummers

As nanofolhas de grafeno foram primeiramente obtidas por esfoliação mecânica (método Scotch-tape) de grafite a granel (NOVOSELOV *et al.*, 2004) e por deposição de vapor químico (BERGER *et al.*, 2006), no entanto, essas rotas não são usuais para a produção em massa de grafeno.

Os métodos para a redução do óxido de grafeno se destacam como a principal estratégia para produzir um material em larga escala com propriedades similares ao grafeno (SILVA, 2017). A escalabilidade é um fator importante para a síntese (BAE *et al.*, 2010).

O óxido de grafeno é obtido a partir da dispersão aquosa do óxido de grafite, este, por sua vez pode ser facilmente sintetizado pela oxidação do pó natural de grafite e é de grande interesse devido ao seu baixo custo, acesso fácil e ampla capacidade de conversão em grafeno.

Ao longo da história, com a evolução da ciência, diferentes métodos para síntese do óxido de grafeno foram desenvolvidos (Tabela 1). Os primeiros procedimentos para a síntese do OG foram desenvolvidos há várias décadas por Brodie (BRODIE, 1859), Staudenmeier (STAUDENMAIER, 1898) e Hummers (HUMMERS; OFFERMAN, 1958).

Tabela 1: Métodos de oxidação do grafite para obtenção do óxido de grafeno.

	Brodie	Staudenmaier	Hummers
Ano	1859	1898	1958
Oxidantes	KClO ₃ , HNO ₃	KClO ₃ (ou NaClO ₄), HNO ₃ , H ₂ SO ₄	NaNO ₃ , KMnO ₄ , H ₂ SO ₄
Tempo de reação	3-4 dias	1-2 dias	9-10 h
Referências	(BRODIE, 1859)	(STAUDENMAIER, 1898)	(HUMMERS; OFFERMAN, 1958)

Fonte: SILVA, 2017.

A extensão da oxidação do grafite, quantificada pela razão atômica C:O, vai depender do método de síntese, bem como do tempo da reação. O OG obtido pelo método de Staudenmaier normalmente é mais oxidado, entretanto a síntese inteira leva dias de reação. Infelizmente, tanto ele quanto o método Brodie (BRODIE, 1859), produzem como subproduto o ClO₂ (dióxido de monoclóro) o qual deve ser manuseado com cautela devido à sua alta toxicidade e tendência a se decompor no ar gerando explosões. Assim, o método de Hummers (HUMERS e OFFERMAN, 1958) tem sido comumente empregado na pesquisa científica, devido não fazer uso do gás ClO₂ e o tempo de reação ser relativamente curto. O inconveniente desse método é a potencial contaminação por excesso de permanganato, todavia esse reagente pode ser removido por tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) seguido de lavagem. (SILVA, 2017)

Quando o grafite é oxidado, ocorre a quebra da estrutura hibridizada em sp² das folhas de grafeno empilhadas, gerando defeitos que manifestam como estruturas enrugadas (MCALLISTER *et al.*, 2007) e, ainda, o aumento da distância entre as folhas adjacentes do grafite. Essa distância depende da quantidade de água intercalada entre as folhas, facilitando a separação das folhas individuais de óxido de grafeno quando sonicado em água. Em meio básico, os grupos funcionais ficam carregados negativamente, promovendo uma estabilização

do material em meio aquoso (BISSESSUR; SCULLY, 2007). Essa dispersão é a precursora para obter muitos materiais à base de óxido de grafeno e grafeno. (SILVA, 2017)

1.4. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro são uma dispersão de partículas cujo tamanho do material particulado é normalmente inferior a 100 nm. Devido à sua escala nanométrica, essas nanopartículas apresentam características físico-químicas ópticas, magnéticas, eletrônicas e catalíticas peculiares que diferem muitos deste mesmo material em escala macrométrica. (DIAS, 2015 e MELO JR. *et al.*, 2012)

Para formação do ouro coloidal é necessária a redução de sais de ouro pela aplicação de um agente redutor. Essas nanopartículas possuem aplicações como o uso em sensores ópticos e mediadores de transferência de elétrons em reações redox. No caso, quando aplicado em sensores eletroquímicos modificados com nanoestruturas, as nanopartículas de ouro têm resultados satisfatórios, pois aumentam a velocidade no transporte de massa. Isso acontece principalmente porque quando se tem um material nanoestruturado, ocorre um ganho de área superficial do eletrodo, que possibilita uma interação mais efetiva com a espécie em solução. (DIAS, 2015 e MELO JR. *et al.*, 2012)

1.5. Método de Turkevich

Um método comumente empregado para a síntese das nanopartículas de ouro é o método de Turkevich (TURKEVICH *et al.*, 1953). Tal método envolve a reação de pequenas quantidades de ácido tetracloroáurico a quente com pequenas quantidades de solução de citrato de sódio. O ouro coloidal irá se formar porque os íons de citrato são bons agentes redutores e estabilizante. O método pioneiro de Turkevich foi desenvolvido em 1953, melhorado por Frens na década de 1970 (FRENS, 1972) e, apesar de outros métodos para a síntese de nanopartículas de ouro, o método pioneiro é um dos principais e simplificados para a produção desse nanomaterial de 10-20 nm (DIAS, 2015).

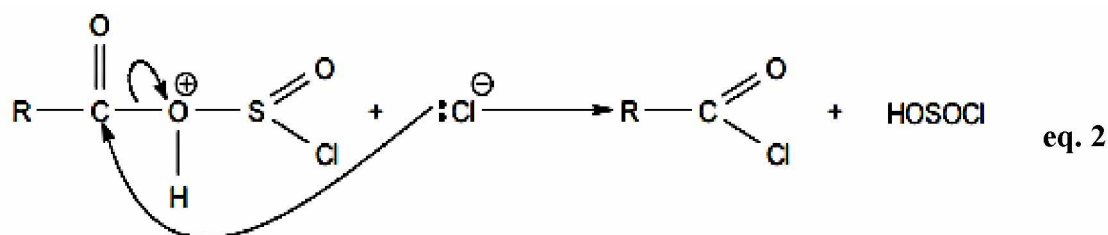
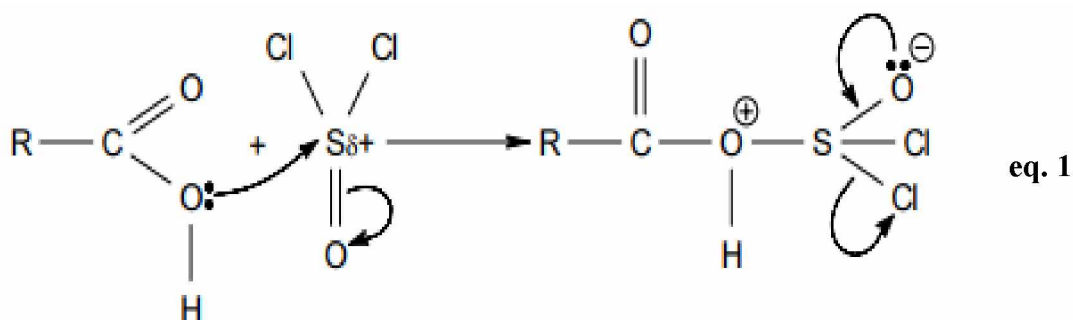
1.6. Funcionalização do óxido de grafeno com cisteamina

Os grupos funcionais presentes no óxido de grafeno, além de viabilizar ligações de hidrogênio com outras estruturas, permitem a funcionalização covalente a fim de ampliar as

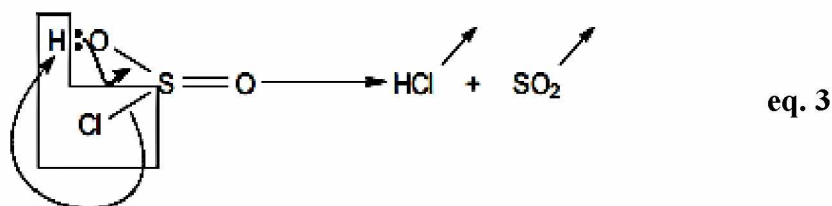
interações com diversas estruturas, incluindo polímeros e moléculas biológicas. Assim, o óxido de grafeno pode ser aplicado na produção de sensores biológicos. (DAS; PRUSTY, 2013; HU *et al.*, 2014).

Neste trabalho o óxido de grafeno foi funcionalizado com a cisteamina e posteriormente foi reduzido e decorado com as nanopartículas de ouro. Primeiramente obteve-se o óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina (OGcis) por meio da rota sintética utilizando cloreto de tionila (SOCl_2).

A primeira etapa é um ataque nucleófilo do oxigênio da hidroxila do ácido ao enxofre, formando-se um intermediário instável (eq. 1). A fase seguinte (eq. 2) é a eliminação da base Cl^- , que irá atacar o carbono da carbonila da estrutura (eq. 3) formando o haleto de acila correspondente, HCl (ácido clorídrico) e SO_2 (dióxido de enxofre). (BRUICE, 2006).

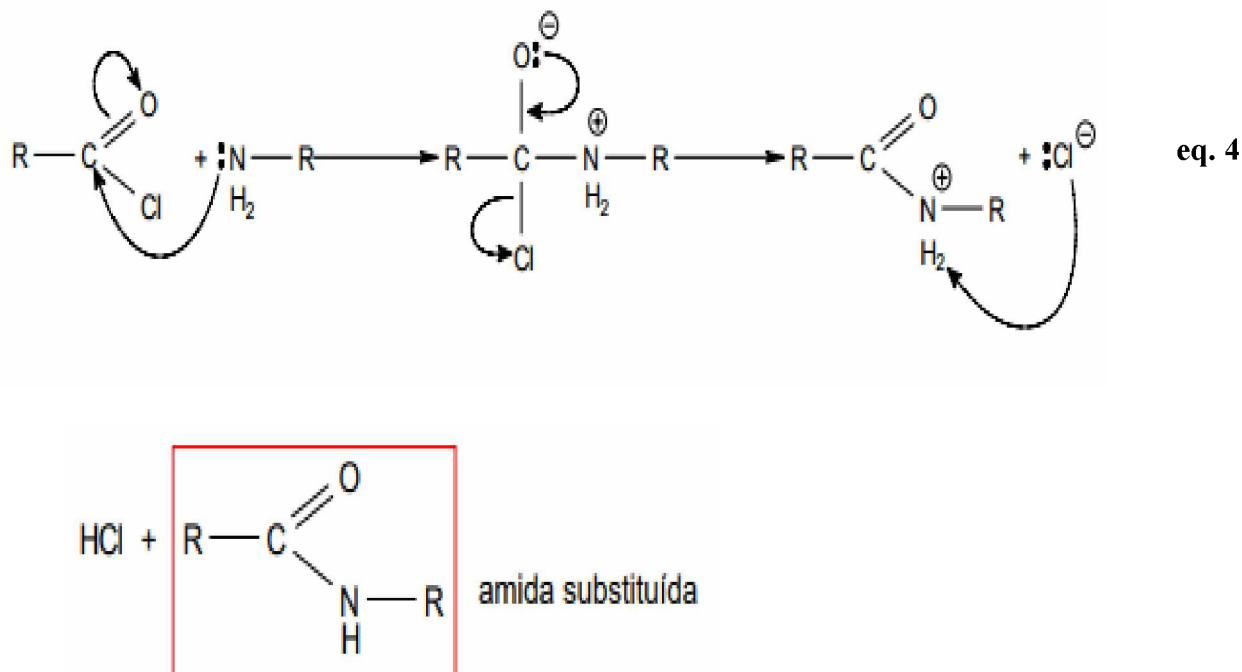


①



Fonte: Apostila de laboratório de química organica II, escola de engenharia USP – Lorena, 2007 < http://www.dequi.eel.usp.br/~croa/Organica_2.pdf>

Com a formação do haleto de acila o composto fica extremamente reativo, a cisteamina é uma amina monosubstituída que reage com o cloreto de acila segundo o seguinte mecanismo tradicional (BRUICE, 2006), (eq. 4):



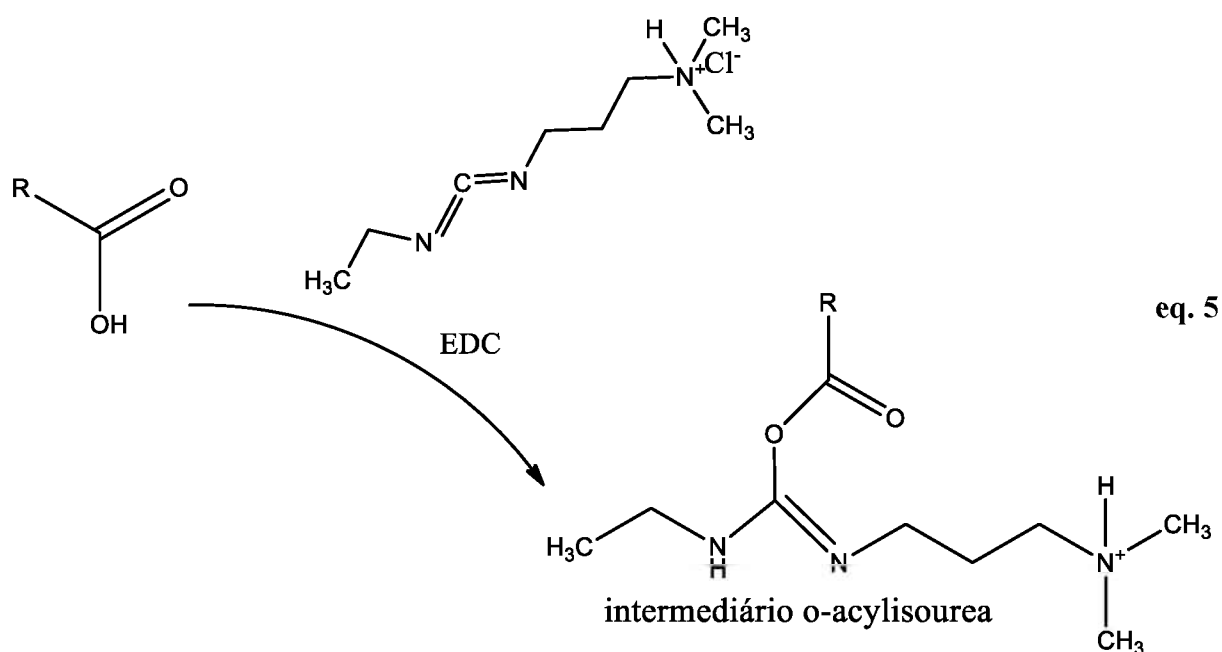
Fonte: Apostila de laboratório de química orgânica II, escola de engenharia USP – Lorena, 2007 < http://www.dequi.eel.usp.br/~croa/Organica_2.pdf>

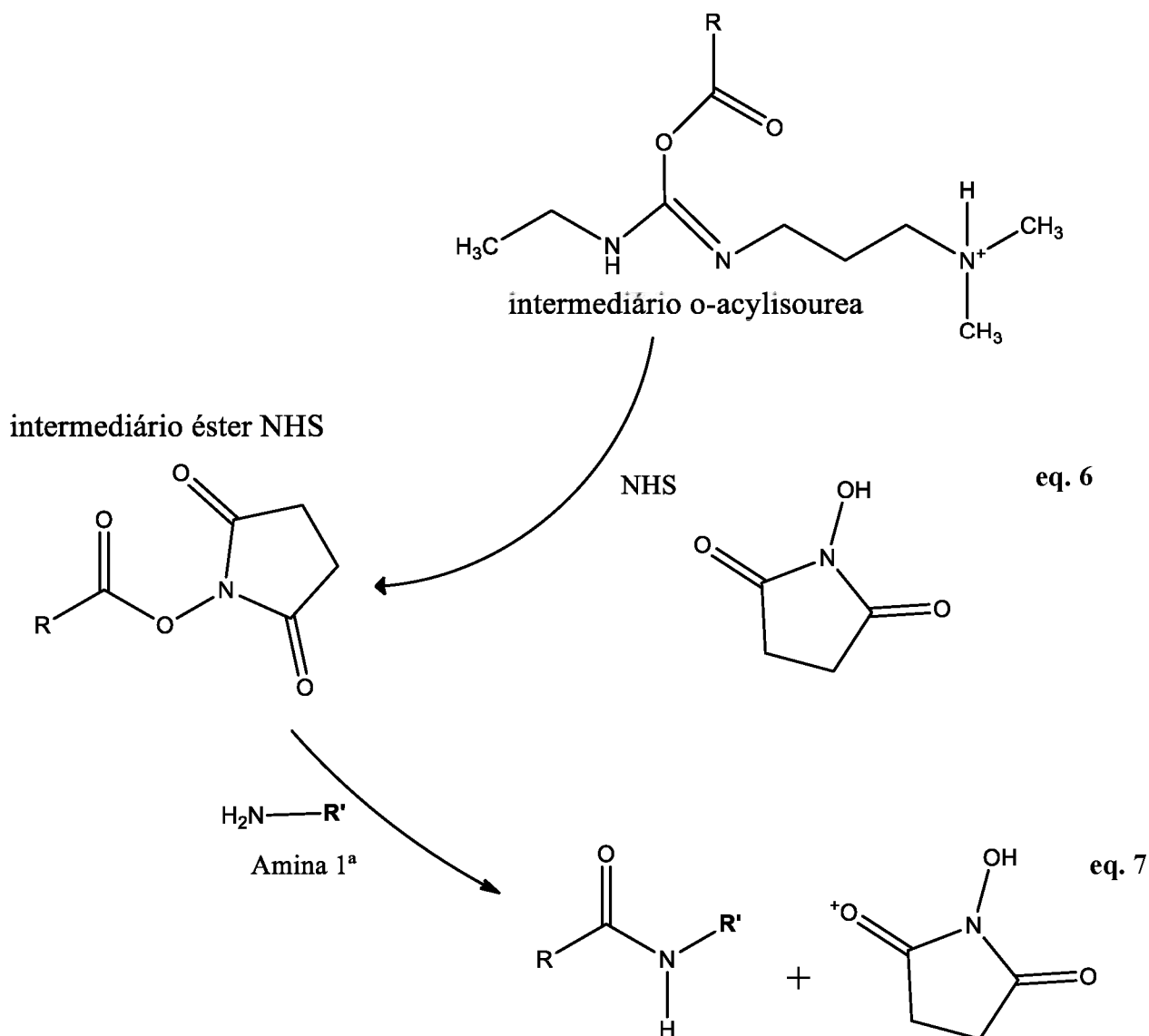
A partir dos mecanismos de reação é possível entender como ocorre a funcionalização do óxido de grafeno com a cisteamina, pois o cloreto de tionila promove a acilação dos grupos carboxílicos contidos no óxido de grafeno, tornando esses grupos reativos suficientemente para promoverem a substituição pela cisteamina que é uma amina mono-substituída (BRUICE, 2006), o produto formado nessa reação foi chamado de OGcis. Sendo assim, após a funcionalização são formados amidas e átomos de enxofre expostos, este tem afinidade por estruturas de ouro viabilizando assim interação com as nanopartículas de ouro.

Outra rota sintética comumente aplicada para ativação de carboxilas em ensaios biológicos é a utilização de uma carbodiimida, neste caso a reação não é tão agressiva quando a utilização do cloreto de tionila. Para isso utilizou-se o mecanismo EDC/NHS (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidroxissuccinimida) para ativação da carboxila e, posteriormente incorporação da cisteamina (HERMANSON, 2008), resultando em um produto chamado de OGcis*.

O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) é um agente de reticulação utilizado para acoplar grupos carboxilo ou fosfato a amins primárias. Este agente de reticulação foi utilizado em diversas aplicações, tais como a formação de ligações de amida na síntese de peptídeos, rotulando ácidos nucleicos através de grupos fosfato e criando ésteres NHS reativos a amina de biomoléculas (HERMANSON, 2008).

Uma das principais vantagens do acoplamento EDC é a sua solubilidade em água, que permite a bioconjugação direta sem dissolução prévia do solvente orgânico. Além disso, o excesso de reagentes e subprodutos podem ser facilmente removidos por diálise ou filtração por gel (SHEEHAN et al., 1961, 1965). No entanto, a reação de acoplamento deve ser realizada rapidamente, uma vez que o éster reativo formado pode ser hidrolisado em soluções aquosas. Para aumentar a estabilidade deste éster ativo, podem ser utilizadas N-hidroxissuccinimida (NHS) ou N-hidroxissulfoxuccinimida (sulfo-NHS). A adição do NHS ou sulfo-NHS estabiliza o intermediário reativo de amina convertendo-o em um éster reativo com amina, aumentando assim a eficiência de reações de acoplamento mediadas por EDC. Uma vez que EDC é solúvel em água, a reticulação pode ser feita sob condições fisiológicas sem adição de solvente orgânico (HERMANSON, 2008). O mecanismo dessa reação representado nas equações 5, 6 e 7, mostra que o produto final (OGcis*) é igual ao do mecanismo tradicional (OGcis), sendo assim, uma alternativa para obtenção de amidas.





Fonte: adaptado de HERMANSON, 2008 (construído no programa ChemDraw®)

1.7. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam algum elemento biológico, capazes de produzir sinais mensuráveis que se relacionem à concentração do analito de interesse (TURNER, 2013). Os biossensores combinam um sistema de reconhecimento bioquímico a um transdutor, que converte esse evento de reconhecimento em um sinal mensurável (SANVICENS *et al.* 2011).

O sucesso da associação entre as técnicas de detecção e biomoléculas específicas possibilitou o desenvolvimento de tecnologias de reconhecimento molecular sensíveis e seletivas, com aplicações que incluem a análise clínica, ambiental (TICHONIUK *et al.* 2010),

toxicológica, medicina do esporte (RAPP *et al.* 2010), segurança alimentar, descoberta de novas drogas, controle de processos, segurança e defesa (RAMACHANDRAN *et al.* 2015).

Biossensores de DNA (ou genossensores) são dispositivos analíticos resultantes da integração de uma sequência de sonda específica (geralmente um oligonucleotídeo) a um transdutor (GONG *et al.* 2015). A sonda imobilizada na superfície do transdutor reconhece a molécula-alvo de DNA pela hibridização das sequências complementares. Esse reconhecimento pode ser feito tanto diretamente (através da oxidação das bases nitrogenadas), quanto indiretamente (pela utilização de intercaladores de DNA eletroativos). Em ambos os casos citados, a reação envolve a transferência de elétrons, constituindo um genossensor eletroquímico. Nesses, o transdutor converte a resposta do evento de reconhecimento biológico em um sinal elétrico (WANG *et al.* 2011a). Os métodos eletroquímicos destacam-se pela sua especificidade por um estado de oxidação particular de uma substância, pelo baixo custo da instrumentação e pela possibilidade de fornecer informações acerca da atividade de espécies químicas (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

1.8. Técnicas de caracterização dos nanomateriais

Neste trabalho utilizou-se técnicas de espectroscopia de absorção na região do infravermelho e microscopia de força atômica, além das eletroquímicas para caracterizar e estudar os compostos sintetizados. É importante caracterizar os materiais para confirmar se a síntese foi bem sucedida.

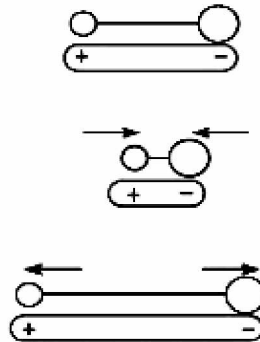
1.8.1. Espectroscopia de absorção no infravermelho (FT-IR)

A técnica de espectroscopia no infravermelho é largamente utilizada no meio científico no estudo de inúmeros compostos. O espectro no infravermelho aparece como uma série de bandas, de comprimento de ondas (μm) ou número de ondas (cm^{-1}) em função das intensidades das bandas em porcentagem de transmitância (%T) ou absorbância (A). Dessa forma, é possível identificar os modos vibracionais presentes no composto. (BARBOSA, 2007 e STUART, 2004).

Para que uma molécula apresente absorções na região do infravermelho, ela deve possuir um momento de dipolo diferente de zero, esse momento é específico para cada tipo de ligação, e gera um movimento natural das moléculas. A Figura 3 ilustra um exemplo de uma molécula “ativa no infravermelho”, uma molécula diatômica heteronuclear. O momento dipolo de tal molécula muda à medida que a ligação se expande e se contrai. Um exemplo de

uma molécula “inativa no infravermelho” seria uma molécula diatômica homonuclear porque seu momento de dipolo é zero (STUART, 2004).

Figura 3: Exemplo de uma molécula diatômica heteronuclear, representando simplificada a diferença de dipolo que ocorre.



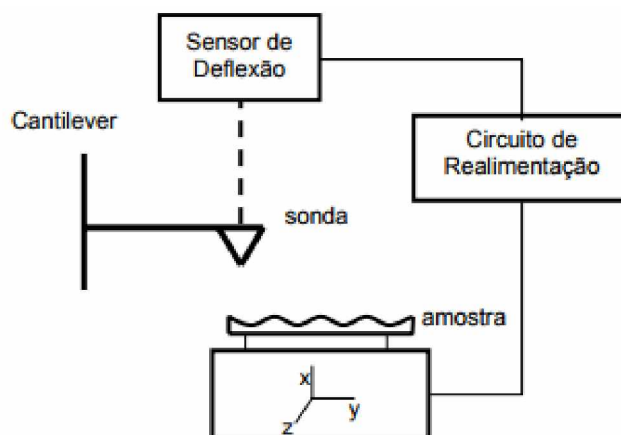
Fonte: STUART, 2004

1.8.2. Microscopia de força atômica (MAF ou em inglês AFM)

Baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micrometros de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação.

À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais, na Figura 4 é possível ter uma ideia do funcionamento de um AFM. A força mais comumente associada com AFM na deflexão do cantilever é a força de van der Waals. (YAMANAKA, 2006)

Figura 4 : Representação do princípio de funcionamento de um AFM.



Fonte: TROIANI, 2007

1.8.3. Eletroquímica

No presente trabalho, foram realizadas algumas análises utilizando técnicas eletroquímicas como voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica. A partir do uso de um potenciostato foi realizada a programação da análise desejada.

1.8.3.1. Células eletroquímicas

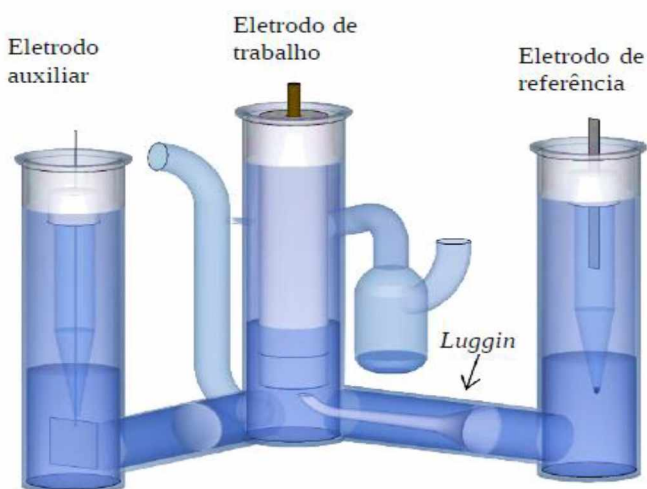
A condução de corrente elétrica na interface eletrodo-solução envolve dois tipos de processo. Cada elétron proveniente de um circuito externo que chega à superfície do eletrodo pode permanecer na superfície, aumentando a carga na região (processo não-faradaico ou capacitativo) ou sair da superfície, sendo transferido para uma espécie na solução (processo faradaico). Assim, os processos faradaicos baseiam-se na transferência direta de elétrons por meio de um processo de oxirredução. Por outro lado, esses processos faradaicos podem ser impedidos pela termodinâmica ou cinética das reações. Nessas circunstâncias, as superfícies dos eletrodos podem comportar-se como placas de um capacitor, caracterizando os processos não-faradaicos (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

Os fenômenos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo-solução podem ser estudados em células eletroquímicas, isto é, sistemas de eletrodos imersos em soluções de eletrólitos e recipientes apropriados, que são as células eletroquímicas. Para a transmissão de corrente, os eletrodos devem estar externamente conectados por um condutor, as soluções de

eletrólitos devem estar em contato e uma reação de transferência eletrônica deve ocorrer em ambos os eletrodos (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

Neste trabalho, utilizou-se células eletroquímicas de três compartimentos como a representada na Figura 5. Esta célula eletroquímica é composta por três tipos de eletrodos, o de trabalho (ET), o de referência (ER) e o contra-eletrodo(CE) ou eletrodo auxiliar.

Figura 5: Esquema de uma célula eletroquímica de três compartimentos.



Fonte: RODOVALHO, 2014.

O eletrodo de trabalho é aquele em que a reação de interesse ocorre. O eletrodo de referência fornece um potencial estável e reprodutível, independentemente da composição da amostra, em relação ao qual o potencial do eletrodo de trabalho é medido. O eletrodo auxiliar completa o circuito e é constituído por um material inerte condutor, como a platina. Assim, a corrente flui pela solução entre os eletrodos de trabalho e auxiliar. A separação dos eletrodos em compartimentos distintos pode ser realizada para impedir a dispersão de subprodutos, sem impedir o fluxo elétrico (WANG, 2006a e RODOVALHO, 2014).

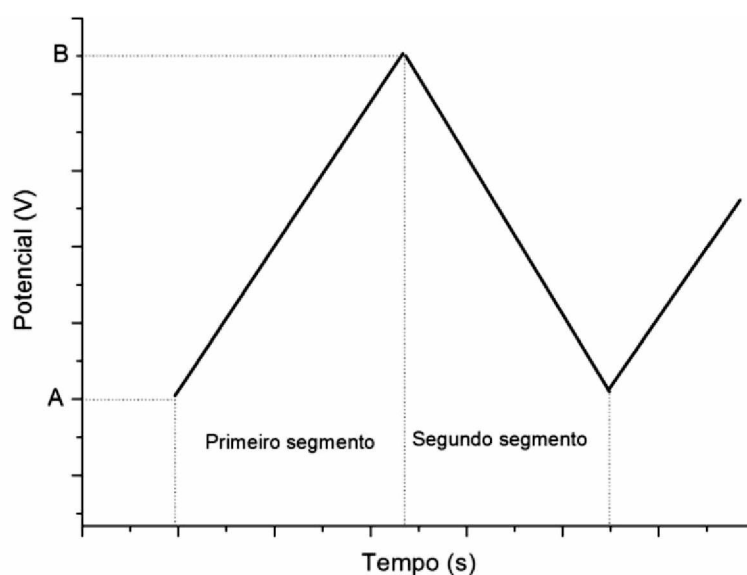
1.8.3.2. Voltametria Cíclica

Neste trabalho utilizou a técnica de voltametria cíclica com o objetivo de caracterizar os materiais sintetizados e observar a melhora na transferência do par redox nos eletrodos modificados. Isso porque essa técnica é um dos métodos eletroanalíticos mais utilizados em que é possível ter uma visão global dos processos que resultam de reação redox, que possam

ocorrer em um eletrodo de trabalho, por efeito da polarização eletroquímica, entre dois valores de potenciais (final e inicial).

O potencial do eletrodo é medido relativamente a um eletrodo de referência. O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência pode ser considerado corrente resultante pode ser tida como um sinal de resposta. A voltametria cíclica varre linearmente o potencial de um eletrodo de trabalho (WANG, 2006a), usando uma forma de onda mostrada na Figura 6. Desse modo, o potencial é variado linearmente de A até B. Em seguida, quando o extremo B é atingido, a direção é invertida e o potencial é novamente variado até o valor inicial A. O ciclo de varreduras tem uma velocidade específica e pode ser repetido (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

Figura 6: Forma de onda característica da voltametria cíclica, com potencial elétrico em função do tempo. Cada ciclo é composto por dois segmentos: um que varia o potencial de A a B e outro que vai de B a A.

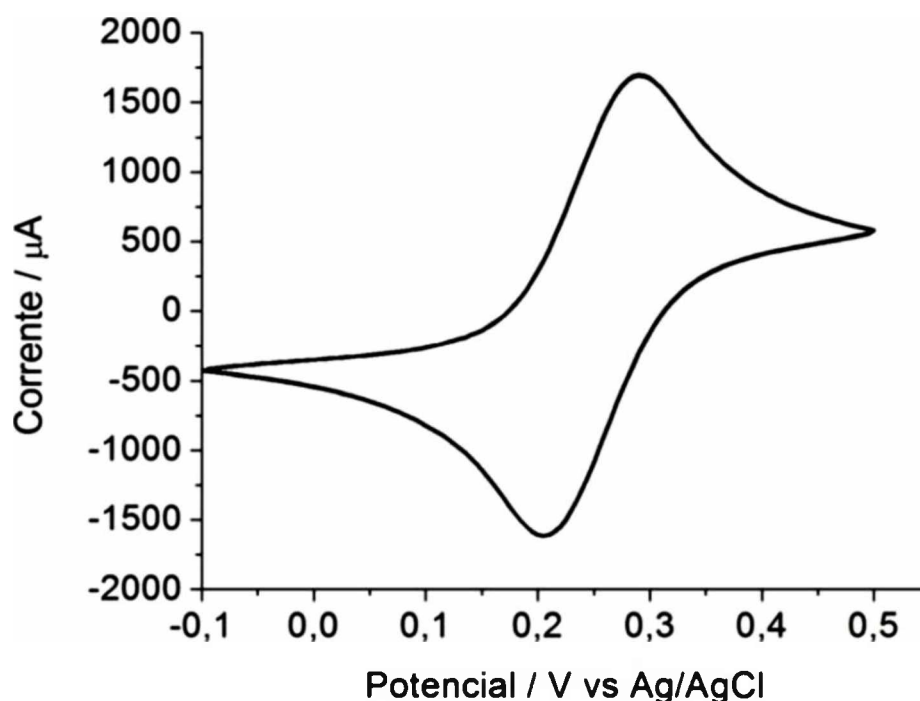


Fonte: RODOVALHO, 2014.

O gráfico resultante, de corrente em função de potencial, é chamado voltamograma cíclico. Assumindo que a forma reduzida de um dado analito está presente na solução inicialmente, o primeiro meio-ciclo será obtido a partir de uma varredura em direção a potenciais mais positivos. Durante essa varredura, será atingido um potencial característico do processo redox, em que uma corrente anódica começa a aumentar, até atingir um pico, e depois ocorre decaimento. Ao término da varredura, ocorrerá uma inversão, de modo que o segundo meio-ciclo será em direção a potenciais mais negativos. As moléculas que foram

oxidadas no primeiro meio-ciclo serão reduzidas no segundo e o perfil da resposta será similar à do primeiro meio ciclo, se o processo for reversível (WANG, 2006a). A Figura 7 mostra um exemplo típico de voltamograma cíclico, com um pico de oxidação próximo ao potencial +0,3 V e um pico de redução próximo ao potencial +0,2 V.

Figura 7: Exemplo de voltamograma cíclico, com um pico de oxidação próximo +0,3V e um de redução próximo a +0,2V.



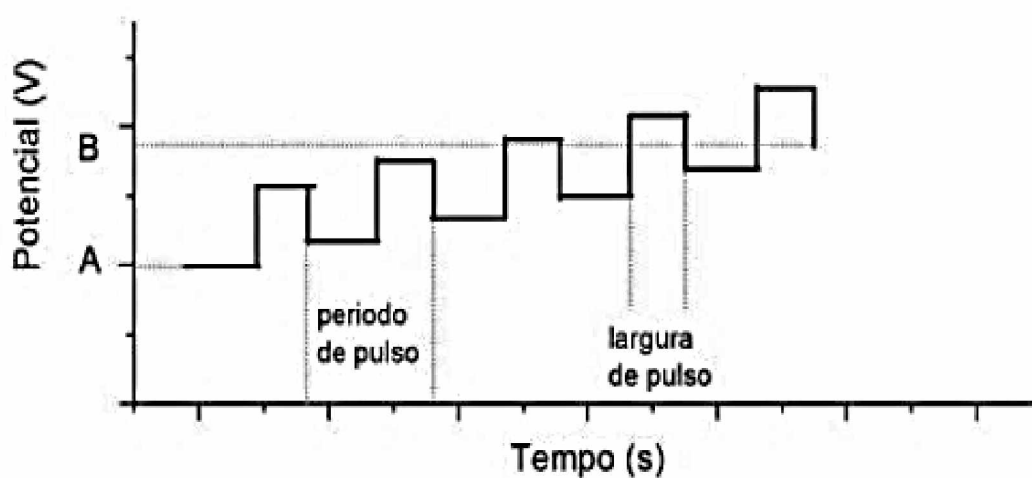
Fonte: RODOVALHO, 2014.

1.8.3.3. Voltametria de pulso diferencial

No presente trabalho a técnica de voltametria de pulso diferencial teve um papel crucial, pois com ela foi observada a detecção dos eletrodos modificados com os materiais sintetizados e imobilizados com a sonda de oligonucleotídeo específica da bactéria causadora da meningite, mostrando a possibilidade de desenvolvimento de um biossensor com os materiais sintetizados. Na técnica de voltametria de pulso diferencial, tem a finalidade de

realizar a medida de corrente em um momento em que é grande a diferença entre corrente faradaica (desejada) e a corrente não-faradaica (interferente) (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007). Assim, os potenciais são aplicados na forma de pulsos e a corrente é medida algum tempo após a aplicação, quando a corrente não-faradaica tiver decaído (SCHOLZ e BOND, 2010). A Figura 8 mostra graficamente a variação de potencial de acordo com o tempo.

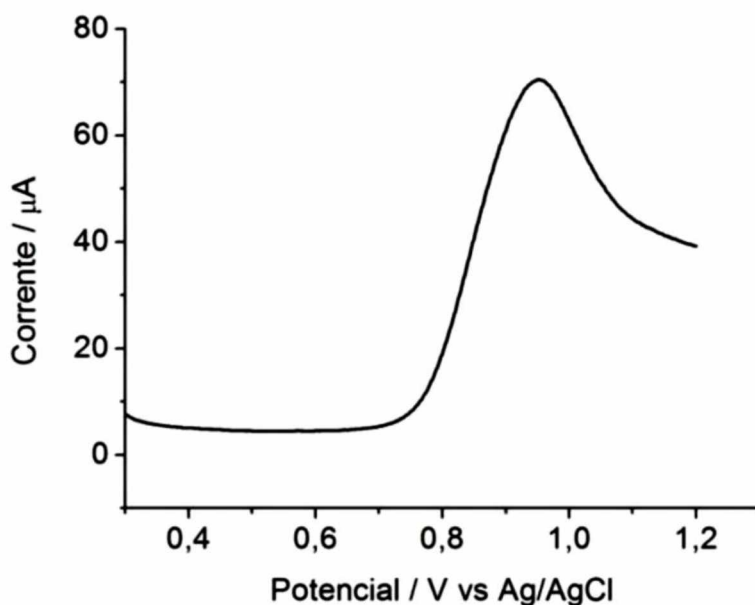
Figura 8: Forma de onda característica da voltametria de pulso diferencial .



Fonte : RODOVALHO, 2014.

Nessa técnica, as medidas de corrente são feitas alternadamente: uma anterior ao pulso e outra no fim do pulso. A diferença de corrente é gravada como uma função do potencial de excitação aplicado, que aumenta linearmente. Assim, o resultado é uma curva diferencial, consistindo de um pico cuja altura é diretamente proporcional à concentração (Figura 9). A principal vantagem da técnica é a sua grande sensibilidade (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

Figura 9: Exemplo de voltamograma de pulso diferencial.



Fonte: RODOVALHO, 2014.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

O presente trabalho tem como objetivo geral as sínteses do óxido de grafeno funcionalizados com cisteamina, obtido por meio de duas rotas sintéticas, e do óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro, visando a aplicação em sensores biológicos.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Sintetizar o óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina por duas rotas diferentes: via cloreto de tionila obtendo o OGcis e pela metodologia utilizando EDC/NHS obtendo o OGcis*.
- ✓ Sintetizar o óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro a partir dos dois precursores OGcis e OGcis*.
- ✓ Caracterizar os nanomateriais por meio de espectroscopia infravermelho e microscopia de força atômica.

- ✓ Modificar eletrodos de grafite com os nanocompósitos;
- ✓ Caracterizar e promover um estudo dos eletrodos modificados com a técnica de voltametria cíclica
- ✓ Imobilizar uma sonda de oligonucleotídeo 5'-TGTTGGGCAACCTGATTG-SH-3' (NM1)
- ✓ Realizar detecção direta da sonda biológica por voltametria de pulso diferencial.

3. Parte experimental

3.1. Reagentes

- ✓ Ácido Nítrico (HNO_3)
- ✓ Ácido Perclorico (HClO_4)
- ✓ Ácido tetracloroaurico (HAuCl_4)
- ✓ Alumina líquida $0,3\mu\text{m}$;
- ✓ Boroidreto de sódio (NaBH_4)
- ✓ Cisteamina ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NS}$)
- ✓ Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
- ✓ Cloreto de tionila (SOCl_2)
- ✓ Dimetilformamida (DMF)
- ✓ Fragmentos de DNA específicos para a meningite (NM1/sonda 5'-TGTTGGGCAACCTGATTG-SH-3')
- ✓ SigmaCote® (organopolisiloxano clorado em heptano)
- ✓ Água deionizada (H_2O)
- ✓ Cetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)
- ✓ Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
- ✓ N-hidroxissuccinimida (NHS)
- ✓ Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
- ✓ Hidróxido de amônio (NH_4OH)

Os reagentes utilizados foram de padrão analítico.

Para fazer as medidas eletroquímicas, todas as soluções foram deaeradas com nitrogênio puro por borbulhamento com o objetivo de retirar o gás oxigênio que poderia estar

presente na solução, evitando o surgimento de um sinal eletroquímico interferente nas janelas de potencial trabalhado.

3.2. Limpeza dos materiais

As células eletroquímicas e demais vidrarias utilizadas para preparo de soluções foram mergulhadas em HNO_3 concentrado por 24 horas e lavadas com água deionizada a fim de eliminar contaminantes.

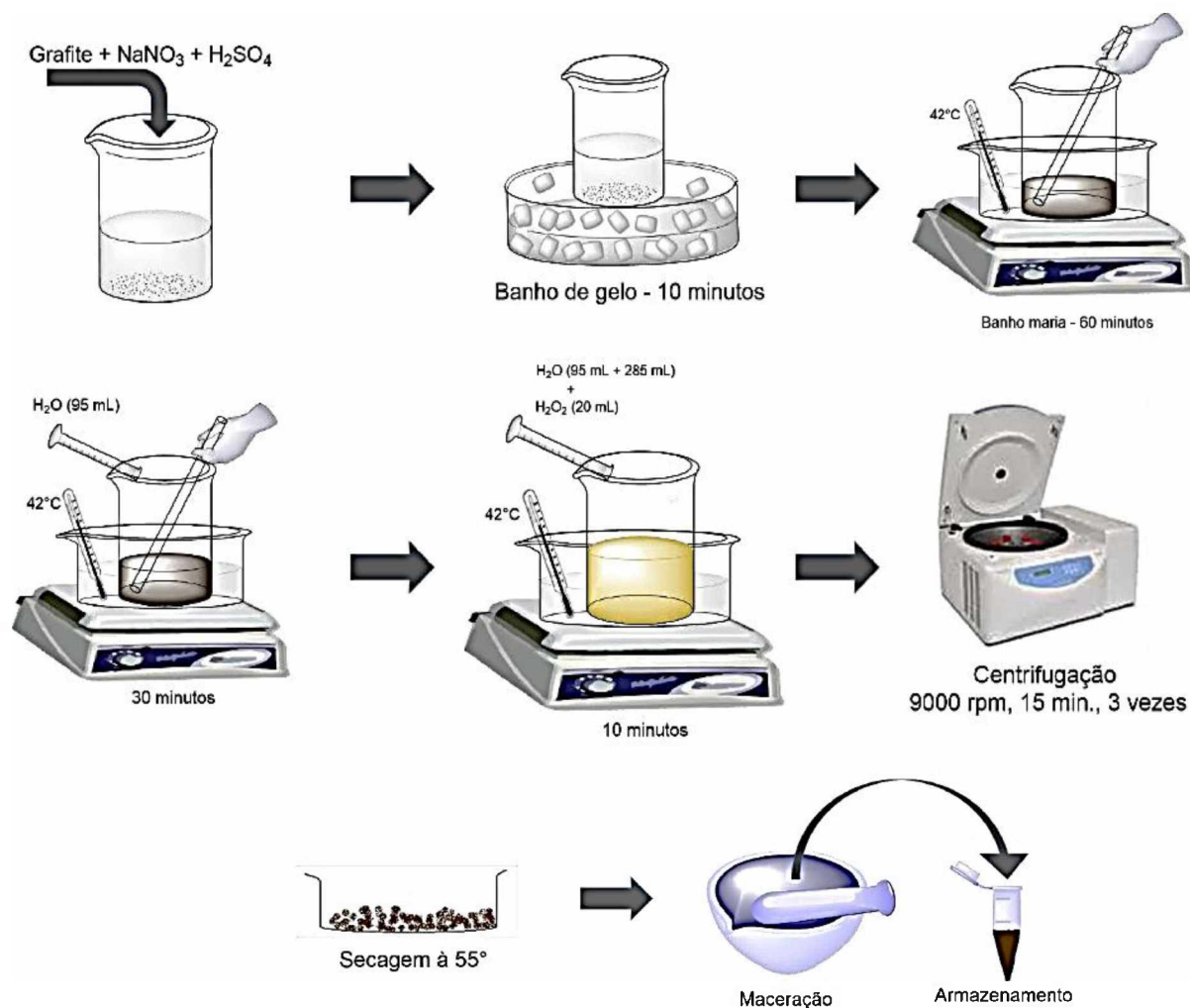
Para o preparo das nanopartículas de ouro, após a limpeza das vidrarias as mesmas e a barra de agitação magnética foram siliconizadas com SigmaCote® para evitar a nucleação indesejada durante a síntese, bem como agregação de soluções coloidais de ouro na superfície irregular do vidro. Após 24 horas as vidrarias siliconadas foram lavadas sucessivas vezes com água deionizada e dessa forma poderiam ser usadas sempre que necessário.

3.3. Metodologias

3.3.1. Síntese do óxido de grafeno(OG)

O óxido de grafeno utilizado neste trabalho foi obtido a partir da metodologia de Hummers (HUMMERS; OFFERMAN, 1958) com pequenas modificações descritas por SILVA, 2017. Em um béquer adicionou-se 50 mL de ácido sulfúrico P.A., 2 gramas de grafite e 2 g de nitrato de sódio. Submeteu-se a mistura à resfriamento em banho de gelo, em seguida, adicionou-se 6 g de permanganato de potássio (KMnO_4). Uma leve agitação e depois repouso de 10 min. em banho de gelo. Transferiu-se a mistura para banho-maria a 42 °C e agitou-se por 1 hora (nos primeiros 30 min., formou-se uma pasta marrom). Após esse tempo, adicionou-se 95 mL de água deionizada e o sistema foi agitado por mais 30 min. Adicionou-se 285 mL de água deionizada, 20 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (30%) e agitou-se o sistema por 10 min. Resfriou-se à temperatura ambiente e centrifugou-se numa rotação de 9000 rpm por 15 min. por 3 vezes. Em seguida, lavou-se com água deionizada e a secagem foi feita em forno a 55 °C por 3 dias.(Figura 10)

Figura 10: Representação esquemática da metodologia empregada para a síntese do óxido de grafite.



Fonte: SILVA, 2017.

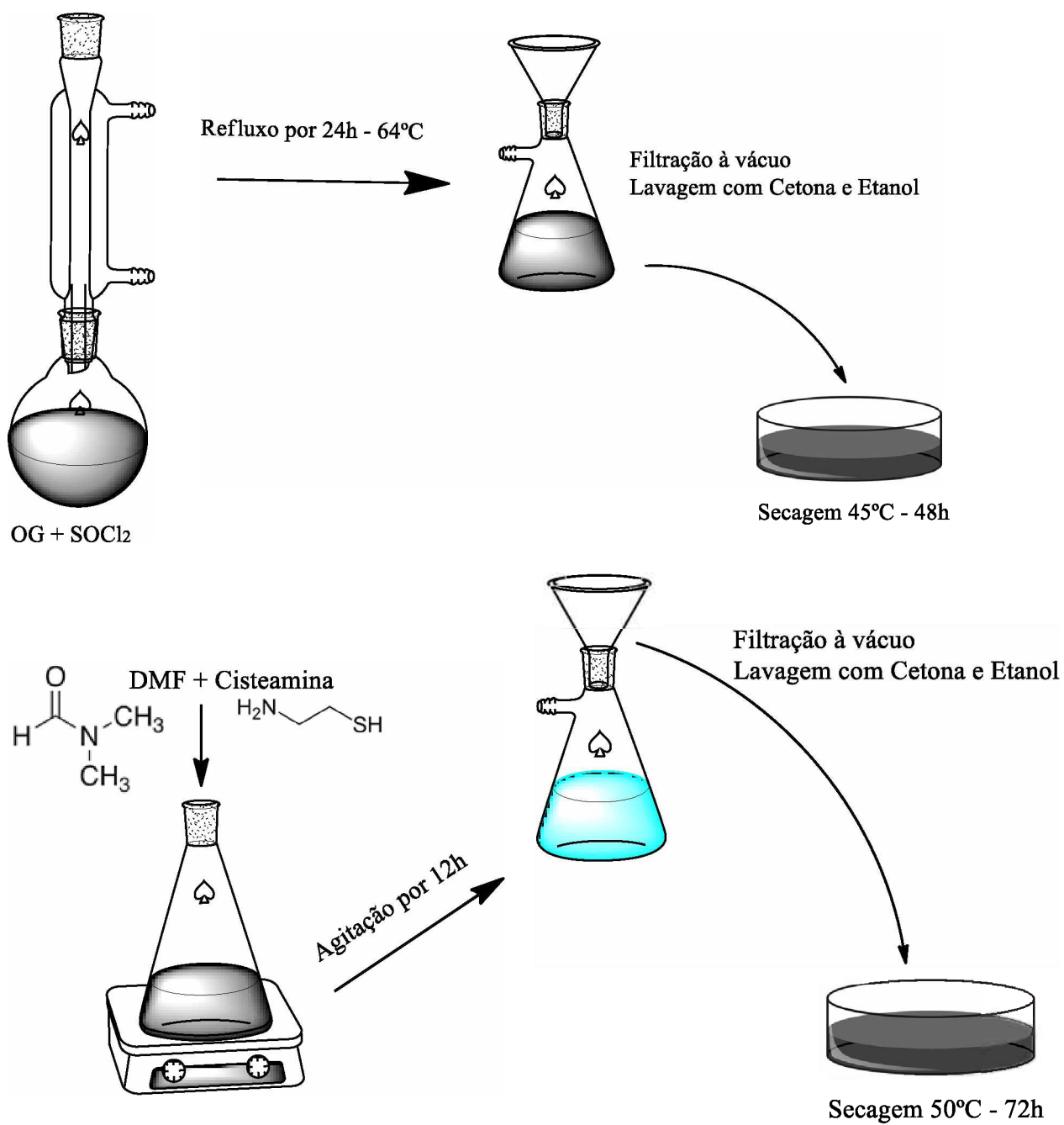
3.3.2. Funcionalização do óxido de grafeno com cisteamina (OGcis e OGcis*)

3.3.2.1. Metodologia com cloreto de tionila (OGcis):

Misturou-se 0,1012 g do óxido de grafeno com 22,5 ml de cloreto de tionila e manteve-se em refluxo por 24h a 64 °C. Posteriormente, filtrou-se a vácuo e lavou-se com 20 ml de cetona e 20 ml de etanol seguido de secagem a 55 °C por 48 h. Em seguida o material obtido foi transferido para um erlenmeyer, seguido de adição de 20 ml de DMF e 30 mg de cisteamina, manteve-se em agitação por 12 h. Filtrou-se a vácuo e a mistura foi lavada com

com 20 ml de cetona e 20 ml de etanol. Para secagem o material funcionalizado foi mantido a 50 °C por 72 h e depois armazenado. (KUMAR; *et al.* 2009) (figura 11)

Figura 11: Esquema da rota sintética para formação do OGCis a partir do OG.

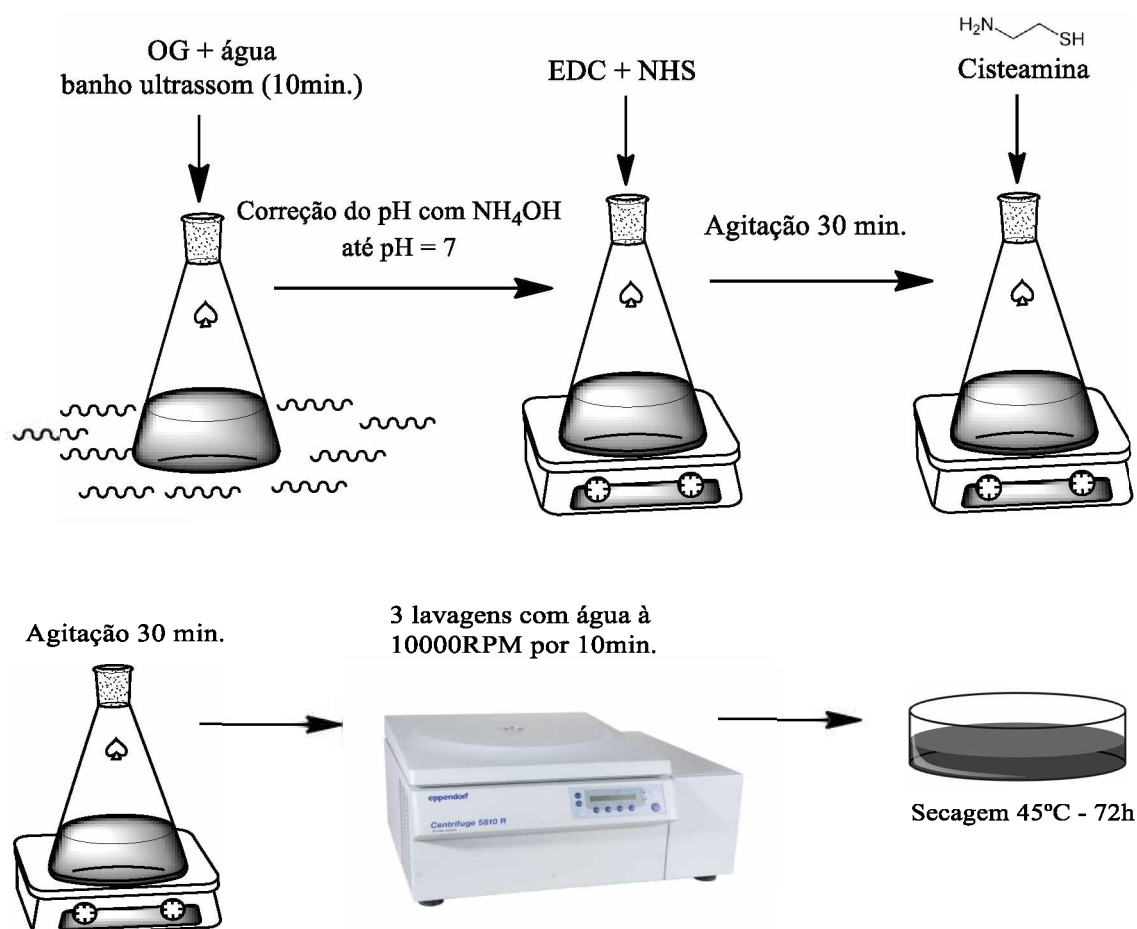


Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

3.3.2.2. Metodologia utilizando EDC/NHS (OGcis*):

Dispersou-se no sonicador por cerca de 10 minutos, 0,02514g de óxido de grafeno em 25 ml de água deionizada. O pH foi ajustado para 7 utilizando hidróxido de amônio (NH_4OH) com 5 adições de 5 μL , o pH neutro permite a melhor performance do EDC. Em seguida, adicionou-se a solução, 0,03272g de NHS e 0,05124 g de EDC, deixou-se o sistema sob agitação por 30 minutos para que a carbonila fosse devidamente ativada. Após essa etapa, adicionou-se 0,025g de cisteamina à solução e deixou-se agitando por mais 30 minutos para garantir a funcionalização do óxido de grafeno. Para a lavagem, a solução foi transferida para um tubo falcon e centrifugou-se por 10min à 10 000 RPM por 3 vezes, sempre retirando o sobrenadante delicadamente e completando o tubo com água. Em seguida, o OGcis* foi seco em forno a 45 °C por 72 h , seguido de armazenamento. (Figura 12)

Figura 12: Esquema da rota sintética para formação do OGcis* a partir do OG.



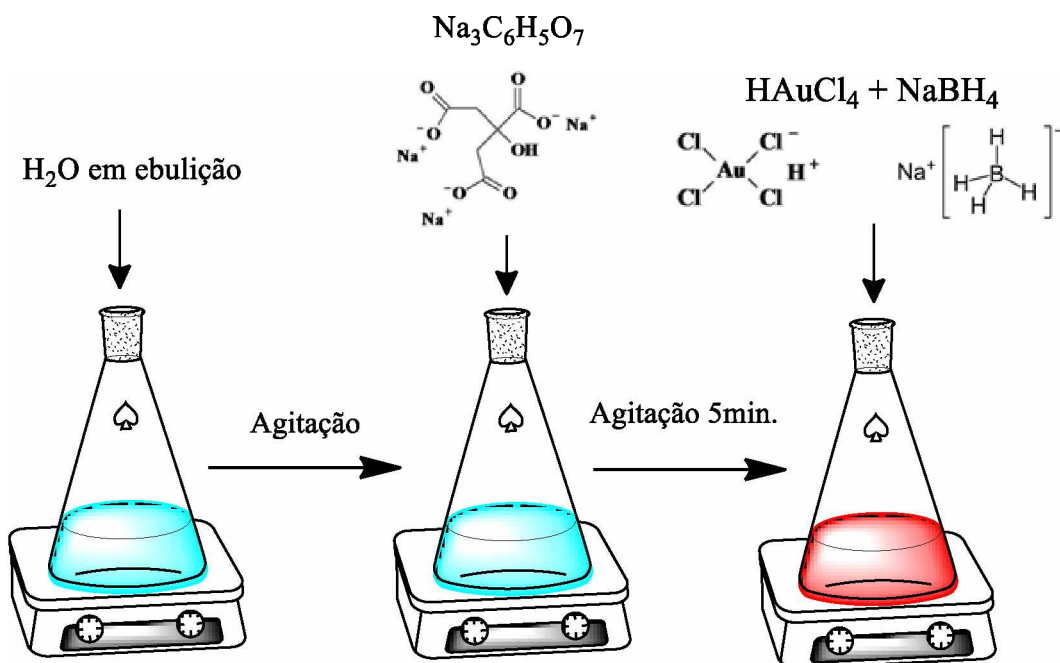
Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

3.3.3. Síntese das nanopartículas de ouro (NP_{Au})

Primeiramente, todas as vidrarias utilizadas no processo foram siliconizadas com SigmaCote® (organopolissiloxano clorado em heptano) e as soluções foram filtradas, para evitar contaminações e perda de material. Em um erlemeyer ferveu-se 50 ml de água deionizada e, em agitação, mantendo-se a temperatura próxima a de ebulição da água, adicionou-se ao erlemeyer 3,75 ml de citrato de sódio (1 g de citrato de sódio diluído em 100 ml de água). Após cerca de 5 minutos, adicionou-se 1,25 ml de ácido tetracloroáurico 1% (v/v) à solução. Em seguida, adicionou-se ao erlemeyer 0,5 ml de boroidreto de sódio 0,05 mol. L⁻¹. Após cerca de 25 min em aquecimento e agitação, observou-se a coloração vermelho alaranjada indicando formação de nanopartículas de ouro (Figura 13). (TURKEVICH; 1953 e FRENS; 1972)

É importante ressaltar que o boroidreto de sódio é um agente redutor forte, que promove a redução do óxido de grafeno a óxido de grafeno reduzido, além disso, os íons boroidreto podem também adsorverem nas NpAu juntamente com os íons citrato que adsorvem primeiro na NpAu, ambos criando forças repulsivas capazes de estabilizar a solução coloidal (MELO JR. et. al., 2012)

Figura 13: Esquema da rota sintética para formação das nanopartículas de ouro.



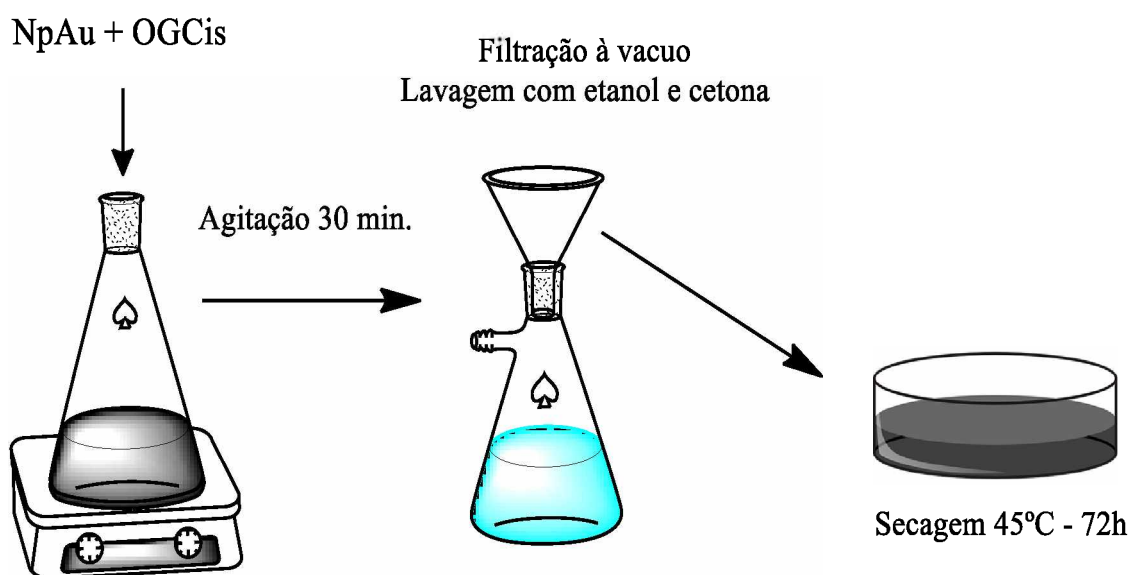
Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

3.3.4. Modificação do óxido de grafeno funcionalizado

A última etapa consistiu-se na dispersão do óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina em 10 ml de etanol deixados em sonicação por 2 minutos. Essa solução foi adicionada à suspensão de nanopartículas de ouro, recém preparadas e mantidas sob agitação por 30 min.

Para o OGrNpAu formado a partir do OGCis, a solução foi filtrada e lavada com 20 ml de cetona e 20 ml de etanol. Manteve-se o óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro em forno a 45 °C por 72 h , seguido de armazenamento(Figura 14).

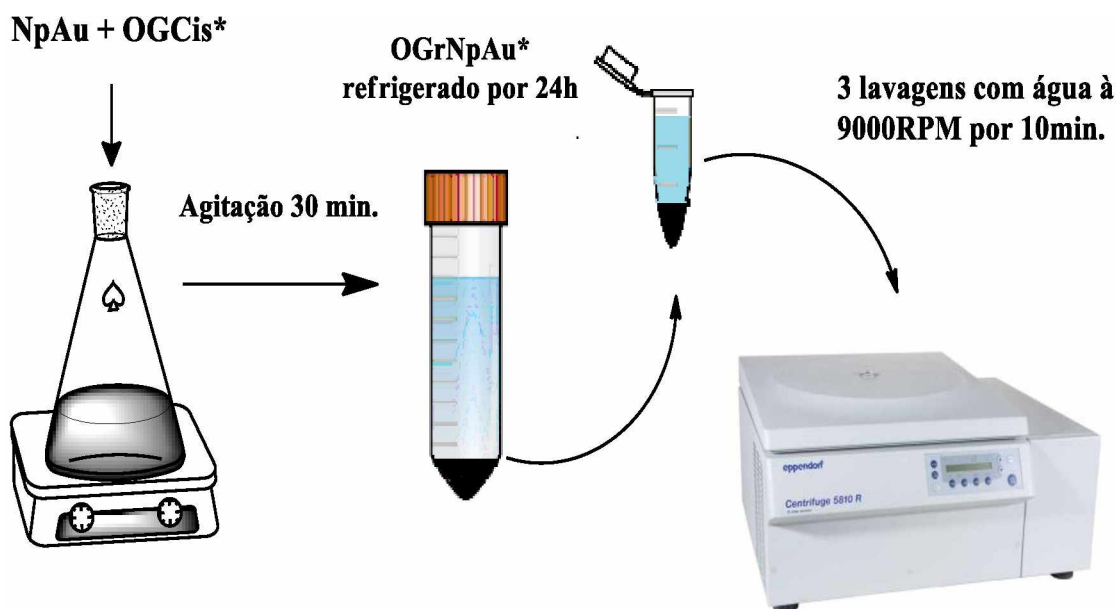
Figura 14: Esquema da rota sintética para formação do OGrNpAu a partir do OGCis.



Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

Para o OGrNpAu* formado a partir do OGCis*, a solução foi armazenada por 24 horas na geladeira em tubos falcon para a decantação do nanomaterial, o sobrenatante foi retirado e colocou-se o precipitado em um *eppendorf* para a lavagem. Para esta etapa completou-se o *eppendorf* com água deionizada e centrifugou-se por 10 min à 9 000 RPM por 3 vezes, sempre retirando o sobrenadante delicadamente e completando o *eppendorf* com água. Em seguida, o *eppendorf* com o OGrNpAu* foi colocado no forno a 45 °C por 72 h para secar e depois foi armazenado (Figura 15).

Figura 15: Esquema da rota sintética para formação do OGrNpAu* a partir do OGCis*.



Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

3.3.5. Caracterização dos nanomateriais

Para caracterizar os materiais sintetizados por ambas as rotas, utilizou-se o infravermelho e a microscopia de força atômica, além da técnica eletroquímica usando voltametria cíclica.

Análises por infravermelho foram realizadas para verificar as modificações químicas ocorridas no processo de oxidação do grafite e subsequente redução do óxido de grafeno. Os espectros foram registrados na região de 4500 a 400 cm^{-1} utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu Prestige-21 (o material a ser analisado foi prensado em pastilha de KBr a 1%) pertencente ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia; e Frontier Single Range – MIR- PerkinElmer (análise direta da amostra, feitas com a utilização do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) pertencente ao Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia. As bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos presentes nas amostras. Previamente às medidas, o material foi mantido sob vácuo por 24 horas.

A espessura do óxido de grafeno foi verificada através de microscopia de força atômica utilizando um equipamento da Shimadzu, modelo SPM 9600. Para este procedimento foi preparada uma solução aquosa do OG, OGrNpAu, OGrNpAu* (1 mg.mL^{-1}) e colocada sob ultrassom por 2 horas. Uma gota do sobrenadante foi gotejada em mica recém clivada e seca com nitrogênio ultrapuro.

3.3.6. Preparação dos eletrodos de grafite

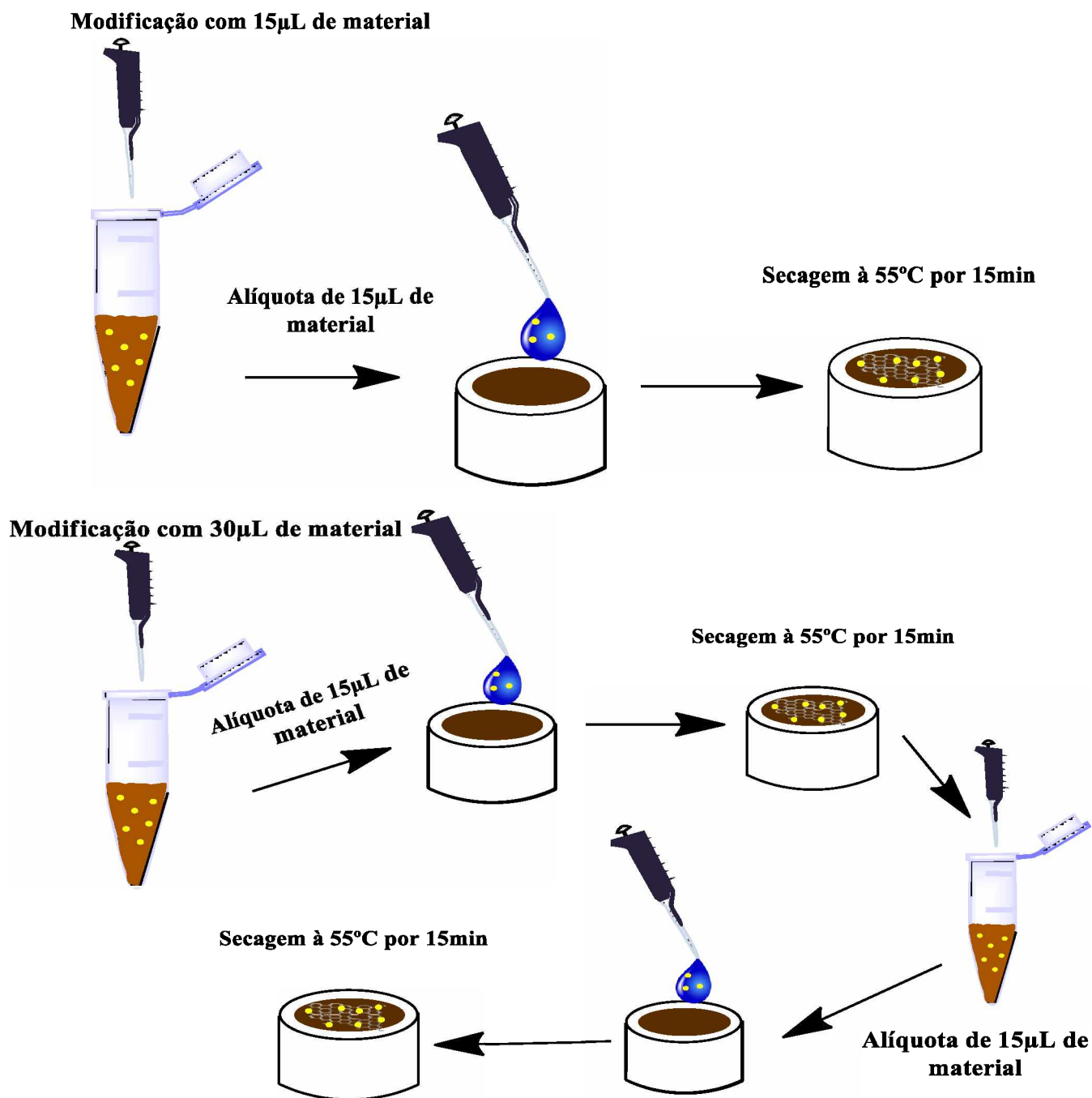
Os eletrodos de trabalho utilizados foram eletrodos de grafite (EG) fabricados artesanalmente no laboratório utilizando discos de grafite puro (99,9995% de pureza) de 6 mm de diâmetro como eletrodos de trabalho, colados sobre latão com cola de prata e envoltos por uma base de teflon. Os espaços entre a base e o sistema grafite/latão foram preenchidos com cola epóxi. Em seguida, um polimento do eletrodo foi realizado em lixas d'água com granulação de 400 cm^{-2} e 1500 cm^{-2} , para nivelar a superfície do grafite. Posteriormente, utilizou-se uma suspensão aquosa de alumina $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ sobre feltro para um polimento mais fino. Para a remoção da alumina, os eletrodos foram sonicados por 10 minutos em água deionizada.

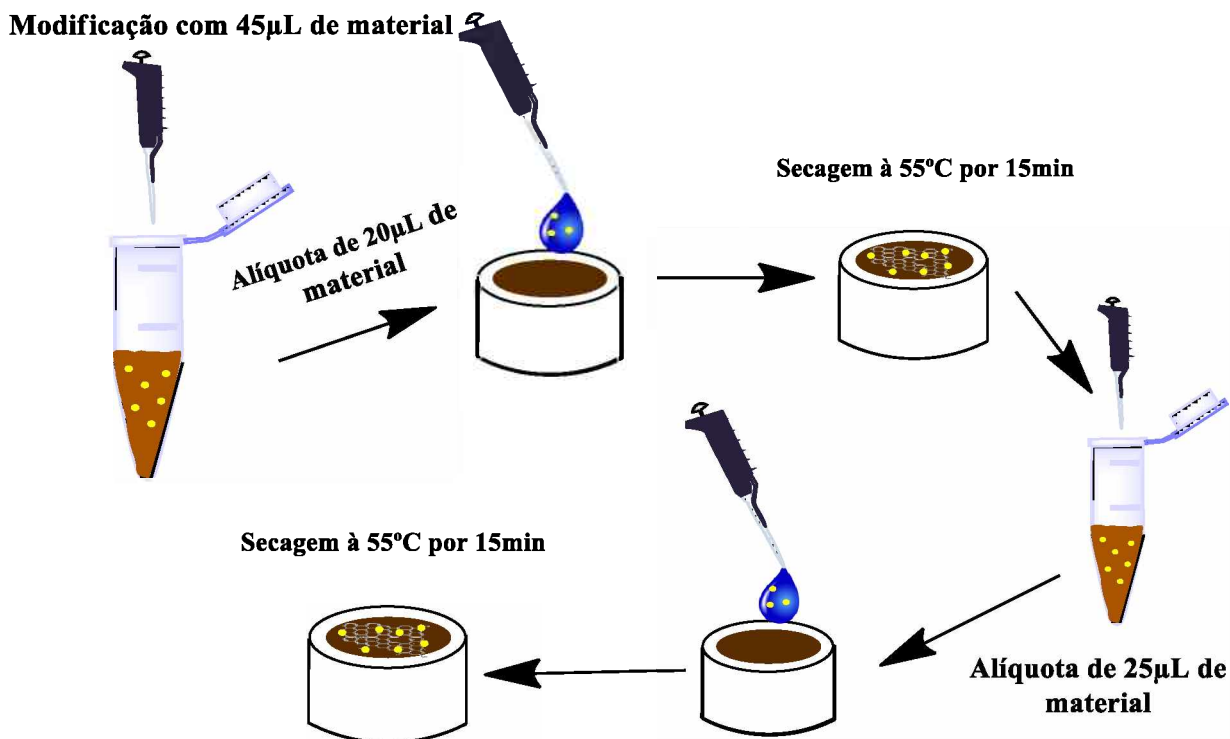
Após o polimento, o eletrodo de grafite foi submetido a uma voltametria cíclica com potencial elétrico entre $+0 \text{ V}$ a $+1,2 \text{ V}$ e $v = 50 \text{ mV. s}^{-1}$ em solução de ácido perclórico $0,50 \text{ mol.L}^{-1}$, visando a redução de óxidos na superfície do grafite, de maneira a renovar e limpar a mesma, além de padronizar e controlar a qualidade dos eletrodos.

3.3.7. Modificação dos eletrodos de grafite com o nanomaterial

As soluções foram previamente sonicadas para garantir a dispersão do material e o processo de gotejamento aconteceu como representado na Figura 16.

Figura 16: esquema de gotejamento no EG.





Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

3.3.8. Caracterização dos eletrodos modificados com sonda aniônica (ferro/ferricianeto de potássio):

EG/OGrNpAu foi caracterizado por voltametria cíclica (VC), faixa de potencial -0,3 V a 0,7 V, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, usando sonda aniônica de ferro/ferricianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6].3\text{H}_2\text{O}$, 5 mmol.L^{-1} , contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl).

Foram testadas diferentes concentrações de OGrNpAu, utilizando alíquotas de 15µL, 30 µL e 45 µL de uma solução aquosa do nanocompósito, 1mg/mL.

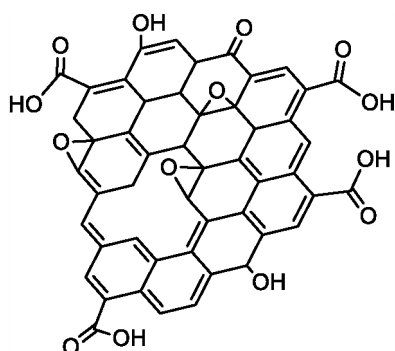
3.3.9. Interação com a sonda NM1, imobilização e detecção:

Gotejou-se 15 µL e 30µL de OGrNpAu no EG. Em seguida, para a imobilização da sonda por adsorção física gotejou-se 18 µL da sonda de oligonucleotídeo (NM1) sobre os eletrodos modificados, deixou-se 15 minutos no vácuo, e 15 minutos na estufa à 37°C. A superfície foi, então, lavada com tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0). A detecção foi realizada por voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato Na detecção foi monitorado os picos de oxidação da guanosina e adenosina.

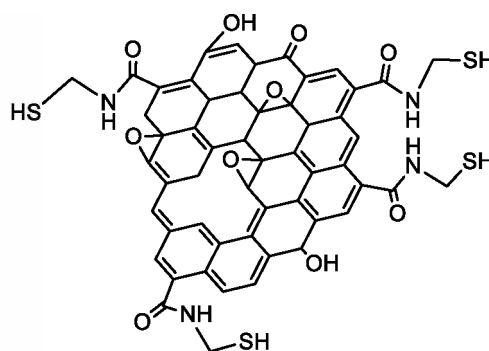
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

É possível ter uma ideia das estruturas moleculares dos compostos sintetizados (Figura 17) com base em estudos feitos, como em LERF et al., 1998 e DIAS, 2015. Que possibilitam uma noção de como os grupos contendo oxigênio estão conformados na folha de grafeno, formando o óxido de grafeno. Além de onde ocorre a funcionalização com a cisteamina e posteriormente quando em um material reduzido, a decoração com nanopartículas de ouro, que possuem afinidade com o enxofre, ficando assim, preferencialmente ligadas nesse elemento.

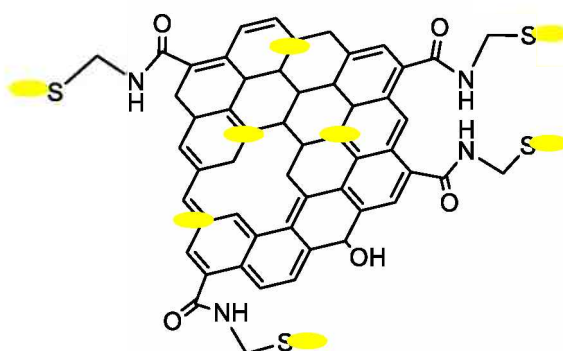
Figura 17: Estrutura química esperada do óxido de grafeno, óxido de grafeno funcionalizado com cisteamina, e óxido de grafeno reduzido decorado com nanopartículas de ouro.



Óxido de Grafeno (OG)



OG funcionalizado com cisteamina



OG reduzido e decorado com nanopartículas de ouro

Fonte: o autor (construído no programa ChemDraw®)

4.1. Caracterização por técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

A partir da previsão das estruturas dos compostos sintetizados, espera-se algumas vibrações de determinadas ligações. Essas vibrações podem ser observadas por meio da espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Para isso a Tabela 2 demonstra algumas atribuições para as bandas de interesse que talvez sejam observadas nos espectros infravermelho dos compostos sintetizados.

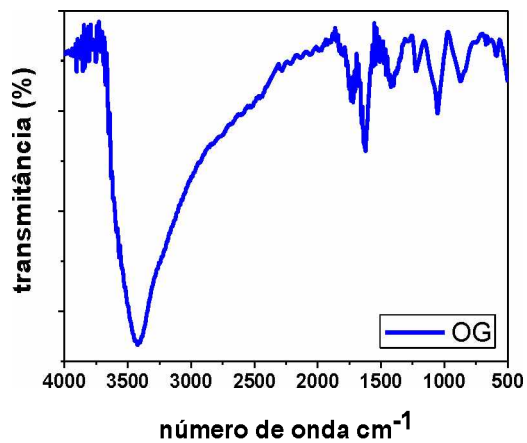
Tabela 2: Atribuições para os estiramentos de interesse para os compostos OG, OGcis, OGcis*, OGrNpAu, e OGrNpAu*.

Atribuição	Frequência (cm ⁻¹)	Referência
vN-H	3.500 – 3.070	MORAIS, 2016
vO-H	3600 - 3200	MORAIS, 2016
vC-S-H	2240-2260	MORAIS, 2016
vC=O	1760 – 1.710(ac. Carboxílico); 1750 – 1740 (ésteres); 1740 – 1720 (aldeídos); 1720 – 1700 (cetonas); 1700 – 1630 (amidas)	MORAIS, 2016
v(C=C) _{anel}	1600, 1580, 1500 e 1450	MORAIS, 2016
vC-N	1340 - 1250	MORAIS, 2016
vC-O	1420 e 1300 – 1200 (ac. Carboxílico); 1300 – 1050 (éster); 1200- 1050 (alcool e fenol) e 1045	MORAIS, 2016
ω(C=C) _{anel}	900 - 675	MORAIS, 2016

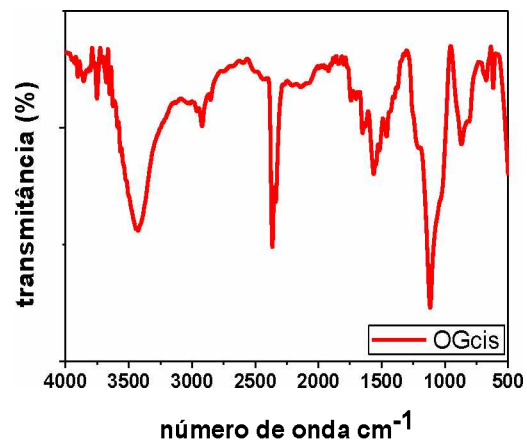
Com o objetivo de caracterizar os compostos sintetizados, foi feita a espectroscopia no infravermelho dos compostos OG, OGcis, OGcis*, OGrNpAu, e OGrNpAu* e os espectros obtidos estão representados nas figuras 18 e 19.

Figura 18 : FT-IR obtidos em pastilha de KBr para A) OG , B) OGcis, C) OGrNpAu ; e D) sobreposição de C, B e A .

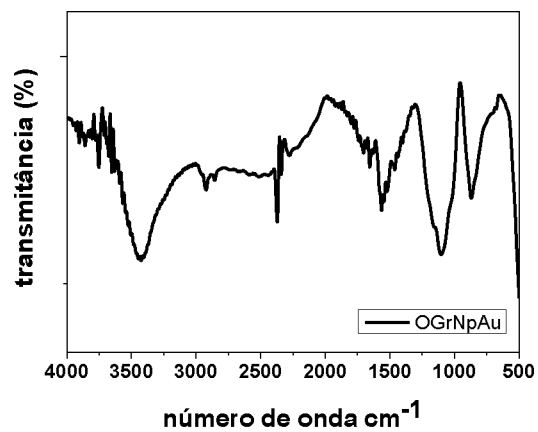
A)



B)



C)



D)

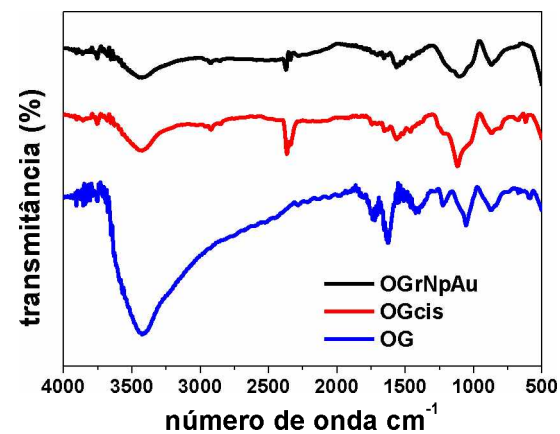
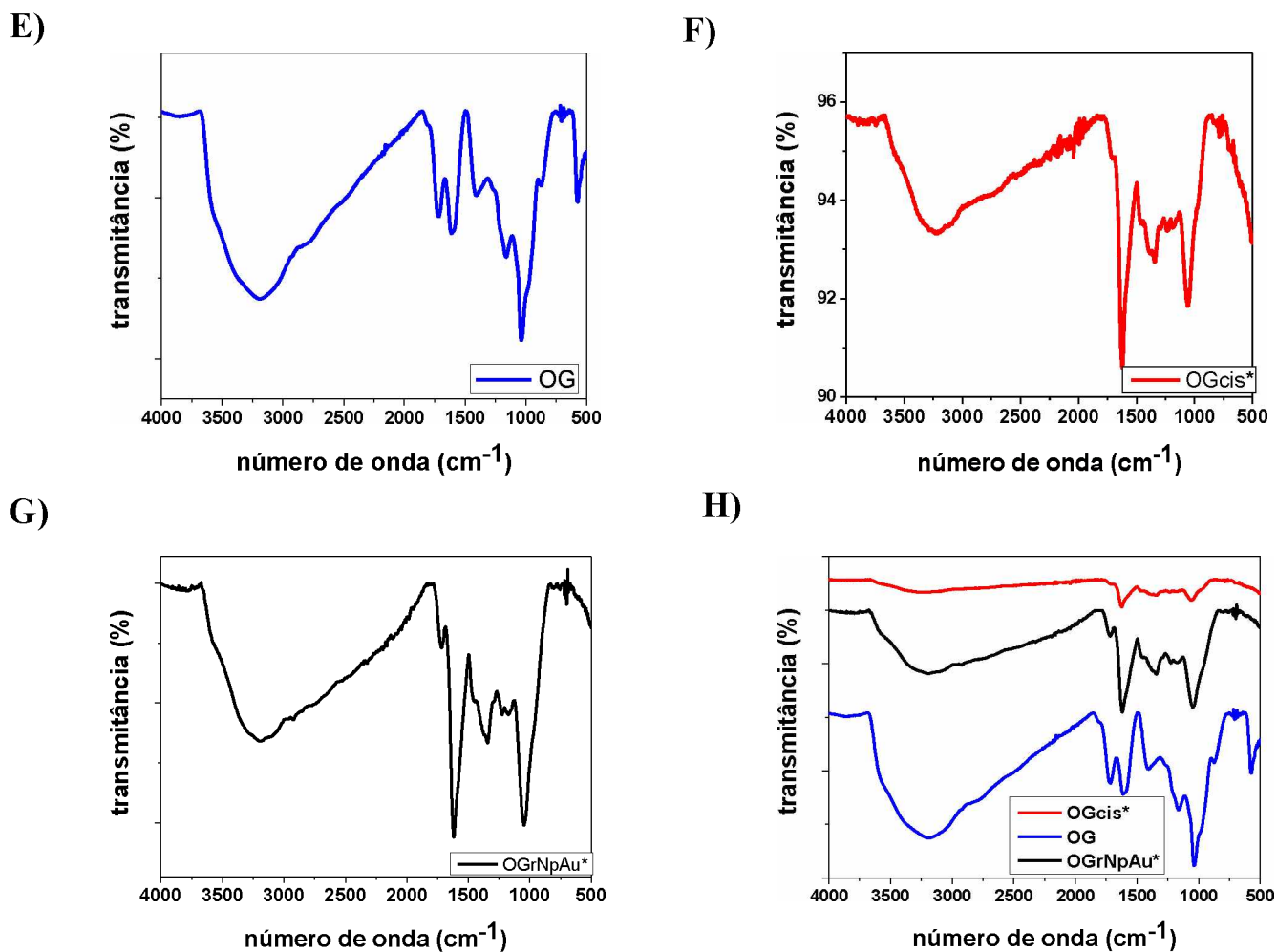


Figura 19 : ATR-FTIR para para E) OG; F) OGcis* ; G) OGrNpAu*; e H) sobreposição de F, G e E.



Com base nas atribuições da Tabela 2 foi possível interpretar os espectros no infravermelho dos compostos sintetizados, atribuindo algumas bandas de interesse. Os números de onda ou frequência (cm⁻¹) com suas devidas atribuições estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3 : Frequências (cm^{-1}) correspondentes às principais bandas dos compostos sintetizados e atribuições do espectro infravermelho.

Atribuição	OG (figura 18)	OG (figura 19)	OGcis	OGcis*	OGrNpAu	OGrNpAu*
vN-H	-	-	-	3207	-	3207
vO-H	3420	3194	3429	3127	3419	3197
vC-S	-	-	2352	-	2371	-
vC=O	1746	1712	1554	1628	1574	1725
v(C=C)_{anel}	1631	1607	-	-	-	1618
	1410	1406				
vC-N	-	-	-	1342	-	1347
vC-O	1238	1163	1122	1056	1093	1038
	1045	1036				
ω(C=C)_{anel}	877	580	843	-	863	-

Observando as Figuras 18 e 19 e a Tabela 3, é possível analisar as bandas de vibração dos compostos em questão. Para o OG, apesar de ter sido exatamente o mesmo composto usado para os dois espectros, a análise foi realizada em dias diferentes e em aparelhos diferentes, foi observado que os valores de frequência variaram um pouco. Contudo, ambos espectros apresentaram as bandas esperadas, na região de $3600 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ atribuída à deformação axial de O-H indicando a presença desse tipo de ligação na superfície da folha de grafeno, apresenta também um pico de absorção na região de 1700 cm^{-1} referente à deformação axial de C=O, duas bandas na região de $1600\text{-}1580, 1500\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$ referentes à deformação axial de anel C=C, duas bandas na região de $1400 - 1050 \text{ cm}^{-1}$ referente à deformação axial C-O, e deformação angular fora do plano C=C de anel na região de $900 - 675 \text{ cm}^{-1}$ (MORAIS, 2016 e SILVA, 2017).

O espectro do OGcis e OGcis*, como esperado, observou-se as bandas do OG e devido adição de cisteamina no composto, esperava-se observar outras bandas no espectro.

Essas bandas adicionais seriam da deformação axial N-H comumente observados em três picos em 3560, 3460 e 3400 cm^{-1} , referente ao grupo funcional amida, e deformação axial C-S-H na região de 2240-2260 cm^{-1} . Dessa forma, foi possível observar nos espectros de OGcis e OGcis* apenas o pico na região de 3207 cm^{-1} referente a deformação axial N-H, os outros picos não foram observados provavelmente por causa da larga e evidente banda da deformação axial O-H que pode ter acobertado os outros picos que deseja-se observar. Contudo, apenas no espectro do OGcis foi observada a banda de deformação axial C-S-H em 2352 cm^{-1} (MORAIS, 2016 e SILVA, 2017).

Para os compostos OGrNpAu e OGrNpAu* observou-se as mesmas bandas do OG, pois apesar de ter ocorrido a redução do OG, não são eliminados todos os grupos contendo oxigênio (SILVA, 2017). Além disso, a incorporação das NpAu não pode ser identificada de forma direta pelo espectro do infravermelho, sendo assim, um espectro muito similar do composto OGcis e OGcis*. As NpAu tendem a ficar próximas aos grupos provenientes da cisteamina, por ter maior afinidade para ligar nesse composto. Provavelmente devido a isso, o composto do OGrNpAu* não apresentou a banda da deformação axial C-S-H, e o composto OGrNpAu não apresentou a banda referente à deformação axial N-H. Por outro lado, o composto OGrNpAu apresentou a banda de deformação axial C-S na região de 3371 cm^{-1} e o OGrNpAu* apresentou a banda de deformação axial N-H na região de 3207 cm^{-1} .

O fato do não aparecimento de algumas bandas esperadas, não significa que as sínteses não ocorreram como o esperado, que o OGcis e o OGcis* são compostos diferentes, assim como OGrNpAu e OGrNpAu*. Apenas significa que outras técnicas de caracterização são necessárias para esclarecer um pouco mais sobre esses compostos. Todavia, não se pode negar o fato de que é curioso algumas bandas apresentarem valores tão diferentes umas das outras sendo supostamente o mesmo composto.

4.2. Caracterização por microscopia de força atômica

Após realizar a espectroscopia na região do infravermelho foi possível atribuir algumas bandas importantes dos compostos, ao mesmo tempo que surgiram algumas dúvidas pelo não aparecimento de outras bandas que se esperava aparecer. A microscopia de força atômica não vai poder explicar muito sobre esse fato de não aparecimento de bandas nos espectros, por outro lado, vai poder dar uma noção de rugosidade dos materiais OG comparados com OGrNpAu e OGrNpAu*. As análises de AFM foram realizadas para os compostos OG, OGrNpAu* e OGrNpAu, e estão representadas nas figuras 20 e 21.

Figura 20: AFM do composto OG em superfície de mica recém clivada.

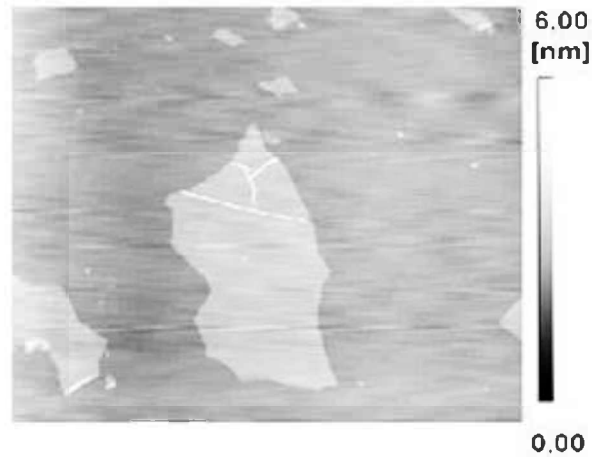
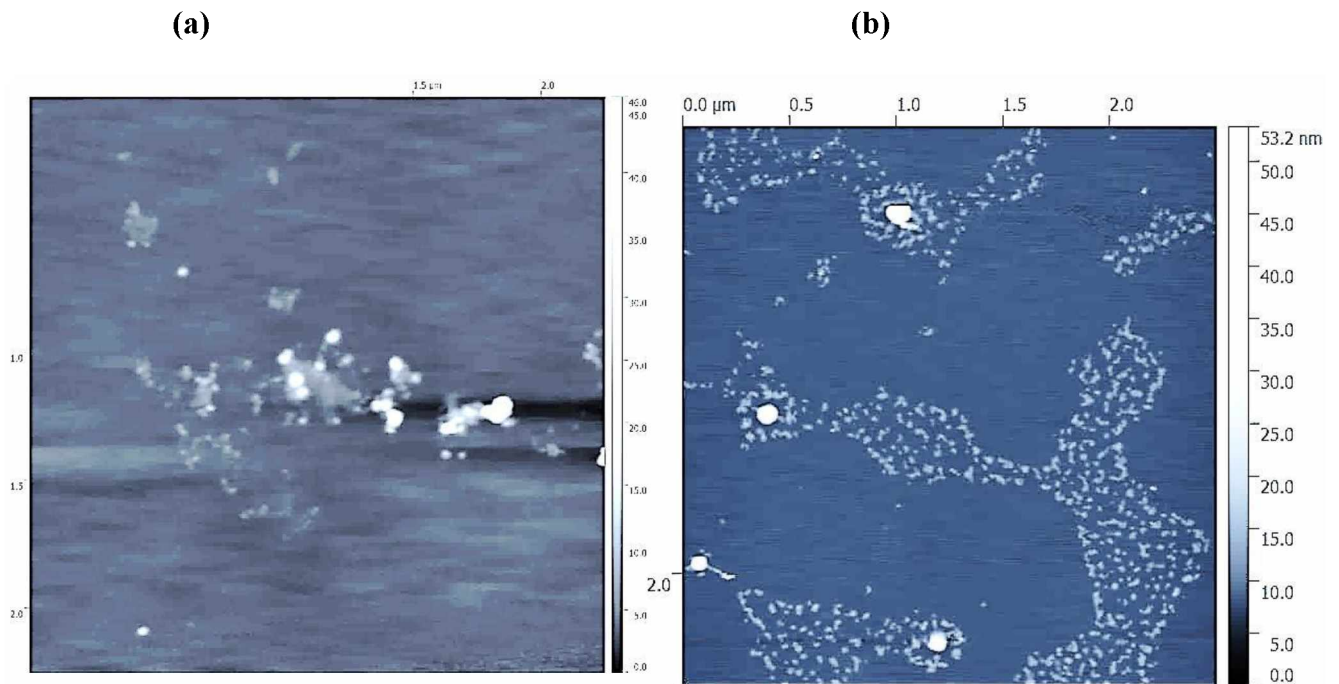


Figura 21: AFM dos compostos OGrNpAu (a) e OGrNpAu* (b) em superfície de mica recém clivada.



A Figura 20 mostra a imagem do AFM para o OG, os resultados mostram uma estrutura laminar com as extremidades irregulares. Observou-se algumas linhas com diferenciação de cores no meio da estrutura, indicando diferença na topologia. Isso ocorre devido à folha do óxido de grafeno possuir uma morfologia enrugada (SILVA, 2017).

A Figura 21 **(a)** indica que o OGCis foi funcionalizado com as nanopartículas, pois observou-se estruturas esféricas dispersas de forma irregular em toda a folha do OG. Verifica-se a diferenciação de cores em vários pontos da folha do OG, esses pontos referem a diferença na topografia da estrutura. A maior diferença entre os vales ou cores ocorre nas extremidades, isso pode ocorrer devido às carboxilas estarem localizadas nas extremidades do material. Além disso, pode-se verificar as nanopartículas no meio da folha do nanomaterial, isso pode ocorrer devido à utilização do citrato de sódio e principalmente do boroidreto de sódio como agentes redutores que podem promover a redução das nanopartículas sobre a superfície do OG. Na Figura 21 **(b)**, a topografia de OGrNpAu* é semelhante ao OGrNpAu. Neste caso, pode-se observar alguns pontos maiores no meio da folha do OGCis, isso pode ocorrer pois o EDC pode ativar além das carboxilas, grupos hidroxilas.

Comparando as imagens da Figura 21 com a imagem da Figura 20 é possível perceber que são materiais bem diferentes. Porém, assim como a espectroscopia no infravermelho, não dão certeza se o material OGrNpAu e OGrNpAu* são idênticos. Contudo, indicam que possuem uma topografia similar.

4.3. Estudo eletroquímico por voltametria cíclica

O objetivo da síntese do nanocompósito óxido de grafeno reduzido e decorado com nanopartículas de ouro é iniciar uma nova plataforma para construção de um biossensor, o início desses estudos acontece justamente com utilização de técnicas eletroquímicas. Nesse caso, foi realizada a voltametria cíclica de eletrodos sem modificação e com modificação, para mostrar como a presença do nanocompósito aumenta a área superficial do eletrodo. Esse estudo ocorreu com o OGrNpAu e OGrNpAu* em solução aquosa de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, numa faixa de potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $+0,7 \text{ V}$, a 50 mV s^{-1} vs (Ag/AgCl). Para isso gotejou-se o material nos eletrodos de grafite como descritos na parte experimental (item 3.3.7). Os voltamogramas obtidos estão representados nas Figuras 22 e 23.

Figura 22: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos descoberto (preto) e modificado com 30 μL de OGrNpAu (vermelho) em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .

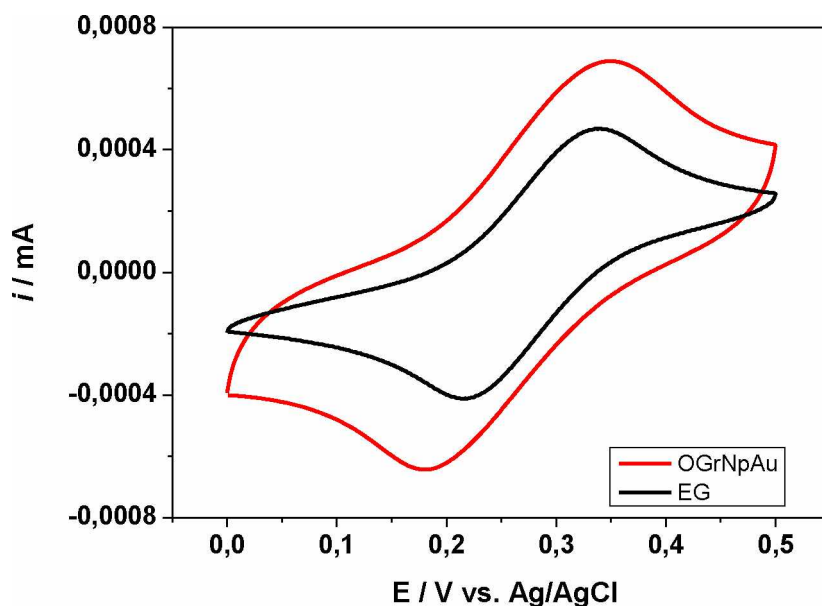
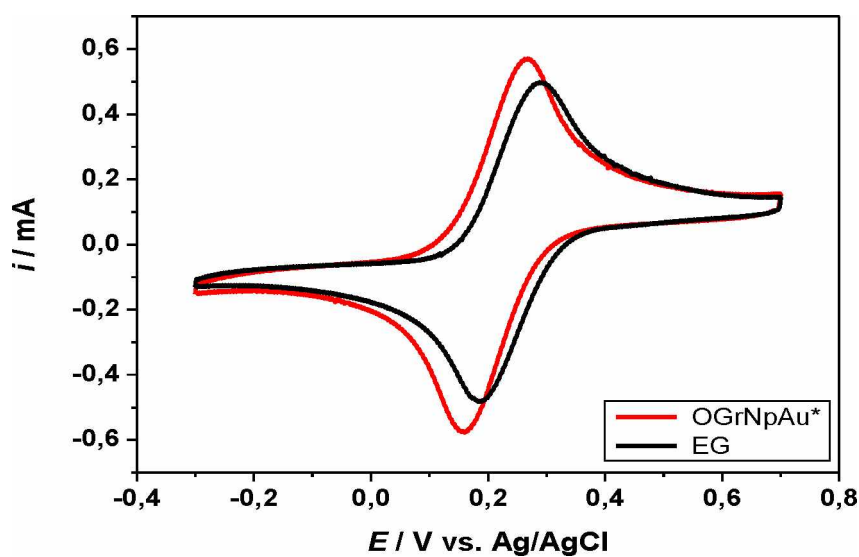


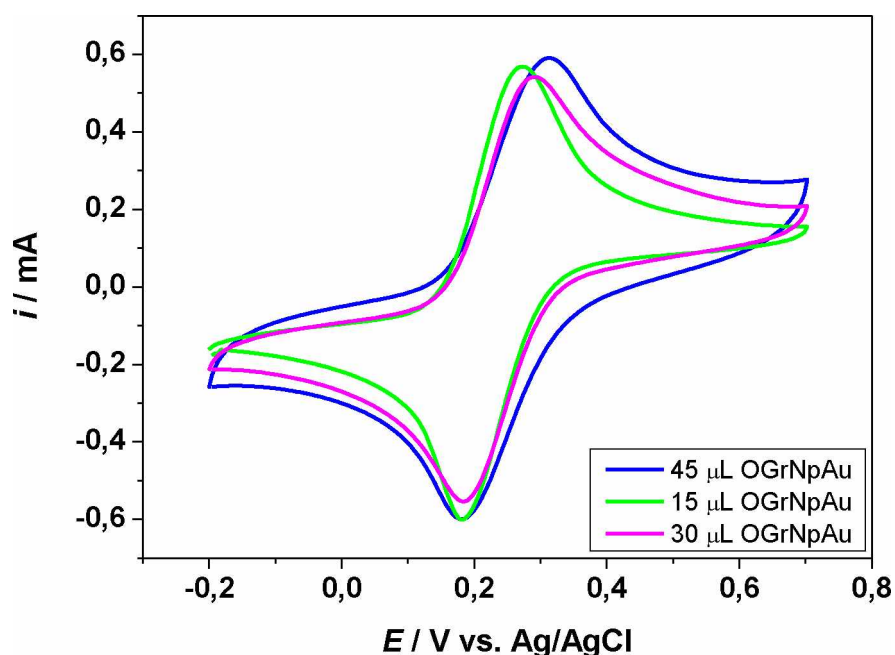
Figura 23: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos descoberto (preto) e modificado com 30 μL de OGrNpAu* (vermelho) em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 mV. s^{-1} .



Observou-se que nas Figuras 22 e 23, o OGrNpAu e OGrNpAu* apresentou uma melhora na condução de corrente quando comparados com o padrão (EG), uma vez que houve aumento nos valores de corrente facilitando a oxidação do íon Fe^{2+} . Isso pode estar relacionado à propriedade do material em favorecer a oxidação da sonda redox bem como no aumento da área superficial que o material promove na superfície do eletrodo.

Em seguida, foi realizada uma breve otimização da quantidade necessária desse material sobre a superfície do eletrodo. Os resultados foram monitorados por voltametria cíclica e de pulso diferencial. Os voltamogramas obtidos estão representados nas Figuras 24, 25 e 26.

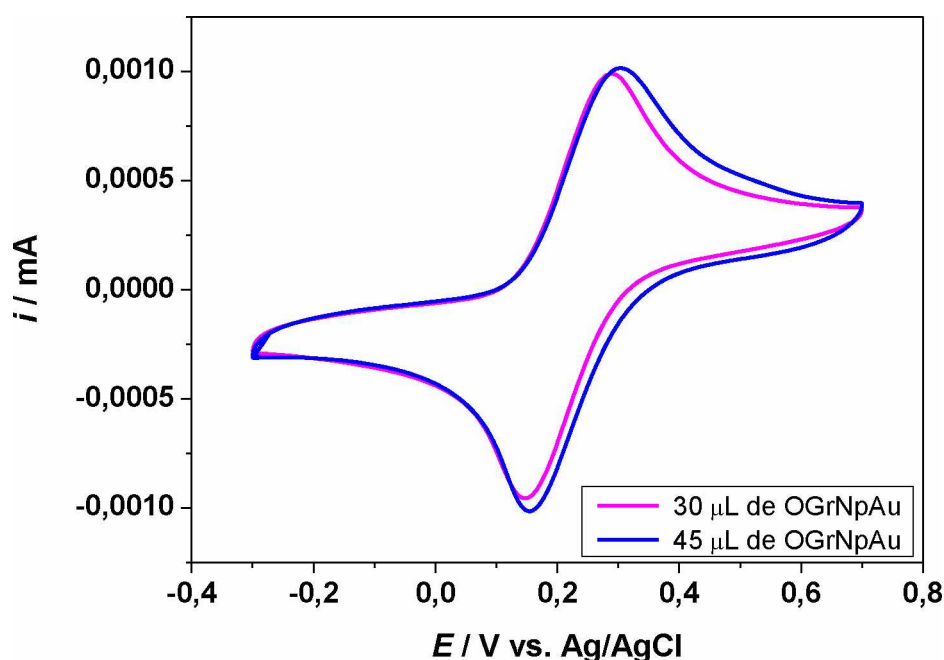
Figura 24: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com OGrNpAu (1mg/ml) 15 μL (verde), 30 μL (rosa) e 45 μL (azul) em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Os estudos na Figura 24, indicaram que o eletrodo de grafite modificado com 45 μL da dispersão de OGrNpAu obteve uma maior resistência quando comparado ao eletrodo de grafite modificado com 30 μL , isso porque o pico de oxidação ocorreu em potenciais maiores, e o pico de redução ocorreu em potenciais menores. Apesar disso, os eletrodos modificados

com 30 μL e 45 μL obtiveram uma resposta melhor das propriedades eletroquímicas da superfície de grafite frente ao par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ do que o eletrodo modificado com 15 μL de nanomaterial. A fim de observar com maior clareza qual concentração apresentaria maior atividade, repetiu-se o experimento para os volumes de 30 μL e 45 μL , sendo que o voltamograma obtido está representado na Figura 25.

Figura 25: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos modificados com OGrNpAu 30 μL (rosa), e 45 μL (azul); em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 5 mmol L^{-1} contendo 0,10 mol L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura 50 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Desta forma observou-se pela técnica de voltametria cíclica avaliando o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ que não foi significativa a diferença de aumento de corrente entre os volumes de 30 μL e 45 μL do material OGrNpAu (1mg/ml) gotejados nos eletrodos de grafite, gerando assim um sinal semelhante a de 45 μL porém com uma quantidade menor de material. Por isso, determinou-se que a concentração ótima entre 15 μL , 30 μL e 45 μL seria a de 30 μL .

4.4. Imobilização e detecção da sonda NM1

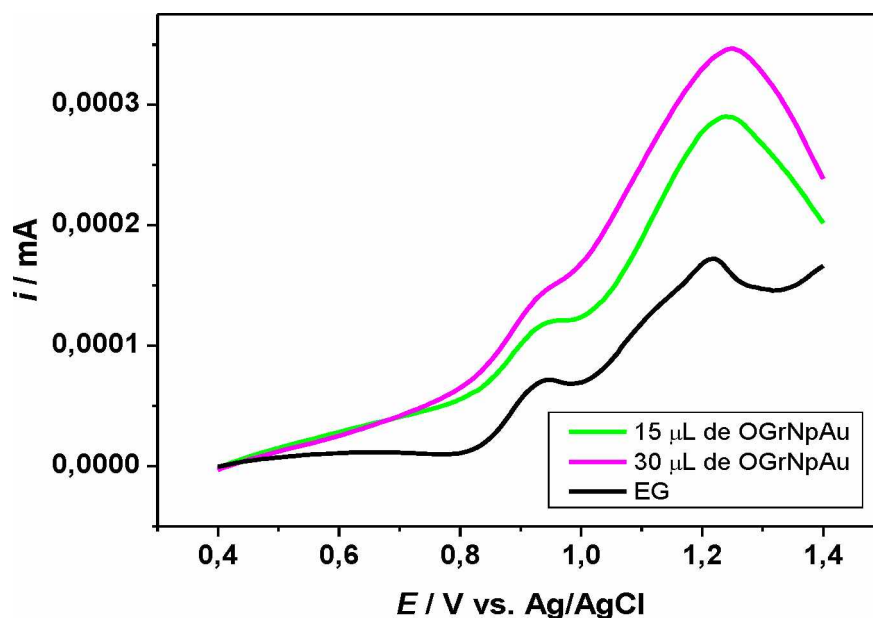
O grupo de pesquisa (Laboratório de Filmes Poliméricos - LAFIP), onde foi desenvolvido este trabalho, têm se dedicado a modificar quimicamente eletrodos, visando gerar um ambiente favorável para imobilização de biomoléculas. Os eletrodos modificados com sondas de DNA são genericamente, denominados biossensores de DNA ou genossensores (MIKKELSEN, 1996).

Os biossensores, são dispositivos analíticos que incorporam algum elemento biológico (TURNER, 2013), capazes de produzir sinais mensuráveis que se relacionem à concentração do analito de interesse (KIMMEL *et al.*, 2012). Os biossensores combinam um sistema de reconhecimento bioquímico a um transdutor, que converte esse evento de reconhecimento em um sinal mensurável (RAPP, GRUHL e LÄNGE, 2010). No caso dos dispositivos em que a reação envolve a transferência de elétrons, tem-se os biossensores eletroquímicos. Nestes, o transdutor converte a resposta do evento de reconhecimento biológico em um sinal elétrico (WANG, 2006b)

A detecção de sequências específicas de bases em ácidos nucléicos humanos, virais e bacterianos vem crescendo de importância no diagnóstico de doenças (MIKKELSEN, 1996). Sendo assim avaliou-se a imobilização de uma sonda de DNA tiolada a fim de verificar a melhor condição de recobrimento do eletrodo de grafite modificado com o nanocompósito (OGrNpAu). Além disso, esse experimento nos permitiu verificar a melhor condição para o desenvolvimento de um genossensor, já que a etapa de imobilização da sonda biológica é fundamental para o mesmo.

Desta forma, o eletrodo modificado com OGrNpAu foi sensibilizado com fragmentos específicos para a bactéria *Neisseria meningitidis* (NM1) 5'-TGTTGGGCAACCTGATTG-SH-3' ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e monitorado por voltametria de pulso diferencial. A Figura 26 mostra os voltamogramas de pulso diferencial para os EG e EG modificados com 15 e 30 μL OGrNpAu e sensibilizados com a sonda específica para meningite.

Figura 26: Voltamograma de pulso diferencial (subtraído) da imobilização da NM1 sobre os eletrodos modificados OGrNpAu 15 μL (verde), 30 μL (rosa), e do padrão OG (preto). Eletrólito: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH = 7,0; Amplitude = 70 mV, $V = 30 \text{ mV s}^{-1}$.



Pode-se observar (Figura 26) que a sonda NM1 foi imobilizada com eficiência sobre as superfícies EG e OGrNpAu. Foram identificados os picos de oxidação característicos da guanosina e adenosina em de +0,9V e +1,2V, respectivamente, em concordância com a literatura (LA-SCALEA; SERRANO e GUTZ; 1999) .

Os resultados mostraram ainda que o EG/OGrNpAu foi mais sensível para a imobilização do NM1, uma vez que apresentou maiores valores de corrente de oxidação das bases purínicas. Foi observado um aumento nos valores de corrente para o EG/OGrNpAu quando comparado ao grafite descoberto. Isso pode ocorrer devido ao aumento de área superficial que o nanomaterial promove sobre a superfície do grafite. Além disso, o grupo tiol presente na sonda do DNA pode promover uma interação mais efetiva com as nanopartículas de ouro distribuídas sobre a superfície do eletrodo de grafite, favorecendo a imobilização. Em adição, a superfície modificada com 30 μL e 40 μL do nanomaterial, foi mais sensível para incorporação da sonda, possivelmente devido ao aumento de área superficial.

5. Conclusão

O presente trabalho permitiu um novo caminho a ser considerado para síntese de compostos que necessitam promover ativação de carbonos de carbonila. As técnicas de caracterização utilizadas não foram suficientes para comprovar que ambas as rotas sintéticas resultaram em um mesmo produto final, existindo a possibilidade do OGrNpAu e OGrNpAu* não serem iguais, consequentemente OGrNpAu e OGrNpAu* também não. Porém os estudos eletroquímicos indicaram que OGrNpAu e OGrNpAu* são muito bons para a construção de um biossensor, já que quando a superfície dos eletrodos, aumentaram a área superficial do mesmo, melhoraram a transferência do par redox, comparado aos eletrodos sem modificação.

Além disso, foi possível imobilizar uma sonda de DNA *Neisseria meningitidis* de forma eficiente sobre o eletrodo modificado, por detecção direta sem a necessidade de um indicador, sendo observado um aumento nos valores de corrente para o EG/OGrNpAu quando comparado ao grafite descoberto.

O nanomaterial produzido e imobilizado sobre a superfície de grafite, mostrou-se promissor para o desenvolvimento de sensores com DNA aplicados ao diagnóstico de doenças, monitoramento de contaminantes ambientais e análise de alimentos.

6. Perspectivas

Outras técnicas de caracterização, como por exemplo a microscopia eletrônica de varredura, e a microscopia eletrônica de transmissão poderão ser realizadas para confirmar se OGrNpAu e OGrNpAu* são o mesmo composto, e consequentemente OGrNpAu e OGrNpAu*.

Além disso, seria interessante realizar o mesmo experimento de imobilização e detecção direta da sonda como foi feito com o OGrNpAu, mas com o OGrNpAu* e testar a performance deste sensor desenvolvido frente ao alvo específico (oligonucleotídeo alvo complementar) e em amostras reais, visando uma detecção mais sensível e com menor limite de detecção e quantificação, visto que os biossensores representam uma alternativa rápida e menos onerosa para detecção de compostos de interesse.

7. Referências

ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 132-145, 2010.

BAE, S.; KIM, H.; LEE, Y.; XU, X.; PARK, J. S.; ZHENG, Y.; BALAKRISHNAN, J.; LEI, T.; KIM, H. R.; SONG, Y. I.; KIM, Y. J.; KIM, K. S.; OZYILMAZ, B.; AHN, J. H.; HONG, B. H.; IJIMA, S. Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. **Nat. Nanotechnol.**, v. 5, n. 8, p. 574-8, 2010.

BALANDIN, A. A.; GHOSH, S.; BAO, W.; CALIZO, I.; TEWELDEBRHAN, D.; MIAO, F.; LAU, C. N. Superior thermal conductivity of single-layer graphene. **Nano Lett.**, v. 8, n. 3, p. 902-7, 2008.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. 1 ed. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, p., 27. 2007

BERGER, C.; SONG, Z.; LI, X.; WU, X.; BROWN, N.; NAUD, C.; MAYOU, D.; LI, T.; HASS, J.; MARCHENKOV, A. N.; CONRAD, E. H.; FIRST, P. N.; DE HEER, W. A. Electronic confinement and coherence in patterned epitaxial graphene. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1191-6, 2006.

BISSESSUR, R.; SCULLY, S. Intercalation of solid polymer electrolytes into graphite oxide. **Solid State Ion.**, v. 178, n. 11-12, p. 877-882, 2007.

BOLOTIN, K. I.; SIKES, K. J.; JIANG, Z.; KLIMA, M.; FUDENBERG, G.; HONE, J.; KIM, P.; STORMER, H. L. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. **Solid State Commun.**, v. 146, n. 9-10, p. 351-355, 2008.

BRODIE, B. C. On the Atomic Weight of Graphite. **Philos. Trans. R. Soc.**, v. 149, p. 249–259, 1859.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. v.1. 4ª ed. Editora Pearson Prentice Hall. São Paulo. 2006.

BUMBUDSANPHAROK, N.; KO, S. Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. **J. Food Sci.**, v. 80, n. 5, p. R910-R923, 2015.

CASTRO, A. C. H.; KOCHI, L. T. ; MADURRO, J. M. ; MADURRO, A. G. B. **Metodologia Para Construção De Dispositivo Óptico Para O Diagnóstico Da Hepatite B**. 2017, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020170117, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante (s): Ana Graci Brito-Madurro, Depósito: 02/06/2017

CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 9, n. 4, p. 357-367, 2015.

DAS, T. K.; PRUSTY, S. Graphene-Based Polymer Composites and Their Applications. **Polym. Plast. Technol. Eng.**, v. 52, n. 4, p. 319-331, 2013.

DIAS, L. M. Desenvolvimento de biossensor baseado no composto 3-HBA/NTC-NPAu-HRP como plataforma para detecção de peróxido de hidrogênio. Universidade Federal de Uberlândia - Monografia defendida no curso de Bacharelado em Biotecnologia, 2015.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1. p.137-142. 2006.

FRENS, G. Particle size and sol stability in metal colloids. *Colloid & Polymer . Science*, v. 250, p. 736-741, 1972.

GEIM , A. K. e NOVOSELOV , K. S. The Rise of Graphene. **Nat. Mater.** V.6, p.183. 2007.

GONG, Q.J., YANG, H.Y., DONG, Y.Y., ZHANG, W.C. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on electrochemically reduced graphene oxide. **Anal. Methods**, v. 7, n. 6, p. 2554-2562, 2015

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. 2nd edition. Illinois, USA: Rockford, 2008.

HU, K.; KULKARNI, D. D.; CHOI, I.; TSUKRUK, V. V. Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 39, n. 11, p. 1934-1972, 2014.

HUMMERS, W. S.; OFFERMAN, R. E. Preparation of Graphite Oxide **J. Amer. Chem. Soc.**, v. 80, p. 1958, 1958.

IDUMAH, C. I.; HASSAN, A.; AFFAM, A. C. A review of recent developments in flammability of polymer nanocomposites. **Rev. Chem. Eng.**, v. 31, n. 2, p. 149-177, 2015.

JIN, L.; WU, D.; KUDDANNAYA, S.; ZHANG, Y.; WANG, Z. Fabrication, Characterization, and Biocompatibility of Polymer Cored Reduced Graphene Oxide Nanofibers. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 8, n. 8, p. 5170-7, 2016.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 685–707, 2012.

KUMAR, N. A.; KIM, S. H.; KIM, J. S.; KIM, J. T.; JEONG, Y. T. Funcionalization of Multi-Walled Carbon with cysteamine for the construction of CNT/gold nanoparticle hybrid nanostructures. **World Sci.**, v. 16, p. 487-492, 2009

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S.H. P.; GUTZ, I. G. R.. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 22, n. 3, p. 417-424, June 1999 .

LEE, C.; WEI, X.; KYSAR, J. W.; HONE, J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 385-8, 2008.

LERF, A.; HE, H.; FORSTER, M.; KLINOWSKI, J. Structure of Graphite Oxide Revisited. **J. Phys. Chem.**, v. 102, p. 4477-82, 1998.

MCALLISTER, M. J.; LI, J. L.; ADAMSON, D. H.; SCHNIEPP, H. C.; ABDALA, A. A.; LIU, J.; ALONSO, M. H.; MILIUS, D. L.; CAR, R.; PRUD'HOMME, R. K.; AKSAY, I. A.

Single Sheet Functionalized Graphene by Oxidation and Thermal Expansion of Graphite. **Chem. Mater.**, v. 19, p. 4396-4404, 2007.

MELO JR., M. A.; SANTOS, L. S. S.; GONCALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 1872-1878. 2012.

MERINO, S.; MARTIN, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M.; VAZQUEZ, E. Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer-Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 9, n. 5, p. 4686-4697, 2015.

MORAIS, S.A.L. **Apostila da disciplina de espectroscopia dos compostos orgânicos**, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K.; MOROZOV, S. V.; JIANG, D.; ZHANG, Y.; DUBONOS, S. V.; GRIGORIEVA, I. V.; FIRSOV, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, p. 666-669, 2004.

OLIVEIRA, M. M., CASTRO, E. G., CANESTRARO, C. D., ZANCHET, D., UGARTE, D., ROMAN, L. S., ZARBIN, A. J. G., A simple two-phase route to silver nanoparticles/polyaniline structures, **J. Phys. Chem. B**, v. 110, p.17063-17069, 2006.

PODILA, R.; MOORE, T.; ALEXIS, F.; RAO, A. M. Graphene coatings for enhanced hemo-compatibility of nitinol stents. **RSC Adv.**, v. 3, n. 6, p. 1660-1665, 2013.

RAMACHANDRAN, R., MANI, V., CHEN, S.M., KUMAR, G.G., GOVINDASAMY, M. Recent Developments in Electrode materials and Methods for Pesticide Analysis - An overview. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 859-869, 2015.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J. e LÄNGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 398, p. 2403-2412, 2010.

RAPP, B.E., GRUHL, F.J., LANGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 398, n. 6, 2403-2412, 2010.

RATH, T.; KUNDU, P. P. Reduced graphene oxide paper based nanocomposite materials for flexible supercapacitors. **RSC Adv.** v. 5, n. 34, p. 26666-26674, 2015.

SANVICENS, N., MANNELLI, I., SALVADOR, J.P., VALERA, E., MARCO, M.P. Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology. **TrAC**, v. 30, n. 3, p. 541-553, 2011.

SHEEHAN, J. C.; CRUICKSHANK, P. A.; BOSHART, G. L. Notes- A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides. **J. Org. Chem.** v. 26 (7), p. 2525–2528. 1961.

SHEEHAN, J.C.; PRESTON, J.; CRUICKSHANK, P.A. A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 87, n. 5, p. 2492-31965. Jun 1965.

SHI, F.; ZHENG, W.; WANG, W.; HOU, F.; LEI, B.; SUN, Z.; SUN, W. Application of graphene-copper sulfide nanocomposite modified electrode for electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin. **Biosens. Bioelectron.**, v. 64, p. 131-7, 2015.

SILVA, J. V. da. Preparação, caracterização e aplicação da plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxifenilacético) para diagnóstico do vírus da dengue. Tese apresentada ao Programa Institucional de Doutorado em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 6th. ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, 2007. p. 1039

STAUDENMAIER, L. Verfahren zur Darstellung der Graphitslure. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v. 31, p. 1481–1487, 1898.

STUART, B.H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1^a ed. Ed. John Wiley & Sons, p. 1 – 44. 2004.

SUBRAMANI, A.; JACANGELO, J. G. Emerging desalination technologies for water treatment: A critical review. **Water Res.**, v. 75, p. 164-187, 2015.

SUN, H.; SHE, P.; XU, K.; SHANG, Y.; YIN, S.; LIU, Z. A self-standing nanocomposite foam of polyaniline@reduced graphene oxide for flexible super-capacitors. **Synth. Met.**, v. 209, p. 68-73, 2015.

TICHONIUK, M., GWIAZDOWSKA, D., LIGAJ, M., FILIPIAK, M. Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v. 26, n. 4, p. 1618-1623, 2010.

TROIANI, E.P. Desenvolvimento de eletrodo modificado com filme de poli(1-aminoantraceno) para determinação de dopamina em formulação farmacêutica. - Dissertação(mestrado em química), Universidade Federal de São Carlos, 2007.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. The formation of colloidal gold. **J. Phys. Chem.**, v. 57 (7), p. 670–671, 1953.

TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

TURNER, A.P. Biosensors: sense and sensibility. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

VASHIST, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. **Diagn. (Basel)**, v. 2, n. 3, p. 23-33, 2012.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3rd. ed. Hoboken, NJ: Wiley-VCH, p. 250. 2006a.

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosens. Bioelectron.**, v. 21, n. 10, p. 1887–92, 2006b.

XIANG, Q.; YU, J.; JARONIEC, M. Graphene-based semiconductor photocatalysts. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 2, p. 782-96, 2012.

YEH, T.-F.; CIHLÁŘ, J.; CHANG, C.-Y.; CHENG, C.; TENG, H. Roles of graphene oxide in photocatalytic water splitting. **Mater Today**, v. 16, n. 3, p. 78-84, 2013.