



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

DJALMA LUCAS DE SOUSA MAIA

**EXPANDINDO AS FUNCIONALIDADES DOS
NANOMATERIAIS DA FAMÍLIA DO GRAFENO**

CAMPINAS

2021

DJALMA LUCAS DE SOUSA MAIA

**EXPANDINDO AS FUNCIONALIDADES DOS
NANOMATERIAIS DA FAMÍLIA DO GRAFENO**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno Djalma
Lucas de Sousa Maia e orientada pelo Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

M28e Maia, Djalma Lucas de Sousa, 1988-
Expandindo as funcionalidades dos nanomateriais da família do grafeno /
Djalma Lucas de Sousa Maia. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Oswaldo Luiz Alves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Química.

1. Química do estado sólido. 2. Nanotecnologia. 3. Nanotoxicologia. 4.
Grafeno. 5. Funcionalização. I. Alves, Oswaldo Luiz, 1947-2021. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Expanding the functionalities of the graphene family nanomaterials

Palavras-chave em inglês:

Solid state chemistry

Nanotechnology

Nanotoxicology

Graphene

Functionalization

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Doutor em Química na área de Química Inorgânica

Banca examinadora:

Italo Odone Mazali

Nelson Eduardo Durán Caballero

Juliano Alves Bonacin

Diego Stéfani Teodoro Martinez

Ruben Dario Sinisterra Millán

Data de defesa: 08-11-2021

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7496-7239>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7943737597150904>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves (Orientador) *In memoriam*

Prof. Dr. Italo Odone Mazali (UNICAMP)

Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero (UNICAMP)

Prof. Dr. Juliano Alves Bonacin (UNICAMP)

Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez (LNNANO)

Prof. Dr. Ruben Dario Sinisterra Millán (UFMG)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno Djalma Lucas de Sousa Maia, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de novembro de 2021.

Dedico essa tese a minha mãe Raimunda, ao meu pai (In memoriam), minha irmã e irmãos, família e amigos pelo amor incondicional e todos os momentos e ensinamentos.

Dedico essa tese ao meu orientador Oswaldo Luiz Alves (In memoriam).

Todos os preciosos ensinamentos e apoio, formaram um sólido alicerce que possibilitou essa grande conquista. Essa vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Raimunda de Sousa Santos e ao meu pai Djalma Alves Maia (*In memoriam*), por todos os ensinamentos, educação, exemplos de vida e por terem proporcionado todas as condições necessárias para que eu conseguisse realizar um grande sonho, essa vitória é nossa. Os primeiros passos desta caminhada e as primeiras palavras começaram a partir de vocês. Serei eternamente grato!

Muitíssimo obrigado senhora Raimunda, a senhora é uma guerreira, uma vitoriosa! Mesmo em meio a tantos problemas e desafios, consegui vencer. Devo a senhora todas as minhas conquistas. Te amo!

Minha irmã Juliana Gisely, muitíssimo obrigado por todo carinho, atenção, amor e dedicação. Gostaria de reforçar que vocês são a base de todas as conquistas que alcancei.

Minha avó Maria, a grande matriarca da família atualmente. Agradeço ao meu primo Segundo pelas longas conversas, conselhos, pelo carinho, atenção e paciência. Muito obrigado a todos os meus tios e primos por amor devotado a min.

Esse trabalho foi desenvolvido em memória de pessoas que foram cruciais para que eu chegasse até aqui. O meu pai Djalma Alves Maia, que foi diagnosticado com câncer pancreático durante o meu período de mestrado e nos deixou tão precocemente. O meu Avô Braulino Santos que nos deixou ainda no período de graduação, mas seus ensinamentos, seu carinho e atenção com o próximo continuam vivos em cada pessoa que teve o privilégio de conhecê-lo.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Oswaldo Luiz Alves, pela oportunidade de conhecê-lo e ter vivido momentos que transformaram a minha forma de pensar, agir e ver a vida. Agraço pela orientação, ensinamentos e aprendizado que foram muito além de conhecimentos voltados para o desenvolvimento de uma tese de doutorado, foram ensinamentos de como ser um cidadão. Obrigado por me ensinar a identificar como é fazer ciência em sua essência, desde observar os fenômenos, conceber hipóteses, testá-las, compreendê-las e, a partir daí, gerar conhecimento.

A Tia Ni que me tratou com todo carinho, atenção e cuidado. Obrigado João Antônio, meu irmão.

A todos os familiares e amigos que me apoiaram e fizeram parte desta trajetória.

Gostaria de agradecer a Olívia Brasileiro, que me deu muita força e apoio para finalizar esta fase tão delicada e ao mesmo tão sonhada por min.

Gostaria de agradecer ao professor Italo Odone Mazali por todo auxílio, carinho e atenção durante todo a minha estadia no LQES, sempre muito atencioso. Em especial, gostaria de destacar a grande ajuda que o professor me ofertou após a passagem do nosso professor Oswaldo. Professor Ítalo, não tenho palavras para agradecer!

Muito obrigado ao professor Juliano Alves Bonancin, professor Nelson Eduardo Durán Caballero e ao Pedro Paulo Corbi por todo carinho, atenção e cuidado para comigo, me ajudaram e estão ajudando muito e, está ajudando vai muito além das questões profissionais, se tornaram grandes amigos e conselheiros. Sem palavras para descrever o tamanho da minha gratidão.

À equipe de pesquisa do LNNano-CNPEM coordenada pelo Prof. Dr. Diego Stéfani, Lidiane Franqui e Fracine Coa e ao Fabrício. Vocês foram fundamentais para a concretização deste trabalho que não teria chegado a este ponto sem o auxílio científico e tecnológico ofertado a min por todos vocês. Esta parceria foi extremamente importante para a realização dos experimentos biológicos *in vitro*. Ressalto que aprendi muito com vocês e gostaria de agradecer toda paciência e cuidado.

Ao professor Marco Antônio Chaer do Nascimento e todo o seu grupo do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) pelas análises de RMN de flúor, contribuindo diretamente para concretização desse trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) Claudia (DLS/Zeta), Milene (Raman), Sonia (infravermelho), Gustavo (RMN), Anderson (RMN), Renata (DRX) e Douglas (TEM/AFM), pela excelente contribuição na aquisição de espectros, imagens de microscopia e treinamentos em técnicas de caracterização.

Aos grandes amigos que o doutorado me presenteou durante o meu período de doutoramento no LQES: Leandro Fonseca, Carlos Henrique, Luis Visani, Marcelo de Sousa, Ana Paula Monteiro, Paulo Sérgio Amaral. Muito obrigado por todos os momentos que tive prazer de viver com vocês. Agradecer a paciência, o carinho e atenção, vocês foram fundamentais no meu crescimento pessoal e profissional. Juntos tivemos momentos ímpares, únicos e memoráveis em Campinas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutorado – Número do processo: 88882.329207/2019-01.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigado a todos!

RESUMO

O presente trabalho possui como principal diretriz o desenvolvimento de um estudo sistemático, robusto e aprofundado dos nanomateriais 2D da família do grafeno (óxido de grafeno-GO, GO funcionalizado com ácido cloroacético - GO-COOH, fluorografeno sintetizado a partir do GO-COOH - FG1, e o fluorografeno sintetizado diretamente do GO - FG2). O GO foi sintetizado pelo método de Hummers modificado, sendo posteriormente funcionalizado covalentemente com ácido cloroacético obtendo o GO-COOH. O GO-COOH foi fluoro-funcionalizado através da reação de Hunsdiecker para a obtenção do fluorografeno (FG1). Considerando práticas mais ecológica e economicamente amigáveis, uma nova rota sintética foi proposta para fluoro-funcionalização através da reação de Hunsdiecker a partir do GO (FG2), eliminando-se assim uma etapa no procedimento. Visando confirmar a síntese destes nanomateriais e identificar as alterações físico-químicas sofridas, os mesmos foram investigados através das técnicas de FTIR, Raman, DRX, TGA, UV-Vis, MEV, TEM, AFM e RMN do estado sólido de ^{13}C e ^{19}F . As nanobiointerações destes nanomateriais foram mensuradas através de estudos da sua exposição a proteínas do plasma humano (avaliação da formação da *protein corona*) e hemácias (ensaios hemolíticos), sendo este último, utilizado para estimar a toxicidade e biocompatibilidade. Observou-se que o processo de liofilização do GO O GO liofilizado (GO-LP) diminuiu a concentração dos grupos de oxigênio em sua superfície e produziu uma macroestrutura 3D porosa no estado sólido. Por outro lado, a secagem à vácuo do GO a temperatura ambiente (GO-VD) produziu um nanomaterial com uma macroestrutura no estado sólido similar a um filme com maior grau de grupos funcionais oxigenados do que o GO-LP. O GO-VD apresentou propriedades físico-químicas similares ao GO-Disp e o GO-LP propriedades mais distintas, tais como, grau de oxigenação e cor. Além disso, o GO-LP adsorveu uma menor quantidade de proteínas e apresentou um menor efeito hemolítico (menor nanotoxicidade) quando comparado ao GO-VD e GO-Disp. Tais resultados impactam diretamente nas aplicações biomédicas destes nanomateriais de forma segura. Além disso, o novo procedimento para fluoro-funcionalização através da reação de Hunsdiecker a partir do GO (FG2), eliminando assim uma etapa no procedimento, se mostrou eficiente. Tal funcionalização alterou as propriedades físico-químicas dos nanomateriais obtidos em relação ao GO de origem, sugerindo o sucesso na sua fluorofuncionalização. O presente projeto está sendo desenvolvido utilizando conceitos da Química de Materiais, Nanotecnologia e Nanotoxicologia.

ABSTRACT

The main guideline of the present work is the development of a systematic, robust and in-depth study of 2D nanomaterials of the graphene family (graphene oxide-GO, GO functionalized with chloroacetic acid - GO-COOH, fluorographene synthesized from GO-COOH - FG1, and fluorographene synthesized directly from GO - FG2). GO was synthesized by the modified Hummers method, being later functionalized covalently with chloroacetic acid, obtaining GO-COOH. GO-COOH was fluorofunctionalized through the Hunsdiecker reaction to obtain fluorographene (FG1). Considering more ecologically and economically friendly practices, a new synthetic route was proposed for fluorofunctionalization through the Hunsdiecker reaction from GO (FG2), thus eliminating a step in the procedure. Aiming to confirm the synthesis of these nanomaterials and identify the physicochemical changes suffered, they were investigated using the techniques of FTIR, Raman, DRX, TGA, UV-Vis, SEM, TEM, AFM, and ^{13}C and ^{19}F solid-state NMR. The nanobiointeractions of these nanomaterials were measured through studies of their exposure to human plasma proteins (evaluation of protein corona formation) and red blood cells (hemolytic assays), the latter being used to estimate toxicity and biocompatibility. It was observed that the lyophilization process of the lyophilized GO O GO (GO-LP) decreased the concentration of oxygen groups on its surface and produced a porous 3D macrostructure in the solid-state. On the other hand, vacuum drying of GO at room temperature (GO-VD) produced a nanomaterial with a solid-state macrostructure similar to a film with a higher degree of oxygenated functional groups than GO-LP. The GO-VD showed physicochemical properties like the GO-Disp. and the GO-LP more distinct properties, such as degree of oxygenation and color. Furthermore, GO-LP adsorbed a smaller amount of proteins and showed a lower hemolytic effect (less nanotoxicity) when compared to GO-VD and GO-Disp. Such results directly impact the biomedical applications of these nanomaterials in a safe way. In addition, the new procedure for fluorofunctionalization through the Hunsdiecker reaction from GO (FG2), thus eliminating a step in the procedure, proved to be efficient. Such functionalization changed the physicochemical properties of the obtained nanomaterials in relation to the original GO, suggesting the success in its fluorofunctionalization. This project is being developed using concepts from Materials Chemistry, Nanotechnology, and Nanotoxicology.

LISTAS DE FIGURAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Fluxograma das etapas envolvidas no processo de sol-gel e os produtos obtidos a partir dos procedimentos de secagem..... | 4 |
| Figura 2. Representação esquemática de ensaio hemolítico. GO interagindo (A) e possível rompimento da membrana celular das hemácias - efeito hemolítico (B)..... | 6 |
| Figura 3. Representação do GO sendo adicionado ao plasma proteico (A), interagindo e adsorvendo proteínas em sua superfície (formação da <i>protein corona</i>) (B) e equilíbrio dinâmico de adsorção e dessorção de proteínas na superfície do GO (C)..... | 8 |
| Figura 4. Fluxograma das etapas de funcionalização covalente do óxido de grafeno (GO) com ácido cloroacético (GO-COOH) e funcionalização do GO-COOH com Selectfluor (FG1)..... | 15 |
| Figura 5. Representação da funcionalização covalente do óxido de grafeno (GO) funcionalização do GO-COOH com Selectfluor (FG2)..... | 16 |
| Figura 6. Fotos digitais (A) óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) e (D) óxido de grafeno seco a vácuo (GO-VD); imagens de MEV de GO-LP (B e C) e GO-VD (E e F); e imagens de TEM de (G) dispersão de óxido de grafeno antes do processo de secagem (GO-Disp), (H) GO-VD e (I) GO-LP..... | 23 |
| Figura 7. Imagens de microscopia de força atômica (A), histograma da espessura (B) e área (C) dispersão de óxido de grafeno antes do processo de secagem (GO-Disp), grafeno seco a vácuo (GO-VD) e grafeno liofilizado (GO-LP)..... | 25 |
| Figura 8. Esquema da dispersão do óxido de grafeno (GO-Disp) antes do processo de secagem e após secagem à vácuo (GO-VD) e liofilização (GO-LP) (A). Caracterização físico-química dos materiais de óxido de grafeno: padrão de DRX de GO-VD e GO-LP (B)..... | 27 |
| Figura 9. Espectros de espectroscopia de RMN de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) (A) e liofilizado (GO-LP) (A)..... | 28 |
| Figura 10. Espectros de FTIR de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP)..... | 29 |
| Figura 11. Espectros de espectroscopia de UV-Vis de óxido de grafeno sem ser submetido a procedimento de secagem (GO-Disp), óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e óxido de grafeno liofilizado (GO-LP)..... | 31 |
| Figura 12. Dispersão aquosa (1 mg mL^{-1}) obtida a partir da redispersão de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e liofilizado - GO-LP..... | 31 |
| Figura 13. Curvas TGA e DTG de óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) (A) e curvas TGA e DTG de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) (B)..... | 32 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 14. Espectros Raman de óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) (A) e de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) (B)..... | 33 |
| Figura 15. Avaliação do comportamento de agregação de dispersão de óxido de grafeno (GO-Disp.), seca a vácuo (GO-VD) e liofilizada (GO-LP) em água ultrapura, PBS e materiais GO corona rígidos pré-revestidos em PBS, monitorando o diâmetro hidrodinâmico (DH) por DLS por 0, 1, 3 e 24 h..... | 35 |
| Figura 16. Avaliação do comportamento de sedimentação da dispersão de óxido de grafeno (GO-Disp.), óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) em água ultrapura, PBS e protein corona dura pré-revestida. Materiais GO em PBS, durante 24 h de incubação por análise UV-Vis por 0, 1, 3 e 24 h..... | 36 |
| Figura 17. Gel SDS-PAGE de proteínas plasmáticas humanas extraídas de óxido de grafeno disperso (GO-Disp), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP) após incubação de 100 µg mL ⁻¹ de cada GO em plasma humano a 55% em PBS durante 1 h a 37 ° C..... | 39 |
| Figura 18. Efeito hemolítico do óxido de grafeno disperso (GO-Disp), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP), após 1 h de incubação com concentrado de hemácias em PBS solução A) porcentagem de hemólise e B) porcentagem de supressão da hemólise após formação da corona dura..... | 40 |
| Figura 19. Fotografias do efeito hemolítico do óxido de grafeno disperso (GO-Disp), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP), após 1 h de incubação com concentrado de hemácias em PBS solução..... | 41 |
| Figura 20. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ¹³ C do óxido de grafeno (GO)..... | 42 |
| Figura 21. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ¹³ C do óxido de grafeno (GO) funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH)..... | 43 |
| Figura 22. Mecanismo proposto para a funcionalização do Óxido de Grafeno (GO) com ácido cloroacético (mec 1), funcionalização após a reação entre o íon hidróxido e o ácido cloroacético e formação da ligação na carbonila de grupos funcionais aldeído, cetona e epóxidos (mec 2) e sugestão de mecanismo de redução (mec 3)..... | 44 |
| Figura 23. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ¹³ C do GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH) funcionalizado com Selectflúor (FG1)..... | 45 |
| Figura 24. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ¹³ C do óxido de grafeno (GO) funcionalizado com Selectflúor (FG2)..... | 46 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 25. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do óxido de grafeno GO, GO-COOH, FG1 e FG2. A) região entre 4000 e 2500 cm^{-1} e B) região entre 2200 e 800 cm^{-1} | 47 |
| Figura 26. Difratoogramas do A) grafite, B) óxido de grafeno (GO), C) GO funcionalizado com carboxilas (GO-COOH), D) GO-COOH funcionalizado com átomos de flúor (FG1) e E) GO funcionalizado com átomos de flúor (FG2)..... | 48 |
| Figura 27. Espectros de RMN de ^{19}F (sequência <i>one pulse</i>) obtidos para o Selectfluor. A) estático e B) em diferentes velocidades de rotação – 3,5 kHz (azul), 5 kHz (vermelho) e 7 kHz (verde)..... | 50 |
| Figura 28. Espectros de RMN de ^{19}F (sequência <i>one pulse</i>) obtidos para o Selectfluor. A) estático e B) em diferentes velocidades de rotação – 3,5 kHz (azul), 5 kHz (vermelho) e 7 kHz (verde)..... | 51 |
| Figura 29. Mecanismo proposto de descarboxilação e inserção de átomos de flúor no óxido de grafeno funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH) com Selectfluor (FG1)..... | 52 |
| Figura 30. Mecanismo proposto de descarboxilação e inserção de átomos de flúor no óxido de grafeno com Selectfluor (FG1)..... | 53 |
| Figura 31. Espectro de RMN-MAS de ^{19}F do óxido de grafeno funcionalizado, obtido com a sequência <i>one pulse</i> (velocidade de rotação 7 kHz)..... | 54 |
| Figura 32. Espectro de RMN de ^{19}F do óxido de grafeno funcionalizado, obtido com a sequência spin-eco de Hahn..... | 55 |
| Figura 33. Representação das reações de funcionalização do GO com átomos de flúor a partir dos resultados de RMN de ^{19}F | 55 |

LISTAS DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Comprimentos de onda, modos vibracionais e grupos funcionais presentes nos espectros de FTIR do GO-VD e GO-LP..... | 30 |
| Tabela 2. Potencial zeta de dispersão de óxido de grafeno (GO-Disp.), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP) em água ultrapura, ou PBS, antes e após a interação com as proteínas plasmáticas (formação da proteína corona)..... | 37 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. | Introdução..... | 17 |
| 1.1 | Funcionalização covalente do grafeno para a síntese do óxido de grafeno | 18 |
| 1.2 | Influência dos procedimentos de secagem nas propriedades de materiais | 19 |
| 1.3 | Interação do óxido de grafeno (GO) com biosistemas | 21 |
| 1.3.1 | Interação do GO com glóbulos vermelhos do sangue – Ensaio hemolítico | 21 |
| 1.3.2 | Interação do GO com proteínas plasmáticas do sangue – Formação da protein corona | 23 |
| 1.4 | Funcionalização covalente do óxido de grafeno para a síntese do fluoro grafeno .. | 25 |
| 2. | Objetivos e Justificativas..... | 27 |
| 3. | Materiais e Métodos | 27 |
| 3.1 | Reagentes | 27 |
| 3.2 | Síntese do Óxido de Grafeno | 27 |
| 3.3 | Funcionalização covalente do Óxido de grafeno (GO) com Ácido cloroacético | 29 |
| 3.4 | Funcionalização do óxido de grafeno com Flúor..... | 30 |
| 3.5 | Proposta inédita de funcionalização do óxido de grafeno com Flúor..... | 31 |
| 3.6 | Caracterizações físico-químicas..... | 31 |
| 3.7 | Preparo das soluções estoque de GO | 32 |
| 3.8 | Estudo da estabilidade e determinação do potencial zeta | 33 |
| 3.8.1 | Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) | 33 |
| 3.8.2 | Potencial Zeta..... | 34 |
| 3.8.3 | Determinação da estabilidade e determinação do potencial zeta do óxido de grafeno seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP)..... | 35 |
| 3.9 | Ensaio de formação da protein corona | 35 |
| 3.10 | Ensaio hemolítico | 36 |
| 4. | Resultados e discussão | 36 |
| 4.1 | Caracterização do óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e Liofilizado (LP)..... | 36 |

| | | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2 | Estudo da estabilidade e determinação do potencial zeta do óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e liofilizado (LP). | 49 |
| 4.3 | Interações de óxidos de grafeno com proteínas plasmáticas..... | 53 |
| 4.4 | Avaliação do efeito hemolítico dos nanomateriais óxido de grafeno na presença e ausência da protein corona | 54 |
| 4.5 | Caracterização Físico-química do óxido de grafeno e derivados. | 56 |
| 4.5.1 | Ressonância Magnética de estado sólido de ¹³ C de óxido de grafeno (GO), GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH), GO-COOH funcionalizado com Flúor (FG1) e GO funcionalizado com flúor (FG2)..... | 56 |
| 4.5.2 | Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier de Óxido de Grafeno (GO), GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH), GO-COOH funcionalizado com Flúor (FG1) e GO funcionalizado com flúor (FG2). | 61 |
| 4.5.3 | Difratometria de Raios X (DRX) de óxido de grafeno (GO), GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH), GO-COOH funcionalizado com Flúor (FG1) e GO funcionalizado com flúor (FG2). | 62 |
| 4.5.4 | Ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ¹⁹ F de GO-COOH (funcionalizado com ácido cloroacético) ao ser funcionalizado com flúor (FG1) e do Selectflúor..... | 64 |
| 4.5.2.1 | Caracterização do reagente ‘SelectFluor’ por RMN de sólidos de ¹⁹ F..... | 64 |
| 4.5.2.2 | Caracterização da amostra de óxido de grafeno funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH) funcionalizado com selectflúor (FG1) por RMN de ¹⁹ F em estado sólido | 66 |
| 5. | Conclusão | 71 |
| 6. | Perspectivas Futuras | 72 |
| 7. | Referências Bibliográficas | 73 |

1. Introdução

Os nanomateriais 2D à base de carbono da família do grafeno (grafeno e derivados) estão em notável evidência em meio aos nanomateriais mais estudados pela comunidade acadêmica, científica e tecnológica. Estes nanomateriais carbonáceos possuem uma estrutura bidimensional (2D) composta por uma rede de anéis benzênicos (átomos de carbono hibridizados sp^2) condensados dispostos em uma estrutura similar à de um "favo de mel", possuindo espessura de um único átomo de carbono.¹⁻⁴ Os orbitais "p" não hibridizados dos átomos de átomos de carbono e orientados perpendicularmente às nanofolhas de grafeno, possuem energia e simetria favoráveis para interagirem uns com os outros, formando uma banda π e proporcionando um caráter aromático ao grafeno.⁵ Vale a pena destacar o fato deste nanomaterial ser abundante na crosta terrestre, pois as nanofolhas de grafeno empilhadas naturalmente, formam o mineral grafite.⁵

Em virtude de suas propriedades físico-químicas e nanoestrutura únicas, este alótropo do carbono apresenta uma grande área superficial associado a relevantes propriedades ópticas e mecânicas, alta condutividade térmica e elétrica, elevado efeito Hall na temperatura ambiente, dentre outras.⁶⁻⁹ Estas propriedades físico-químicas conferem a este nanomaterial uma posição de protagonista em meio as plataformas de estudos baseados em materiais nanoestruturados, com possíveis aplicações em diversos nanossistemas tais como, em sensores, dispositivos fotovoltaicos, sistemas de entrega de fármacos (*Drug-delivery*), nanocompósitos poliméricos, transistores de efeito de campo, etc.^{5,10-12}

Em contrapartida, a aplicação do grafeno de forma prática possui algumas das desafiadoras limitações a serem previamente solucionadas pela comunidade científica para aplicações tais como, *band gap* igual a zero e falta de ordem magnética de longo alcance¹³. Adicionalmente, a elevada hidrofobicidade inviabiliza a aplicação destes nanomateriais em sistemas biológicos, em que a hidroflicidade e a estabilidade coloidal são parâmetros extremamente importante.^{5,10-12} A alteração da estrutura basal do grafeno através de funcionalizações covalentes ou não surgem como uma estratégia promissora para contornar tais limitações. A funcionalização covalente possibilitou o surgimento de uma grande variedade de derivados do grafeno (família do grafeno)¹⁴⁻¹⁸ e, dentre todos estes derivados, é possível destacar o óxido de grafeno¹¹ e fluorografeno devido as propriedades físico-químicas e possíveis aplicações em tais como lubrificantes, nanocompósitos, baterias, eletrocatalisadores para evolução de hidrogênio.¹⁵⁻¹⁸

Tahereh et al. abordaram a capacidade dos nanomateriais de nanomateriais da família do grafeno no contexto de inativação do vírus causador da COVID-19. Os mecanismos de inativação podem estar relacionados com as interações eletrostáticas entre o vírus e os nanomateriais. Logo, tal fenômeno pode ser potencializado a partir de funcionalizações covalentes ou não, que potencializem a interação com o vírus, aumentando a eficiência de inativação viral.¹⁹

1.1 Funcionalização covalente do grafeno para a síntese do óxido de grafeno

O grafite é um mineral de ocorrência natural abundante na natureza composto por nanofolhas de grafeno empilhadas tridimensionalmente e, por estas nanofolhas interagirem entre si por forças de van der Waals, deste modo, pode ser classificado com um mineral de van der Waals.²⁰ Estes tipos de minerais podem ser submetidos a um processo de esfoliação para a obtenção de materiais 2D, processo este, que tem despertado um nível de interesse sem precedentes na comunidade acadêmica, científica e tecnológica.²⁰ Logo, o grafite pode ser esfoliado para isolar as nanofolhas de grafeno, sendo este um dos processos mais utilizado atualmente.²⁰

Existem diversos procedimentos na literatura para a esfoliação do grafite, no entanto, a esfoliação química deste material a partir de processos oxidativos é amplamente utilizado. Ao inserir grupamentos oxigenados na estrutura do grafeno altera-se significativamente suas propriedades físico-químicas e obtém-se um de seus derivados denominado de óxido de grafeno (GO). O GO sintetizado a partir do método Hummer's^{21,22} se dispersa em meio aquoso, formando dispersões coloidais estáveis devido a formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água a partir dos grupos oxigenados presentes em sua estrutura, o que confere a este nanomaterial uma relevante hidrofiliabilidade.²¹⁻²³

O GO possui em sua estrutura bidimensional uma região semelhante à do grafeno com predominância de carbonos dispostos em anéis benzênicos condensados, com hibridização sp^2 , e outra região com carbono hibridizados sp^3 , além de apresentar grupos funcionais oxigenados tais como, cetona, aldeído, ácido carboxílico, lactol, epóxidos, dentre outros. Ou seja, este nanomaterial possui um comportamento anfifílico proveniente de uma região hidrofóbica (similar à do grafeno), que confere ao nanomaterial uma alta capacidade de imobilização de moléculas orgânicas, corantes e biomoléculas²⁴, e uma hidrofílica (região com grupos oxigenados).²³⁻²⁷

Essa característica possibilita a atuação do GO como surfactante²⁵, adsorvendo em sua superfície moléculas hidrofóbicas ou extraíndo-as em solventes polares^{26,27}, sondas em

imageamento celular, biossensores, bactericida, terapia fototérmica, etc.²⁸⁻³⁴ Vale destacar que a repulsão eletrostática dos grupamentos carboxila desprotonados ($R-COO^-$) presentes nas extremidades das nanofolhas de GO possuem um papel crucial na estabilidade coloidal destes nanomateriais em meio aquoso, sendo sensíveis a alterações do pH do meio.³⁵

No entanto, diversos estudos relatados na literatura mostraram que as propriedades físico-químicas do GO são sensíveis e sofrem grandes alterações a depender do métodos de síntese utilizado^{36,37}, ao tempo de sonicação utilizado para auxiliar na esfoliação das nanofolhas e/ou redispersão em solventes^{38,39}, a presença de impurezas^{40,41} que podem se apresentar na forma de debris⁴²⁻⁴⁴ e aos procedimentos de secagem^{45,46}. Vale ressaltar que o procedimento utilizado para secar dispersões coloidais é uma etapa crítica nos processos de síntese de materiais inorgânicos.

1.2 Influência dos procedimentos de secagem nas propriedades de materiais

Os processos de secagem que são amplamente adotados para secar as dispersões coloidais de GO e, seus impactos nas propriedades físico-químicas dos nanomateriais secos são negligenciados. No entanto, os processos de secagem de dispersões coloidais é uma etapa extremamente crítica no que tange a síntese de materiais.⁴⁷ Dentre os diversos sistemas, é possível destacar o processo de síntese sol-gel, em que, os nanomateriais obtidos são classificados a partir do procedimento de secagem adotado (Figura 1). A partir da figura é possível observar que o processo de evaporação produz um material (xerogel) mais denso e com as partículas distribuídas de forma mais organizadas quando comparado com o material seco a partir da liofilização (criogel) em que se observa um material mais poroso.⁴⁷⁻⁵⁰

Nathalie et al. seu trabalho demonstraram que o carvão ativado secos a partir da evaporação (xerogel), liofilização (criogel) e secagem super crítica (aerogel) demonstraram que, estes procedimentos de secagem deram origem a materiais com características de porosidades distintas (textura superficial, volume de poro, dentre outras).⁵¹ Zhang et al. mostraram que o processo de secagem (liofilização ou secagem a vácuo a 60 °C) influenciou a morfologia, estrutura e capacidade eletrocatalítica do GO.⁴⁵ Em um outro trabalho, Platero et al. relataram o impacto do processo de secagem nas propriedades físico-químicas, mecânicas e no desempenho adsorptivo de nanocompósitos a base de GO.⁴⁶

Logo, é de extrema importância a realização de estudos focados em compreender em riqueza de detalhes o real impacto das etapas envolvidas no procedimento de síntese, com destaque para os processos de secagem que são amplamente utilizados e seus impactos sobre as propriedades físico-químicas negligenciados. Além disso, estudos voltados para um melhor

entendimento da influência destes processos nas nanobiointerações, toxicidade e biocompatibilidade deste nanomaterial são pouco explorados e/ou inexistentes.

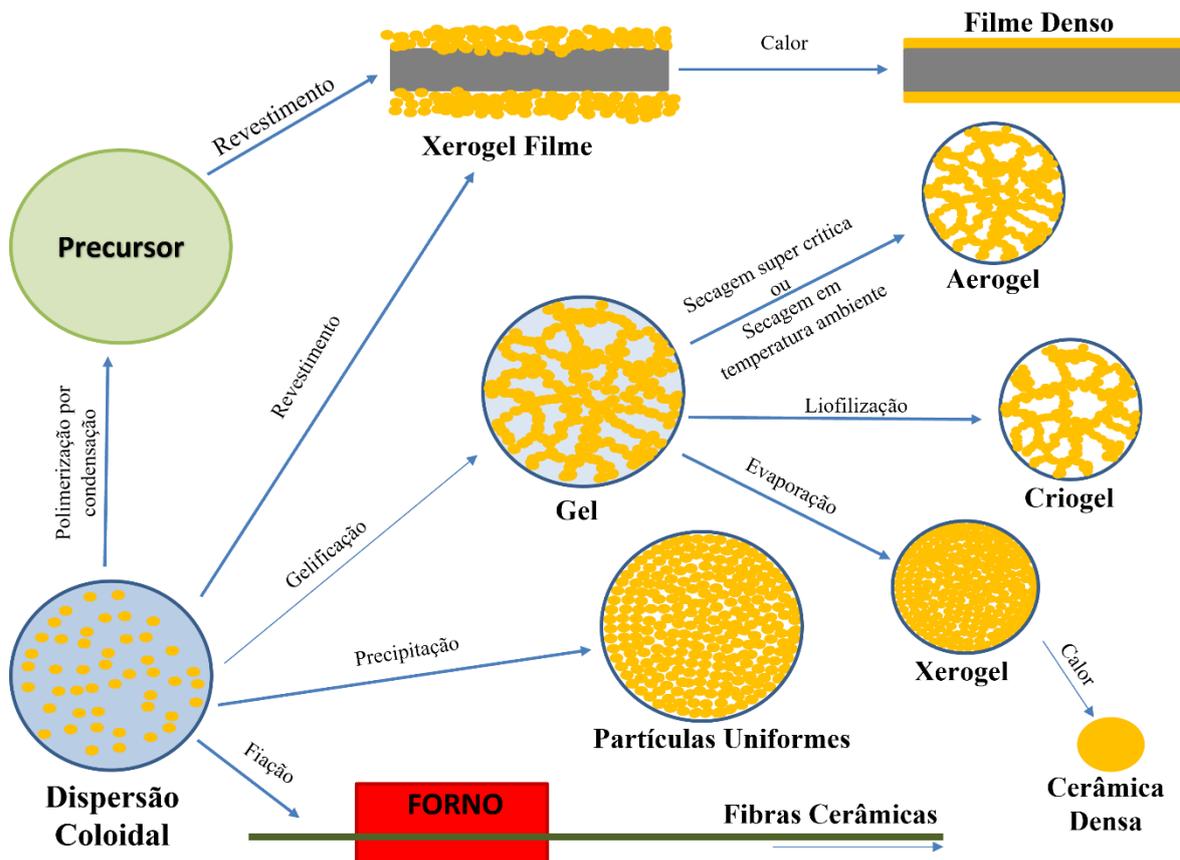


Figura 1. Fluxograma das etapas envolvidas no processo de sol-gel e os produtos obtidos a partir dos procedimentos de secagem. Adaptado⁴⁷⁻⁵⁰

Compreender de forma aprofundada as relações entre as propriedades físico-químicas do GO e os efeitos adversos a saúde humana e ao meio ambiente são extremamente importantes para viabilizar o desenvolvimento de aplicações científicas e tecnológicas seguras e ambientalmente amigáveis. Diversos grupos desenvolveram estudos para identificar tais relações, mas seus resultados são insuficientes para o total entendimento desta plataforma extremamente promissora e versátil frente a aplicações nos mais diversos campos que são os nanomateriais a base de GO.^{24,52-56} O GO possui um grande potencial de aplicações biomédicas, incluindo sistemas de encapsulamento e distribuição controlada e direcionada de fármacos, como componente de biossensores, na transfecção de genes, imageamento celular, entre outras.^{28,30,57-63}

Na grande maioria dessas aplicações, a administração intravenosa de GO é uma das alternativas necessárias. Em contra partida, não há conhecimentos suficientes para o total entendimento da natureza das nanobiointerações deste nanomaterial com os biosistemas presentes no sangue, bem como uma possível nanotoxicidade e efeitos adversos a saúde humana.^{24,52-55} Além disso, o entendimento real da interação nanomaterial-biomolécula é fundamental para viabilizar o desenvolvimento seguro dos campos da nanotecnologia e biotecnologia, áreas tecnológicas que ocupam cada vez mais espaço na civilização moderna.

Um método comumente utilizado para avaliar a toxicidade do GO e derivados a partir dos danos causados aos glóbulos vermelhos é denominado de ensaios hemolíticos.⁶⁴⁻⁶⁸ Além disso, o GO interage com as proteínas plasmáticas, levando a formação de um revestimento proteico comumente designado por *protein corona*⁶⁹⁻⁷¹, detalhados um pouco melhor a seguir.

1.3 Interação do óxido de grafeno (GO) com biosistemas

1.3.1 Interação do GO com glóbulos vermelhos do sangue – Ensaios hemolíticos

Os ensaios hemolíticos de nanomateriais fornecem informações fundamentais frente aos possíveis danos que estes nanomateriais podem causar partir das interações com membrana celular e possível rompimento das hemácias (Figura 2) ao serem aplicados intravenosamente.⁶⁴⁻⁶⁸ Compreender o potencial citotoxicidade dos nanomateriais a base de GO é uma etapa importante, pois fornecem informações iniciais frente a sua biocompatibilidade, possibilitando aplicações seguras ao minimizar os riscos à saúde humana. Vale a pena destacar que, os danos aos glóbulos vermelhos podem levar à anemia e a outras condições potencialmente fatais.^{64-68,72,73}

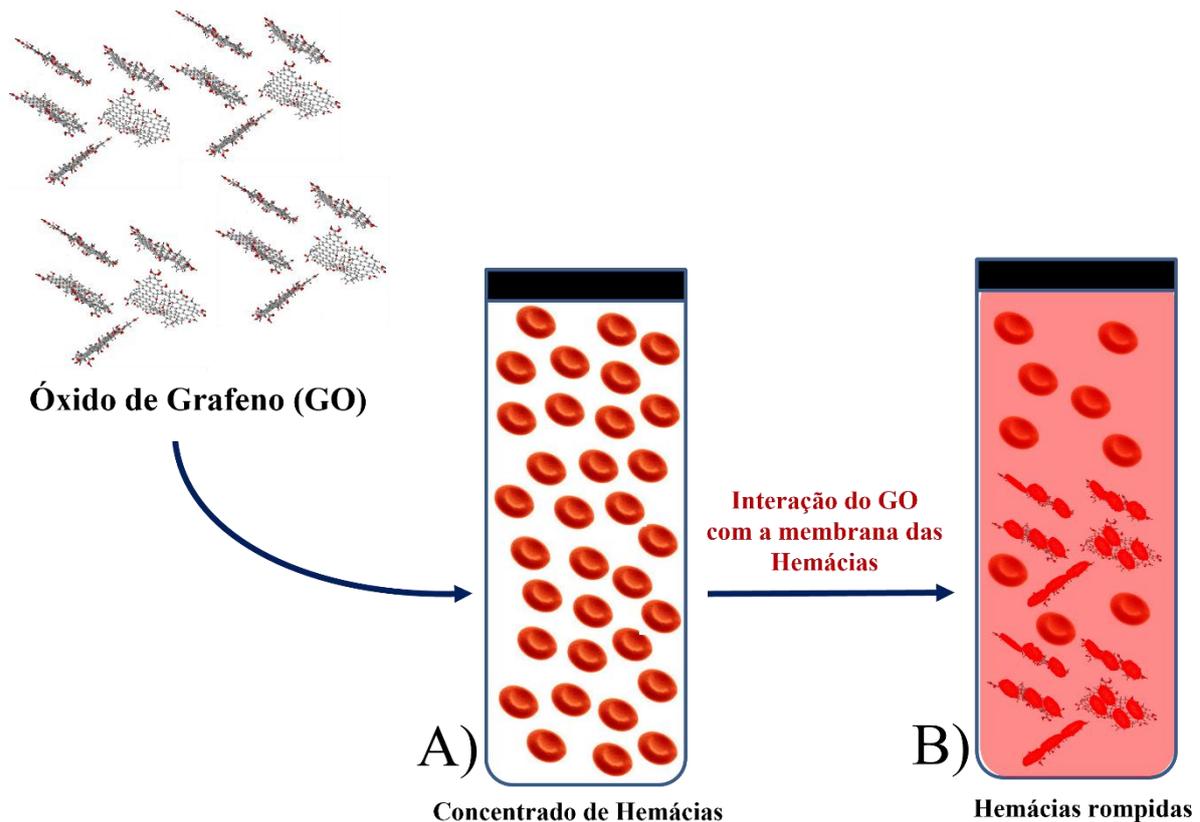


Figura 2. Representação esquemática de ensaio hemolítico. GO interagindo (A) e possível rompimento da membrana celular das hemácias - efeito hemolítico (B).

O efeito hemolítico relativamente alto do GO está intimamente ligado a suas propriedades físico-químicas semelhantes ao de um surfactante com uma região hidrofóbica composta por carbonos hibridizados sp^2 dispostos em estruturas poliaromáticas não oxidadas e, uma região hidrofílica onde é possível observar a presença dos grupos oxigenados que no pH sanguíneo apresenta as carboxilas desprotonadas. Essa estrutura do GO pode levar a fortes interações eletrostáticas ou hidrofóbicas com a bicamada lipídica.^{67,74,75} Deste modo, podemos concluir que a biocompatibilidade do GO está relacionada com a distribuição de tamanho das nanofolhas, química de superfície, defeitos estruturais. Por outro lado, funcionalizações covalentes ou não podem levar a reduções do efeito hemolítico do GO, aumentando em sobremaneira sua biocompatibilidade.^{67,74,75}

Xie et al.⁷⁶ desenvolveram um nanocarreador promissor para atuar em tratamentos quimioterápicos para câncer a base de membrana de células vermelhas sanguíneas de camundongos adsorvidas na superfície de GO com níveis relevantes de biocompatibilidade, apresentando um efeito hemolítico extremamente baixo (< 5%).⁷⁶ Adicionalmente, o trabalho relata que após a administração do nanocarreador com cloridrato de doxorrubicina na veia da

cauda do camundongo apresentou toxicidade sistêmica reduzida e acumulou-se em grande quantidade no local do tumor, sugerindo que este nanocarreador pode ser aplicado em sistemas de entrega direcionada de fármacos.⁷⁶ Adicionalmente, a adição um revestimento de proteínas na superfície do GO, pode reduzir em sobremaneira a sua toxicidade e, conseqüentemente, aumentar sua biocompatibilidade.^{64,71,77} De fato, a capa formada pelas proteínas GO confere ao mesmo uma nova identidade biológica que impulsiona mais nanobiointerações, impactando diretamente em sua toxicidade e biocompatibilidade.^{71,78,79}

1.3.2 Interação do GO com proteínas plasmáticas do sangue – Formação da protein corona

As proteínas são uma das classes de biomoléculas importantes e, elucidar a suas nanobiointerações com os nanossistemas é fundamental para viabilizar a aplicações da nanotecnologia nos mais diversos campos científicos e tecnológicos. Nesse sentido, a protein corona é um conceito central em nanobiociências, e consiste na adsorção espontânea de proteínas na superfície de nanomateriais após o contato com meios biológicos. Este revestimento molecular confere ao nanomaterial uma nova identidade biológica por alterar sua superfície química modulando suas propriedades físico-químicas e efeitos biológicos. Como resultado, a formação da corona da proteína influencia criticamente os impactos na absorção, biodistribuição, toxicidade e destino de nanomateriais em organismos e no meio ambiente.^{80,81}

Conforme mencionado acima, o GO apresenta nanofolhas bidimensionais com grande área superficial específica e com características anfífilas, uma região hidrofóbica e uma hidrofílica, funcionando como uma base favorável para o empilhamento de proteínas. Tais características justificam a formação da corona proteica a partir de interação hidrofóbicas, eletrostática e interações π - π entre o nanomaterial e as proteínas. Quando as proteínas interagem fortemente com a superfície do GO essa corona proteína é denominada de hard corona e quando interagem fracamente de soft corona. Mesmo existindo um número considerável de trabalhos na literatura, o completo entendimento sobre o dinâmico mecanismo da nanobiointerações na interface nanomaterial-proteína durante a adsorção e dessorção ainda não é elucidado, representado esquematicamente na Figura 3.^{70,80,82}

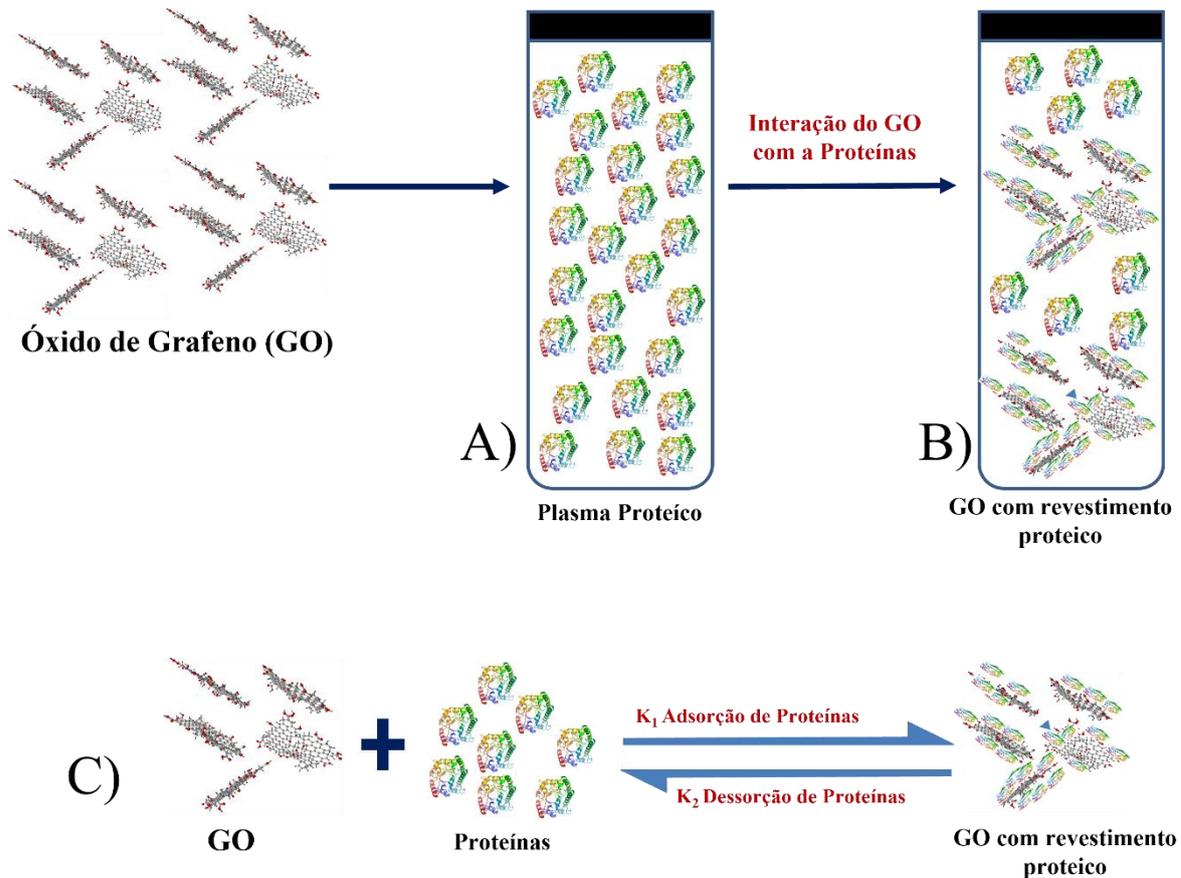


Figura 3. Representação do GO sendo adicionado ao plasma proteico (A), interagindo e adsorvendo proteínas em sua superfície (formação da *protein corona*) (B) e equilíbrio dinâmico de adsorção e dessorção de proteínas na superfície do GO (C). Adaptado^{70,80,82}

Conforme acima mencionado, estudos detalhados e sistemáticos focados no entendimento dos diversos fenômenos físico-químicos envolvidos no processo de formação corona são extremamente importantes, pois a composição e a orientação espacial da bio-corona são fortemente influenciadas pelas propriedades físico-químicas das nanofolhas de GO, tais como tamanho, química de superfície, grau de oxigenação, entre outros. Além disso, é necessário levar em consideração as possíveis variações conformacionais que as proteínas podem apresentar.^{70,81,82}

Após a formação da corona o GO altera drasticamente as suas propriedades físico-químicas e afetam diretamente a interação entre suas respectivas nanofolhas e suas nanobiointerações com sistemas biológicos, afetando diretamente sua biodistribuição e biossegurança.^{83–85} Palmieri et al.⁶⁴ mostrou em seu trabalho que a corona proteica suprimiu completamente os danos causados pelos nanomateriais as células vermelhas do sangue. Estes

resultados pavimentam um campo de aplicações de nanomateriais a base de óxido de grafeno em sistemas intravenosos.^{82,70}

O GO é um substrato extremamente versátil, com propriedades físico-químicas únicas, grande área superficial e, além disso, podem ser obtidos diversos nanocompósitos a partir de funcionalizações (covalentes ou não).⁵⁷ Dentre uma infinidade de possíveis funcionalizações covalentes relatadas na literatura, a adição de átomos de flúor, dando origem ao nanomaterial denominado de fluorografeno (FG), surge como uma promissora alternativa.^{15-18,86,87}

1.4 Funcionalização covalente do óxido de grafeno para a síntese do fluoro grafeno

O flúor é um átomo que possui uma eletronegatividade relativamente superior em relação a dos átomos de carbono, logo, a ligação covalente formada entre esses dois átomos (ligação C-F) será fortemente polarizada e com a densidade eletrônica centrada nos átomos de flúor. Este fenômeno forma uma blindagem negativa entre as nanofolhas que reduz a aglomeração deste nanomateriais.⁸⁸ Adicionalmente, destaca-se o aumento da hidrofobicidade, alta condutividade térmica, aumento da estabilidade térmica, energia na faixa de micro-ondas, entre outras.^{88,89}

A inserção de átomos de flúor na estrutura basal do GO altera fortemente suas propriedades eletrônicas exemplo da transferência rápida de heterogenia de elétrons rápida e abertura de *band gap*.^{17,87} Tais alterações proporcionaram ao FG a capacidade de produção de transistores mais eficientes que os produzidos utilizando GO ou silício⁹⁰, melhora as propriedades ópticas e de transporte de elétrons em relação ao grafeno e eleva a detecção eletroquímica de biomarcadores (ácido úrico, ácido ascórbico e dopamina).¹⁷

Além de ser um excelente nanomaterial para a produção de fototransistores orgânicos fluoro⁹¹⁻⁹⁵, o fluorografeno também pode ser aplicado em sistemas eletroquímicos para produção de hidrogênio e para redução de oxigênio, especialmente quando depositado sobre a superfície de carbono vítreo, como um dos componentes de nanocompósitos para nanossistemas com alta resistência a corrosão,⁹⁶ em eletrodos com de alto desempenho⁹⁷, entre outras possíveis aplicações nos mais diversos campos científicos e tecnológicos. Chee et al., em seu trabalho, constatou que o aumento do grau de átomos de flúor no grafeno proporcionou uma melhoria no sistema de detecção e nas propriedades eletroquímicas em geral.¹⁷

Razaghi et al. desenvolveram em seu trabalho um nanocarreador a base de FGO como transportador do conjugado ácido linoleico-curcumina para o tratamento de câncer. Este nanossistema apresentou uma alta capacidade de carregamento dos conjugados e baixa

citotoxicidade. Além disso, este nanossistema apresentou propriedades interessantes em aplicações em diagnósticos por ressonância magnética *in vitro*, sendo considerado um agente de contraste negativo com resultados satisfatórios

O FG é usualmente sintetizado utilizando o método de esfoliação química do grafite fluoretados a partir de métodos ultrassônicos e hidrotérmicos que utilizam gás flúor (F₂), ácido fluorídrico (HF), eterato de trifluoreto de Boro (BF₃), trifluoreto de dietilaminoenxofre (DAST) e ácido hexafluorofosfórico (HPF₆) como agente de fluoretação e com plasma utilizando o CF₄, SF₆ e F₂. Vale a pena destacar que estes procedimentos de síntese utilizam reagentes tóxicos, corrosivos, solventes orgânicos e elevadas temperaturas no caso dos métodos que utilizam o plasma.^{88,89,96-98} Por outro lado, Xing et al.¹⁸ mostraram em seu trabalho um procedimento de síntese para a funcionalização covalente do GO com átomos de flúor a partir da reação de Hunsdiecker em meio aquoso, em atmosfera de nitrogênio e a temperaturas relativamente brandas (90 °C).¹⁸

Este procedimento de síntese proposto por Xing et al.¹⁸ Este procedimento de síntese proposto por Xing et al. surge como uma nova de promissora alternativa de funcionalização covalente do GO com átomos de flúor, através de uma abordagem sintética mais limpa. Pois, não utiliza solventes orgânico, reagentes altamente tóxicos, gera menos resíduo químico e necessita gasto energético inferior aos outros procedimentos abordados acima, fornecendo mais segurança à saúde humana e ao meio ambiente.¹⁸ Logo, é possível efetuar um planejamento para a concepção sistemática de GOs fluorados condizente com os objetivos internacionais de desenvolvimento sustentável⁹⁹⁻¹⁰¹ de novas tecnologias baseadas na química verde.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Anastas e Warner conceituaram a química verde como sendo “a utilização de um conjunto de princípios que reduz ou elimina o uso de geração de substâncias perigosas no projeto de fabricação e aplicação de produtos químicos.”¹⁰²

O FG é um nanomaterial novo e com algumas propriedades físico-químicas pouco elucidadas na literatura. Adicionalmente, poucos estudos foram realizados frente ao impacto da inserção de flúor na estrutura do GO, bem como sua influência em nanobiointerações, o que abre excelentes oportunidades de novos desenvolvimentos.

Frente às nanobiointerações, a hidrofiliabilidade de um nanomaterial é um parâmetro extremamente importante,⁵⁸ o que coloca o óxido de grafeno em posição de destaque frente aos demais nanomateriais a base de carbono.²⁸ Em contrapartida, estudos que abordam a toxicidade do GO e seus derivados são de certa forma contraditórios⁵² e, ainda, insuficientes para um total entendimento. Tal situação pavimenta excelentes oportunidades de realização de relevantes trabalhos de pesquisas inovadores inter e transdisciplinares, alinhados com tecnologias verdes

e sustentáveis com um pensamento crítico e sistêmicos, abordando desde a química de materiais até aspectos emergentes da nanotecnologia e nanotoxicologia.

2. Objetivos e Justificativas

o presente trabalho se propôs a realizar um estudo sistemático, detalhado e profundo da influência de diferentes métodos de síntese e modificações covalente nas propriedades físico-química do GO e seus derivados. Inseridos neste contexto e conectados com o que há de mais recente na literatura (estado da arte), a avaliação dos impactos causados por diferentes procedimentos de secagem (liofilização e secagem a vácuo) nas propriedades desses materiais e o efeito na formação da protein corona e sua toxicidade foram abordados, utilizando-se plasma humano e ensaios hemolíticos, respectivamente

Adicionalmente, o presente trabalho se propôs a desenvolver um novo procedimento sintético de inserção de átomos de flúor na estrutura do óxido de grafeno pautada em um procedimento de síntese mais limpo e conecto com os princípios da química verde: reduzindo etapas, custos e resíduos gerados, em comparação a trabalhos descritos previamente na literatura. Ademais, é também proposta uma detalhada e integrada avaliação das diferenças de propriedades físico-químicas dos óxidos de grafeno fluorofuncionalizados por diferentes procedimentos de síntese, propondo os mecanismos envolvidos em tais funcionalizações.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Os materiais, ácido cloroacético (ClCH_2COOH , $\geq 99,0\%$, Lote SHBF7326V), Selecflúor ($\text{C}_7\text{H}_{14}\text{B}_2\text{ClF}_9\text{N}_2$, $\geq 95\%$, Lote MKBV4755V), persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $99,0\%$, lote MKBF0060V), pentóxido de fósforo (P_2O_5 , 98% , lote BCBB2170), nitrato de prata (AgNO_3 , 99%) e tampão fosfato salino (PBS, lote 75150661B) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O pó de grafite natural ($98,0\%$, lote 114868), pelletes de hidróxido de sódio (NaOH , $> 97\%$, lote 167249), ácido clorídrico (HCl , $36,5\text{-}38,0\%$, lote 222401), permanganato de potássio (KMnO_4 , $99,0\%$, lote 141804), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $30,0\%$, 107055) e ácido sulfúrico (H_2SO_4 , $95,0\text{-}98,0\%$, lote 219367) foram adquiridos da Synth (Brasil). A água deionizada foi obtida através um sistema de purificação Synergy®UV Merck Milipore.

3.2 Síntese do Óxido de Grafeno

A síntese do óxido de grafeno foi realizada utilizando-se o método Hummers^{21,22,105} modificado, seguindo um protocolo de síntese consolidado no Laboratório de Química do Estado Sólido. Este procedimento sintético parte de um tratamento prévio do grafite que posteriormente é submetido a novas etapas, abaixo detalhadas:

Etapa 1 – Pré-tratamento do grafite

A primeira etapa consistiu em aquecer por alguns instantes (5 min) 4,4 mL de ácido sulfúrico em um erlenmeyer sob agitação magnética constante a uma temperatura de 80 °C e, posteriormente adicionar K₂S₂O₈ (0,8 g) e P₂O₅ (0,8 g). Alguns minutos depois adicionou-se 1 g de grafite natural em pó e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 4,5 h. Em seguida, sob agitação o aquecimento foi interrompido e, a temperatura ambiente, 170 mL de água deionizada foram adicionados. A suspensão foi submetida à filtração a vácuo, utilizando uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µm. O sólido retido na membrana foi lavado com água deionizada até a neutralização do pH e, seco a temperatura ambiente por cerca de 12 h.

Etapa 2 – Oxidação do grafite pré-tratado

Esta etapa consiste em adicionar e resfriar 40 mL de ácido sulfúrico até atingir uma temperatura próxima de -10 °C. Logo após, é adicionado o grafite previamente tratado e, gradualmente e em pequenas quantidades, foi transferido 5 g de KMnO₄ durante um período entre 15 e 20 min. O sistema foi mantido por um período de 2 h sob agitação magnética a uma temperatura próxima de 35 °C. Após este período, a temperatura do sistema foi reduzida para cerca de -10 °C e, ao atingir esta temperatura, foi adicionado 77 mL de água deionizada em pequenas alíquotas sob um controle rígido de temperatura para não superar os 50 °C, pois a adição de água ao sistema é extremamente exotérmica. O aquecimento foi cessado ao fim desta etapa, sendo adicionados 230 mL de água deionizada e 4 mL de H₂O₂. O sistema foi mantido por 4 dias sem agitação, o sobrenadante foi removido após este período e o restante centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavado com 500 mL de HCl 10% (v/v).

É fundamental ressaltar que durante o procedimento de lavagem e sucessivas centrifugações foram realizadas até a utilização dos 500 mL da solução de HCl. Posteriormente, a suspensão foi lavada sucessivas vezes com água deionizada até atingir um pH por volta de 6, sendo centrifugado a 15.000 rpm a 4 °C durante 30 minutos entre uma lavagem e outra. A suspensão obtida foi submetida à diálise durante 10 dias em uma membrana

de diálise Fisherband 12-14 kDa para a eliminação de coprodutos (impurezas) formados durante o procedimento sintético de obtenção da dispersão de óxido de grafeno. Por fim, a dispersão do óxido de grafeno (GO-Disp) foi submetida a dois processos de secagem diferentes: secagem a vácuo e liofilização. No sistema de secagem a vácuo¹⁰⁶, a dispersão foi transferida para um recipiente específico para secagem em temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e conectada ao sistema de secagem a vácuo durante 72 h. Para realização do processo de liofilização, a GO-Disp. foi previamente congelada em nitrogênio líquido ($\sim -196^{\circ}\text{C}$) e posteriormente transferida para o liofilizador (sistema Liotop, modelo k202) durante 72 h^{22,105}. Assim, três nanomateriais distintos a base GO diferentes foram obtidos: dispersão GO sem secagem (GO-Disp), liofilizado GO (GO-LP) e GO seco a vácuo (GO-VD) no estado sólido.

3.3 Funcionalização covalente do Óxido de grafeno (GO) com Ácido cloroacético

Visando aumentar o número de grupos funcionais carboxilas na superfície do óxido de grafeno, foi efetuada uma funcionalização com ácido cloroacético (reação 1, figura 1)¹⁰⁷. Para realizar esta funcionalização foi adicionado 15 g de ácido cloroacético na forma de sólido a 300 mL da dispersão de GO ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). Após a total solubilização do ácido, o pH da solução foi ajustado para aproximadamente 13 com hidróxido de sódio (NaOH) e a dispersão mantida por 3 h sob banho de ultrassom a uma temperatura compreendida entre 20 e 30 °C. Esta proposta de funcionalização consiste em uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (SN_2), em que o grupo hidróxil ataca o carbono ligado ao cloro, formando a ligação sigma com o carbono alfa carboxila, paralelamente ao rompimento da ligação deste carbono com o cloro que é liberado na forma de cloreto. Vale ressaltar que nem todos os grupamentos hidróxil presentes na superfície do GO estão desprotonados. Logo, visando favorecer a reação de funcionalização, foi adicionado o hidróxido, como mencionado acima, pois estes grupos quando desprotonados se tornam nucleófilos mais fortes.

Logo após, o pH foi ajustado para entre 3 e 4 com ácido clorídrico (HCl) para evitar a presença de cátions sódio interagindo com grupamentos oxigenados do GO que, em meio básico, podem estar desprotonados. Em seguida a dispersão é mantida em repouso por 12 h, o sobrenadante é extraído e a dispersão restante é centrifugada a 15000 rpm a 4 °C por 30 min, sendo retirado sempre o máximo de sobrenadante e lavada a dispersão resultante com água deionizada. Este procedimento de lavagem é realizado até a dispersão final atingir um pH entre 5 e 6, evitando estragar a membrana de diálise. Após este procedimento, a dispersão é dialisada por 10 dias em água deionizada e a dispersão final é secada utilizando-se o procedimento de liofilização por 72 h e posteriormente estocada em um dessecador a temperatura ambiente.

3.4 Funcionalização do óxido de grafeno com Flúor

A inserção de átomos de flúor ao óxido de grafeno foi realizada a partir da funcionalização covalente via reação de Hunsdiecker (reação 2, Figura 4)¹⁸. Segundo a literatura¹⁸, durante esta reação os átomos de flúor são adicionados a átomos de carbono sp^3 paralelamente a eliminação de grupos carboxilas na forma de CO_2 , ou seja, o maior o número de carboxilas na estrutura do GO favorecerá a inserção de átomos de flúor em sua estrutura. Tal fato justifica a utilização do GO funcionalizado com carboxilas (GO-COOH) a partir do procedimento relatado acima. Para a funcionalização, o GOCOOH foi disperso em água deionizada sob banho de ultrassom até a formação de uma dispersão homogênea, sendo adicionada massa equivalente à do GO-COOH de Selectfluor ($C_7H_{14}B_2ClF_9N_2$) e nitrato de prata ($AgNO_3$) em concentrações catalíticas, sob atmosfera inerte usando vidraria tipo Schelenk a uma temperatura de 90 °C por 12 h.

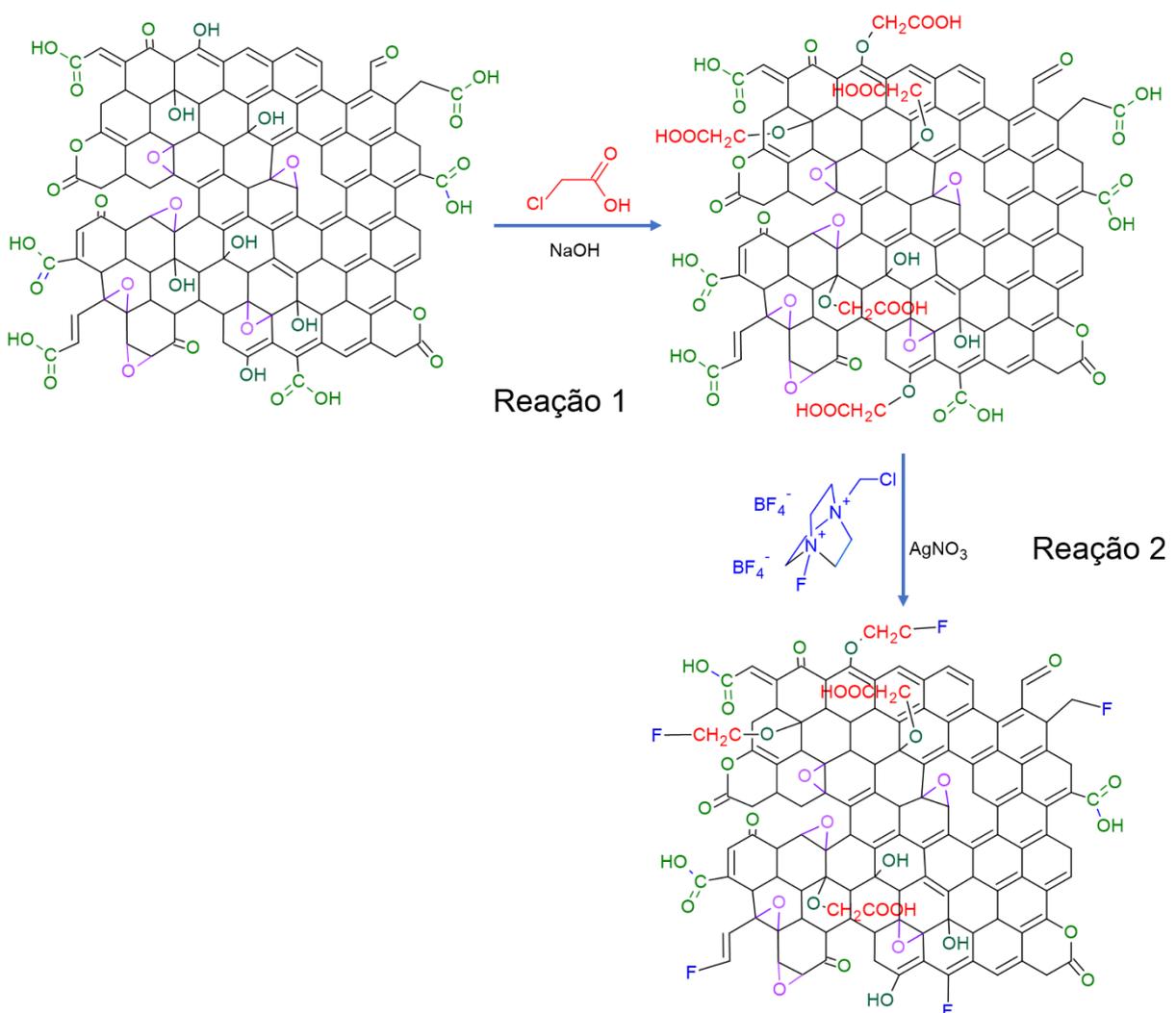


Figura 4. Fluxograma das etapas de funcionalização covalente do óxido de grafeno (GO) com ácido cloroacético (GO-COOH) e funcionalização do GO-COOH com Selectfluor (FG1). Adaptado¹⁸

3.5 Proposta inédita de funcionalização do óxido de grafeno com Flúor

Durante o desenvolvimento do projeto, foi proposto um novo procedimento sintético. Este procedimento de inserção de átomos de flúor ao óxido de grafeno foi realizado a partir da funcionalização covalente, em uma única etapa, via reação de Hunsdiecker (Figura 2)¹⁸. Para a funcionalização, o GO foi disperso em água deionizada sob banho de ultrassom até a formação de uma dispersão homogênea, sendo adicionado massa equivalente à do GO de Selectfluor ($C_7H_{14}B_2ClF_9N_2$) e nitrato de prata ($AgNO_3$) em concentrações catalíticas, sob atmosfera inerte usando vidraria tipo Schlenk a uma temperatura de 90 °C por 12 h. Este procedimento sugerido pelo nosso grupo, visa obter nanomateriais a partir de procedimentos que utilizem uma menor quantidade de reagentes e gerem menos resíduos. O procedimento adotado para a funcionalização do óxido de grafeno funcionalizado pelo novo procedimento sintético está representando na Figura 5. Destaca-se que, neste procedimento sintético, é observada a inserção de átomos de flúor associado tanto a descarboxilação quanto abertura de anéis epóxidos, conforme ilustrado na Figura 2.

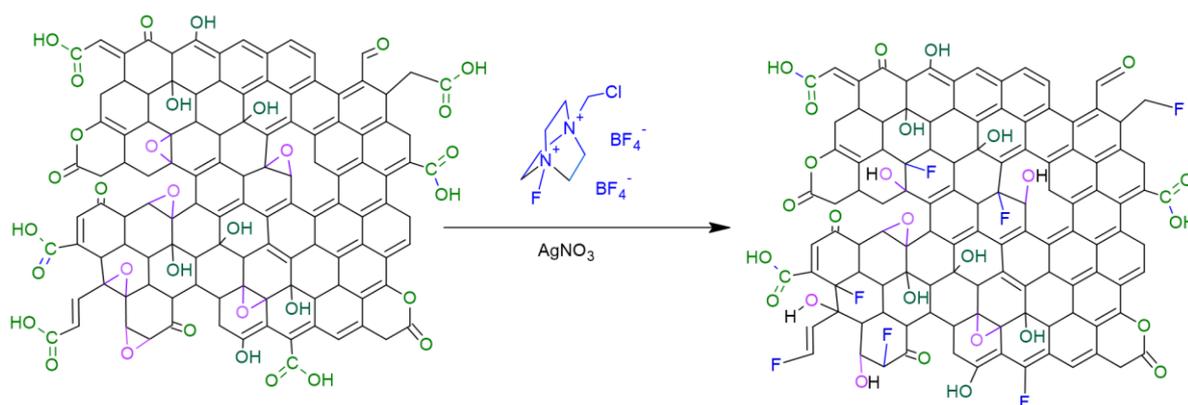


Figura 5. Representação da funcionalização covalente do óxido de grafeno (GO) funcionalização do GO-COOH com Selectfluor (FG2).

3.6 Caracterizações físico-químicas

A estrutura morfológica dos nanomateriais foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). TEM e MEV foram realizados respectivamente com um microscópio Zeiss Libra 120 acoplado a um espectrômetro

de filtro Omega com uma tensão de aceleração de 80 kV e equipamento Quanta FEG 250 (FEI / Thermo) operando a 2 kV acoplado a um detector de elétrons secundário (Everhart-Thornley) no modo de alto vácuo. A estrutura topológica do GO foi analisada por microscopia de força atômica (AFM) no modo de batimento, e as imagens foram tiradas em um Nanoscópio Multimodo III (Veeco) empregando cantilêveres revestidos com MESP (Bruker) Co-Cr (2,8 Nm^{-1} constante de força, 75 kHz frequência de ressonância nominal). As análises estruturais das amostras foram realizadas por difração de raios X (DRX) e espectroscopia Raman confocal. O DRX foi realizado em um difratômetro Shimadzu XRD-7000t com radiação de raios X Cu $K\alpha$ em um comprimento de onda de 1,54056 Å com um gerador de voltagem ajustado para 40 kV ($5^\circ < 2\theta < 50^\circ$) e uma taxa de varredura de 2°min^{-1} . Os grupos funcionais nas superfícies dos nanomateriais foram identificados por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13 (^{13}C RMN) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para as análises de RMN ^{13}C , os espectros foram obtidos em um sistema Bruker Avance 300 MHz usando o método High-Power Decoupling (HPDEC), $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$. A velocidade de rotação do porta amostra foi mantida constante (10 kHz), e um ângulo mágico de $54,74^\circ$ foi usado para todas as medições. Para as análises de FTIR, os espectros foram registrados usando um espectrômetro da série ABB Bomem MB (modelo FTLA2000-102) na faixa de 4000-400 cm^{-1} . As análises de espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) foram realizadas utilizando um espectrômetro Shimadzu UV 1650 PC com uma faixa de comprimento de onda de 190 a 900 nm. Os comportamentos de decomposição térmica do GO-VD e GO-LP foram avaliados por análise termogravimétrica (TGA-TA Instruments, modelo SDT Q600), empregando uma taxa de aquecimento de $10^\circ \text{C min}^{-1}$, desde a temperatura ambiente até 800 $^\circ\text{C}$, com um fluxo de ar sintético de 100 mL min^{-1} . Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro Raman T64000 (Horiba) com laser de 532 nm, filtro 1, largura de fenda de 100 μm , resolução de 2 cm^{-1} , objetiva 100x, potência de 0,5 mW, 3 varreduras e um acúmulo de 60 segundos. Os diferentes ambientes químicos aos quais os átomos de flúor se inseriram nos nanomateriais funcionalizados com este elemento, foram identificados por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de flúor-19 (RMN-MAS ^{19}F). Para as análises de RMN ^{13}C , os espectros foram obtidos em um sistema Bruker Avance 300 MHz usando o método High-Power Decoupling (HPDEC), $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$. A velocidade de rotação do porta amostra foi mantida constante (10 kHz), e um ângulo mágico de $54,74^\circ$ foi usado para todas as medições.

3.7 Preparo das soluções estoque de GO

Para os experimentos de estudos de estabilidade coloidal e biológicos, as amostras GO-VD e GO-LP (sólidas) foram redispersas em água ultrapura até a formação de uma dispersão homogênea por sonicação em banho de ultrassom (Cole-Parmer, modelo 08891-21) por 10 e 60 min respectivamente. A amostra GO-Disp (dispersão líquida) foi homogeneizada por agitação e sonicada por 1 min.

3.8 Estudo da estabilidade e determinação do potencial zeta

3.8.1 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS)

A técnica de Espalhamento Dinâmico (DLS) é uma técnica, tomando como um de seus fundamentos o movimento browniano de nanopartículas suspensas em dispersões coloidais, é amplamente utilizada para determinar o tamanho e as velocidades cinéticas destas nanopartículas nestas dispersões. Vale ressaltar que os resultados são referentes ao diâmetro das esferas que se difundem¹⁰⁸. Mesmo sendo uma técnica em que seus fundamentos estão baseados em sistemas esféricos, é utilizada amplamente pela comunidade científica para estimar o raio hidrodinâmico de sistemas 2D. Tal fato, ocorre devido a uma escassez de técnicas para efetuar tais medidas nestes sistemas bidimensionais.^{45,52,65,105}

A técnica de DLS consiste em incidir um laser sob a dispersão contendo nanomateriais suspensos e, através da distribuição média das intensidades de espalhadas, estima-se o tamanho destes nanomateriais. O cálculo relaciona para determinar o raio hidrodinâmico se baseia na relação entre a velocidade de difusão das nanopartículas com o tamanho das mesmas, através da correlação de Stokes-Einstein, conforme ilustrado na equação 1.^{45,52,65,105}

$$DH = \frac{KT}{6\pi\eta D} \quad \text{Equação 1}^{108}$$

Onde:

DH: Diâmetro Hidrodinâmico

K: Constante de Boltzmann

T: Temperatura absoluta

η : Viscosidade

D: Coeficiente de difusão translacional

3.8.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta é uma técnica amplamente utilizada para obter informações frente a tendência que nanopartículas possuem de agregar, sendo uma ferramenta importante para se avaliar a estabilidade de dispersões coloidais. Considera-se que, quando uma dispersão possui valores de potencial zeta superiores a 30 mV ou inferiores a -30mV, o sistema é mais estável. A correlação entre potencial zeta e estabilidade de dispersões coloidais é feita a partir da teoria proposta pelos cientistas Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek em 1940.¹⁰⁸ Esta teoria propõe que a estabilidade das dispersões coloidais está diretamente ligada sua energia potencial total. Ou seja, a estabilidade coloidal é determinada a partir das forças atrativas e repulsivas existente entre os nanomateriais suspensos e, quando a energia atrativa supera a repulsiva, os nanomateriais se unem e formam agregados. As medidas de potencial zeta é baseada na junção da eletroforese e laser doppler. Logo, ao aferir o a cinética de um nanomaterial em um determinado meio ao se aplicar um campo elétrico, é possível determinar seu potencial zeta a partir da equação de Henry (equação 2). No entanto, é necessário se conhecer o valor do campo elétrico aplicado, a viscosidade do meio e a constante dielétrica da amostra.¹⁰⁸ Como o DLS, o potencial zeta é amplamente utilizado para estimar a estabilidade de dispersões coloidais de sistemas 2D.^{45,52,65,105}

$$UE = \frac{2\varepsilon Zf(ka)}{3\eta} \quad \text{Equação 2}^{108}$$

Onde:

UE: Mobilidade eletroforética

Z: Potencial zeta

ε: Constante dielétrica

η: Viscosidade

f(ka): Função de Henry

3.8.3 Determinação da estabilidade e determinação do potencial zeta do óxido de grafeno seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP)

A estabilidade das dispersões dos nanomateriais GO foram avaliadas a partir do monitoramento do comportamento de agregação/aglomeração e deposição por DLS e espectroscopia UV-Vis, respectivamente. Para avaliar a agregação/aglomeração por DLS, o GO-Disp., GO-VD e GO-LP, na presença ou ausência do revestimento proteico (proteínas plasmáticas do sangue), os nanomateriais foram dispersos em água ultrapura e PBS, com uma concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em seguida, os raios hidrodinâmicos (HD) e o índice de polidispersidade (PDI) foram medidos em 0, 1, 3 e 24 h. A medida do potencial zeta foi realizada para cada dispersão dos GOs citados acima no tempo 0 h. Para medidas de UV-Vis, os nanomateriais GO-VD, GO-LP e GO-Disp e os GOs revestidos com as proteínas mais fortemente adsorvidas (corona dura) também foram ressuspensos em água ultrapura ou PBS a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, e a absorvância do sobrenadante foi medida às 0, 1, 3 e 24 h, no comprimento de onda de 300 nm.

3.9 Ensaios de formação da protein corona

O plasma humano processado (tipo O⁺) preservado em sacos plásticos de transfusão sanguínea foi fornecido pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina da Unicamp, Unicamp, Campinas-SP. Dispersões estoque do GO-Disp, GO-SV e GO-LP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram incubadas com 55% de plasma humano em PBS pH 7,4 (Microtubos Eppendorf “LoBind” 1,5 mL) por 60 min em um misturador horizontal (14 rpm) a 37 °C (Thermo-bloco Eppendorf). Após a interação das amostras de GO com o plasma humano, os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 60 min a 4 °C (centrífuga Eppendorf, modelo 5810R) e lavados três vezes com solução de PBS pH 7,4 para remover a *soft corona* (proteínas plasmáticas que interagem mais fracamente com a superfície dos nanomateriais). Após este procedimento, os nanomateriais com a corona dura (proteínas plasmáticas que interagem substancialmente com a superfície dos nanomateriais) foram obtidos e denominados GO-Disp@HC, GO-SV@HC e GO-LP@HC. As proteínas da corona dura foram extraídas da superfície dos nanomateriais utilizando-se tampão de corrida (New England BioLabs, Ipswich, EUA) e 20 μL das soluções proteicas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS. A coloração das bandas proteicas foi visualizada utilizando-se o azul de Coomassie. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

3.10 Ensaios hemolíticos

O concentrado de hemácias humano processado (tipo O⁺) preservado em sacos plásticos de transfusão sanguínea foi fornecido pelo Hemocentro da Faculdade de Medicina da Unicamp, Unicamp, Campinas-SP. Para os ensaios hemolíticos, uma dispersão contendo hemácias foi preparada a partir de uma alíquota de 5 mL de sangue e 40 mL de uma solução de PBS pH 7,4 (pH sanguíneo). A dispersão foi homogeneizada manualmente e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (concentrado de hemácias) lavado duas vezes utilizando o procedimento de centrifugação, sempre retirando o sobrenadante e ressuspendendo em solução de PBS. A suspensão final utilizada para os testes de hemólise consistiu-se em hemácias (ou células vermelhas do sangue, CVSs) a 10% (v / v) em uma solução de PBS pH 7,4 para preservar a integridade das células.

Para estimar o efeito hemolítico, diferentes concentrações do óxido de grafeno em dispersão (GO-Disp), óxido de grafeno seco na bomba de vácuo (GO-VD) e óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) foram incubadas com hemácias em microtubos Eppendorf de 1,5 mL. Para cada nanomaterial foram utilizadas seis diferentes concentrações (10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg mL⁻¹), diluídos em solução de PBS pH 7,4. As amostras foram incubadas com as hemácias por 1h, centrifugados durante 10 min a 10 000 rpm a 4 °C. A quantificação de hemoglobina no sobrenadante de uma mistura de eritrócitos-nanomateriais foi realizada registrando-se a absorvância da hemoglobina por espectroscopia UV-Vis a 540 nm (modelo Thermo, Mullikan GO).

O controle positivo foi preparado incubando-se 100 µL de concentrado de hemácia a 10% com 900 µL de água deionizada e o controle negativo foi preparado incubando-se 100 µL de concentrado de hemácia a 10% com 900 µL de uma solução de PBS a pH 7,4. A estimativa da porcentagem de células hemolisadas foi calculada utilizando a equação linear $y = mx + c$, onde a porcentagem de células hemolisadas (x) = $[\text{densidade óptica (y)} - \text{densidade óptica de controle negativo (c)}] / [(\text{densidade óptica de controle positivo}) - \text{densidade óptica de controle negativo}] / 100$ (m). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes. A análise estatística foi realizada por análises de variância (ANOVA) de um e dois fatores. O teste post hoc de Tukey foi utilizado para comparar as diferenças, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1 Caracterização do óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e Liofilizado (LP)

Uma caracterização físico-química integrada é crucial para entender o impacto dos processos de secagem nas propriedades físico-químicas do GO (morfologia, estrutura de estado sólido, grau de oxigenação, comportamento térmico, número de nanofolhas e outros). As imagens de MEV do GO-LP e GO-VD mostraram diferenças morfológicas na macroestrutura no estado sólido (Figura 6A-F). A amostra GO-VD TEM uma estrutura similar a um filme (Figura 3D, E e F) que é mais compacta e organizada do que a do GO-LP (Figura 6 A, B e C), que mostram uma estrutura porosa menos organizada. Tal diferença pode ser justificada pelo fato de que ao submeter o nanomaterial ao processo de liofilização, um congelamento em nitrogênio líquido (aproximadamente $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) é efetuado. Nesse processo as moléculas de água aumentam o espaço interplanar das folhas de grafeno¹⁰⁹ e são removidas subsequentemente através da aplicação de vácuo. Como a água encontra-se no estado sólido, contribuindo com maior espaçamento interplanar devido ao seu aumento de volume associado ao seu estado físico, o gelo contribui com a formação de vacâncias devido à sua dureza e ao maior espaço entre os planos do GO. Tal fato interfere diretamente no empilhamento deste nanomaterial na direção *c* (direção de *stacked* das nanofolhas), originando um nanomaterial mais poroso quando comparado com o GO-VD (Figura 6 A-F). Diferentemente do GO-LP, o GO-VD possui uma maior mobilidade pois não necessita ser submetido a uma etapa de congelamento. Tal mobilidade confere ao sistema condições adequadas para se reorganizar. Durante o procedimento de secagem as folhas de GO se sobrepõem umas às outras de forma mais organizada na direção *c*. Em contraste, as imagens de TEM mostraram a presença de nanofolhas de GO em monocamada e poucas camadas (Figura 6G, 6H e 6I), não sendo possível identificar diferenças morfológicas significativas na estrutura morfológica das nanofolhas de GO dos nanomateriais. As diferenças existentes entre o GO-VD e GO-LP são observadas apenas quando se TEM o empilhamento de um número considerável de nanofolhas de GO na direção *c*, como observado no MEV ou visualmente sem o auxílio de técnicas de caracterização físico-químicas. Ou seja, tais diferenças são perceptíveis quando se forma a macroestrutura 3D dos GOs no estado sólido em decorrência de uma organização tridimensional diferente das nanofolhas na direção *c*.

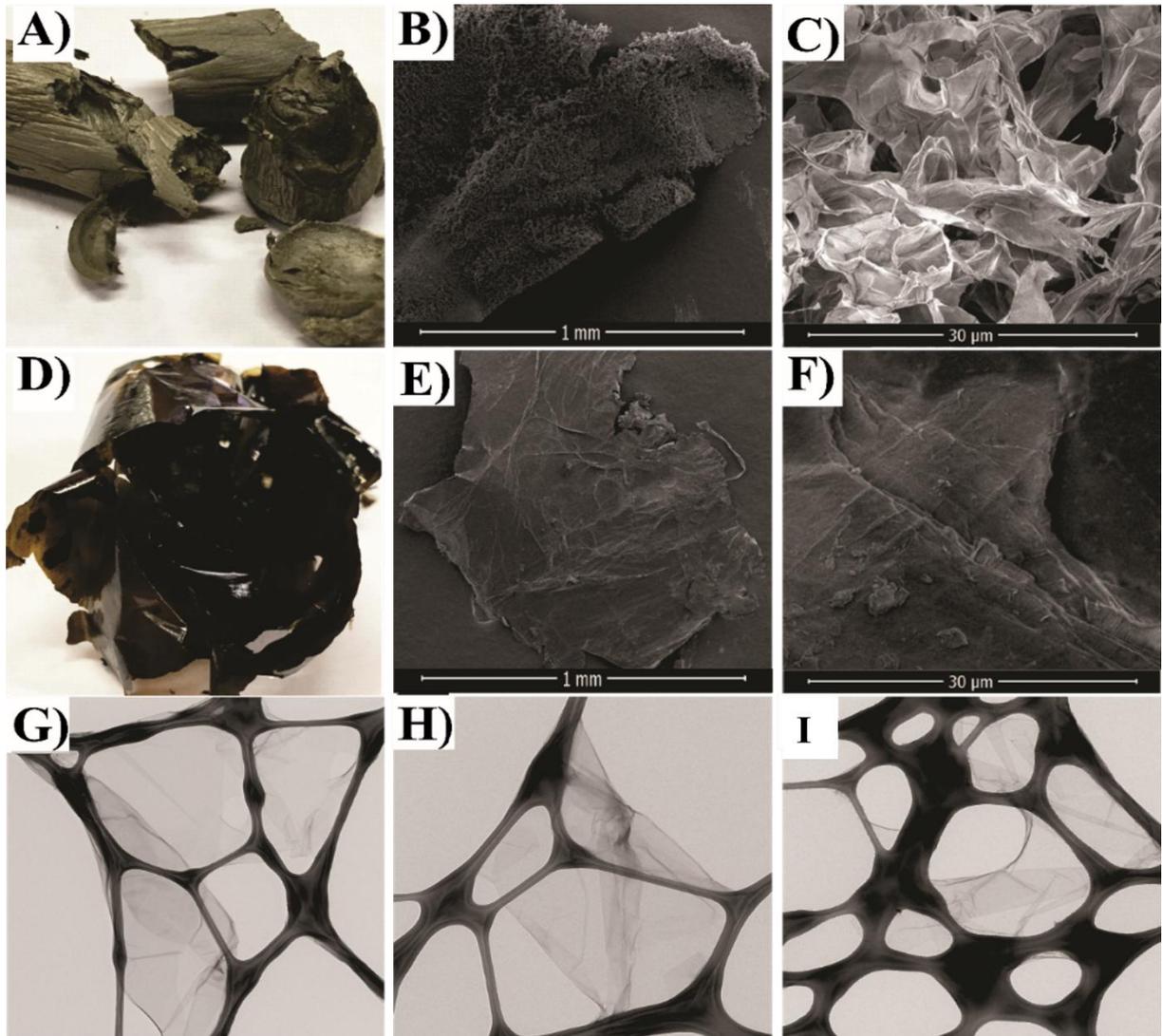


Figura 6. Fotos digitais (A) óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) e (D) óxido de grafeno seco a vácuo (GO-VD); imagens de MEV de GO-LP (B e C) e GO-VD (E e F); e imagens de TEM de (G) dispersão de óxido de grafeno antes do processo de secagem (GO-Disp), (H) GO-VD e (I) GO-LP.

As imagens de AFM (Figura 7A) e histogramas (Figura 7B) mostraram folhas GO com dimensões laterais na faixa de micrômetros e espessuras médias de $1,51 \text{ nm} \pm 0,93$ (GO-Disp), $1,85 \pm 1,45$ (GO-VD) e $1,69 \text{ nm} \pm 1,22$ (GO-LP) indicando a esfoliação de todas as amostras GO em monocamadas e poucas camadas¹⁰⁵. Estudos anteriores mostraram que a camada única de GO e uma folha plana de grafeno ideal têm espessuras de 0,8 nm e 0,34 nm, respectivamente¹¹⁰. Esses valores poderiam ser justificados pela funcionalização covalente dos átomos de carbono durante o processo de oxidação para a síntese de GO, que transformam alguns átomos de carbono com hibridização sp^2 e geometria trigonal plana em átomos de

carbono com hibridização sp^3 distorcida (trigonal planar) por formação de ligações covalente com átomos de carbono e oxigênio.^{22,111,110}

A presença de grupos oxigenados em ambos os lados das camadas de GO aumenta a altura da grade de carbono.^{22,111} O tratamento com sonicação TEM se mostrou uma estratégia útil para esfoliar completamente as folhas GO.²² No entanto, as amostras GO-Disp, GO-VD e GO-LP exigiram 1, 10 e 60 min sob sonicação, respectivamente, para serem redispersas em água. Adicionalmente, as imagens AFM após serem tratadas com o software Gwyddion revelaram a área média (Figura 7C) do GO-Disp ($9,24 \mu\text{m}^2 \pm 10,58$), GO-VD ($0,86 \mu\text{m}^2 \pm 0,92$) e GO-LP ($0,511 \mu\text{m}^2 \pm 0,43$), sugerindo que o tamanho das nanofolhas GO estão intimamente associados ao tempo de sonicação.^{45,39}

O histograma (Figura 7C) das áreas GO, no GO-Disp mostrou que mais da metade das folhas têm áreas maiores que $4 \mu\text{m}^2$ ($\sim 59\%$), com uma minoria com menos de $1 \mu\text{m}^2$. GO-VD possui 70% de folhas menores que $1 \mu\text{m}^2$, 17% de folhas com valores entre 1 e $2 \mu\text{m}^2$ e 13% de folhas com valores superiores a $2 \mu\text{m}^2$. Finalmente, GO-LP possui 85% de folhas menores que $1 \mu\text{m}^2$ e 15% entre 1 e $2 \mu\text{m}^2$. Na verdade, GO-Disp possui uma diferença de valor de área maior do que GO-VD e GO-LP. À medida que a sonicação se processa, as diferenças entre as áreas das folhas GO-VD e GO-LP passam a exibir reduções significativas, indicando que o aumento do tempo do processo de sonicação faz com que as folhas maiores dos materiais quebrem mais facilmente.

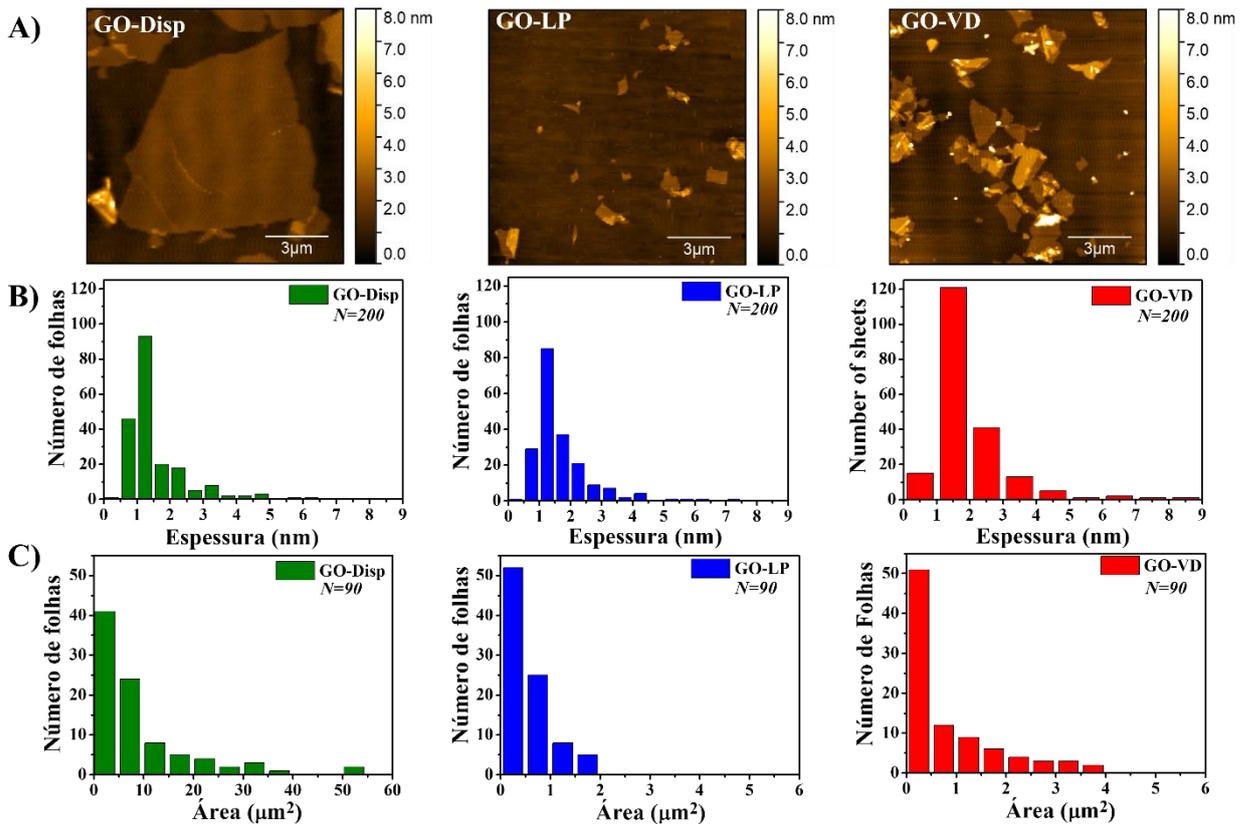


Figura 7. Imagens de microscopia de força atômica (A), histograma da espessura (B) e área (C) dispersão de óxido de grafeno antes do processo de secagem (GO-Disp), grafeno seco a vácuo (GO-VD) e grafeno liofilizado (GO-LP).

A Figura 8A mostra a representação esquemática da distribuição espacial das folhas GO antes e depois do processo de secagem (liofilização ou secagem a vácuo). Os padrões de DRX de GO-VD e GO-LP (Figura 5B) mostram um pico de difração característico do plano (002) do GO em $2\theta = 10^\circ$.¹⁰⁵ Utilizando a equação de Bragg (equação 3) para calcular a distância interplanar (d_{002}) em ambos os nanomateriais GO, observa-se que GO-VD e GO-LP possuem distância interplanares semelhantes (0,84 nm). Esta distância é resultado dos grupos oxigenados introduzidos durante o processo de oxidação do grafite para a síntese de GO.^{22,105}

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

$$\text{Equação 3}^{91}$$

Onde:

N: Ordem da reflexão

Λ : Comprimento de onda

D: Distância entre os planos atômicos (distância interplanar)

θ : Ângulo de Bragg

Além disso, o DRX é uma técnica poderosa para estimar a espessura (Tc) de nanomateriais 2D, que é definida pelo número de camadas (NL).¹¹²⁻¹¹⁴ O Tc do GO pode ser estimado pela equação de Scherrer (equação 4), em que o número de camadas é expresso como $NL = Tc/d_{002}$.¹¹²⁻¹¹⁴ GO-VD e GO-LP têm espessuras de 8 e 6 nm e aproximadamente 9 e 7 camadas, respectivamente.¹¹²⁻¹¹⁴

$$Tc = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 4}^{100}$$

Onde:

Tc: Altura média do cristalito (nanofolhas de GO)

Λ : Comprimento de onda

B: Largura a meia altura do pico e θ é o angulo de Bragg

Adicionalmente, a diferença na intensidade do pico de difração em $2\theta = 10^\circ$ sugere que o GO-VD apresentou uma estrutura mais organizada do que o GO-LP, corroborando as observações do MEV (Figura 6B, 6C, 6E e 6F). A maior organização das camadas empilhadas aumenta a intensidade do pico de DRX, o que também foi observado anteriormente por Akbary et al.¹¹⁵.

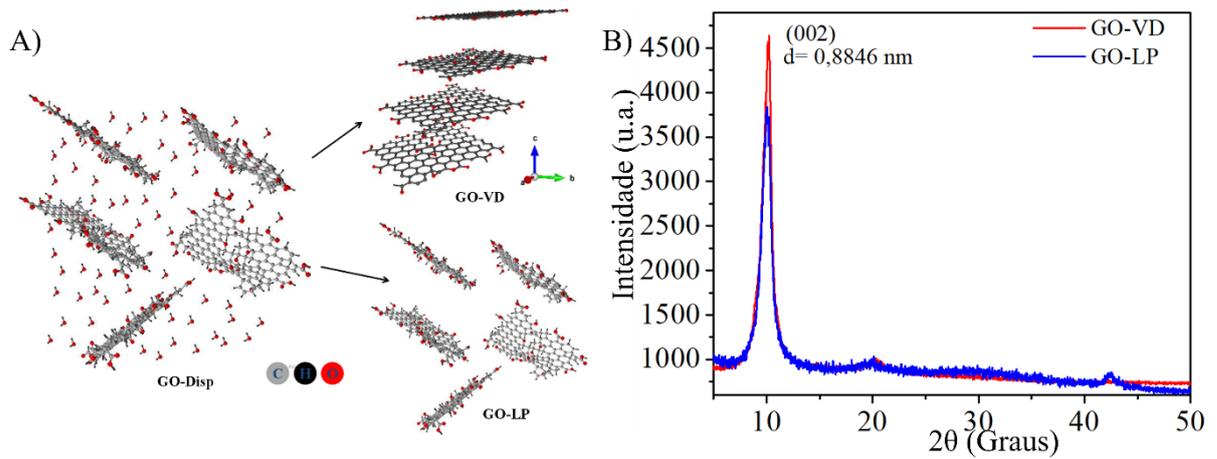


Figura 8. Esquema da dispersão do óxido de grafeno (GO-Disp) antes do processo de secagem e após secagem à vácuo (GO-VD) e liofilização (GO-LP) (A). Caracterização físico-química dos materiais de óxido de grafeno: padrão de DRX de GO-VD e GO-LP (B).

Os grupos funcionais presentes nas superfícies do GO-VD (Figura 9A) e GO-LP (Figura 9B) foram caracterizados por espectroscopia de RMN. Os espectros mostram a presença de grupos funcionais de ácido carboxílico (O-C=O, 166 ppm), cetona (192 ppm), carbono hibridizado sp^2 (C=C, 130 ppm), lactol (100 ppm), hidroxila (C-OH, 70 ppm), epóxido (C-O-C, 59 ppm) e grupos funcionais orgânicos de carbono hibridizado com sp^3 (17 ppm) em ambos os nanomateriais.^{11,105} O espectro de RMN do GO-VD mostra uma maior intensidade dos picos C-OH e C-O-C em relação ao pico C=C ($\Delta 1$) do que GO-LP ($\Delta 2$). Este resultado sugere a presença de um maior número de espécies oxigenadas no GO-VD do que no GO-LP. O aumento significativo da intensidade do pico C=C associado a diminuição da intensidade dos picos C-O-C e C-OH no GO-LP sugerem que o processo de liofilização causa uma redução do GO quando comparado ao processo de secagem a vácuo.

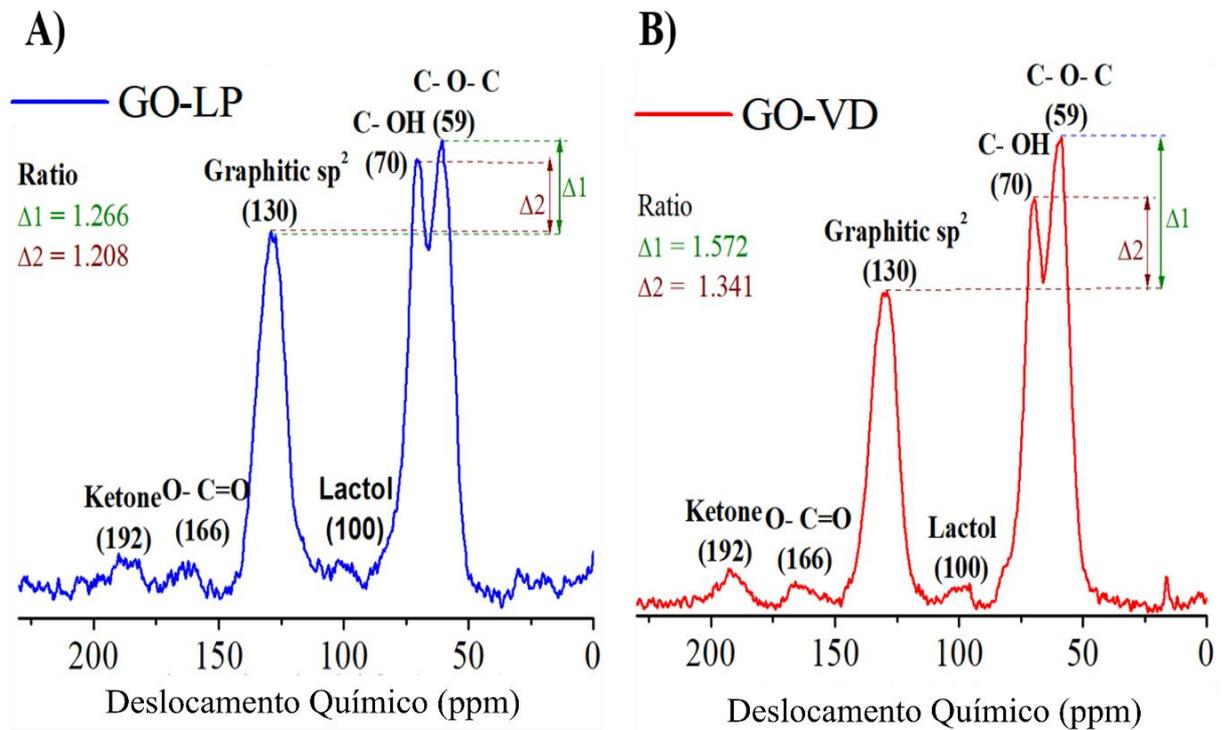


Figura 9. Espectros de espectroscopia de RMN de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) (A) e liofilizado (GO-LP) (A).

Os espectros de FTIR do GO-LP e GO-VD (Figura 10 e Tabela 1) apresentaram um fenômeno semelhante ao observado na análise de RMN de ^{13}C . A espectroscopia de RMN é uma técnica poderosa para a caracterização de GO, embora possua algumas desvantagens. A maior delas está relacionada à necessidade de longos períodos de acumulação do sinal, devido à baixa abundância natural de ^{13}C (1,1%).¹¹⁶ Além disso, o RMN de ^{13}C detecta apenas espécies químicas diretamente ligadas às estruturas das nanofolhas de carbono, ou seja, todas as outras espécies não diretamente ligadas a grade de carbono não são observadas¹¹⁶, reduzindo a sensibilidade na detecção de outras espécies químicas tais como impurezas, etc. Esta técnica possui limitações frente a análise elementos ferromagnéticos e/ou paramagnéticos, inviabilizando o seu uso na caracterização de diversos nanocompósitos baseados em GO. Por essas razões, a espectroscopia FTIR também foi utilizada para caracterizar grupos funcionais na superfície dos nanomateriais.¹¹⁶ Em comparação com a espectroscopia de RMN de ^{13}C , o FTIR é uma técnica mais disseminada, acessível e mais rápida para caracterização GO.¹¹⁶

Os espectros de infravermelho (Figura 10 e Tabela 1) mostram a presença de grupos funcionais oxigenados (grupos epóxidos, hidroxila e carboxila) nas superfícies GO-VD e GO-LP e uma banda com maior intensidade referentes ao estiramento carbono sp^2 (C=C) em 1606

cm^{-1} .^{117,118} A intensidade relativa das bandas referentes aos estiramentos $\nu\text{C}=\text{C}$ (1606 cm^{-1}) e $\nu\text{C}=\text{O}$ (1720 cm^{-1}) nos espectros de FTIR, podem ser utilizados para estimar qual dos dois nanomateriais possuem maior grau oxigenação.^{117,118} O GO-VD apresenta uma maior intensidade de banda em 1720 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{O}$) e menor intensidade de banda em 1606 cm^{-1} ($\nu\text{C}=\text{C}$) do que GO-LP. Logo, estes resultados sugerem que a dispersão GO seca pelo processo de liofilização (GO-LP) apresentou maior quantidade de carbono com hibridização sp^2 e menor quantidade de grupos carboxila do que a dispersão GO seca a vácuo (GO-VD). Os resultados de FTIR e ^{13}C NMR confirmaram que os processos de secagem influenciaram o grau de espécies oxigenadas na superfície do óxido de grafeno e que a liofilização (GO-LP) causou maior redução dos grupos funcionais oxigenados na superfície das nanofolhas de GO do que a secagem a vácuo (GO-VD).

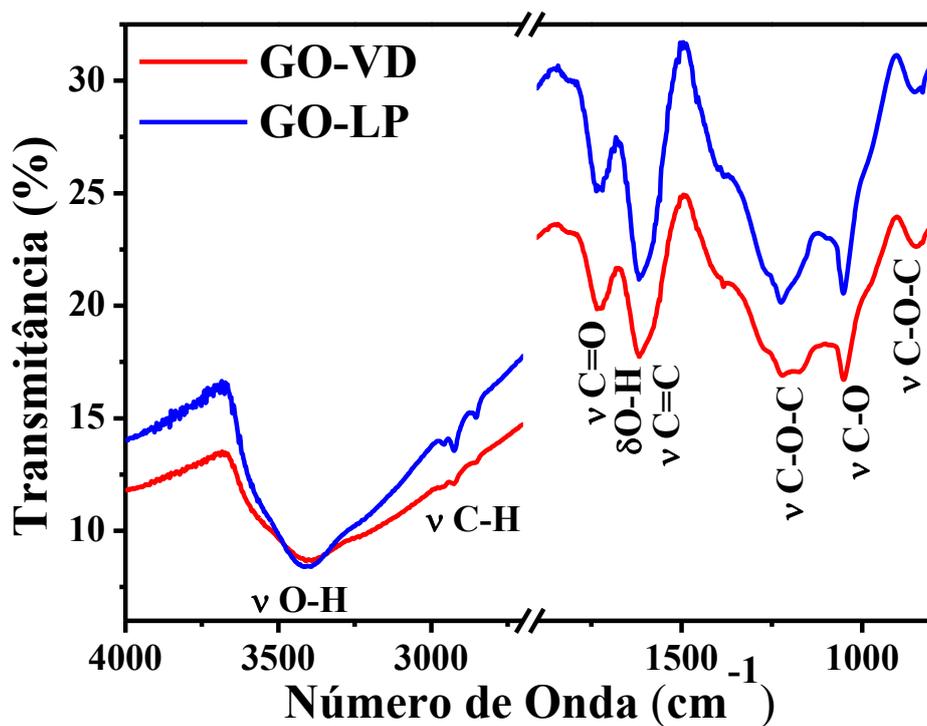


Figura 10. Espectros de FTIR de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP).

Tabela 1. Comprimentos de onda, modos vibracionais e grupos funcionais presentes nos espectros de FTIR do GO-VD e GO-LP^{117,118}

| Grupos Funcionais | GO-VD (cm ⁻¹) | GO-LP (cm ⁻¹) |
|-------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ν C-O (Hidroxila, folhas de GO) | 1040 | 1040 |
| δ O-H (Hidroxila, folhas de GO) | 1373 | - |
| ν C-O-C (epóxi) | 1221 | 1221 |
| δ O-H (Ácido carboxílico) | 1635 | 1635 |
| ν C=O (Ácido carboxílico) | 1724 | 1728 |
| ν C=C (Carbono sp ²) | 1606 | 1619 |
| ν O-H (Ácido carboxílico, hidroxila e água) | 3000-3650 | 3000 -3650 |

Os espectros UV-Vis do GO (Figura 11) após ser redisperso em água apresentam duas regiões características: uma banda de absorção em aproximadamente 231 nm foi atribuído à transição eletrônica π - π^* relacionada aos átomos de carbono hibridizados sp² (C=C) e um ombro em 300 nm relacionado à transição eletrônica n- π^* do grupo funcional carbonila (C=O).^{119,120} Os perfis de transição eletrônica espectral similares de GO-Disp e GO-VD sugerem que as superfícies químicas desses nanomateriais e suas interações com a água são semelhantes. No entanto, GO-LP possui um perfil diferente de GO-VD e GO-Disp. Essas diferenças podem ser observadas a partir do formato da banda que aparece em aproximadamente 239 nm, indicando que os átomos de carbono hibridizados com sp² (C=C) estão em um ambiente químico distintos e que a intensidade mais baixa no ombro em 300 nm sugere que os números de grupos carbonil foi reduzido quando comparado ao GO-VD e GO-Disp^{119,120}. Levando em consideração esses resultados, é possível concluir que existe uma relação direta entre o comportamento eletrônico das amostras de GO e a forma pelas quais são processadas (liofilizadas ou secas a vácuo). Os resultados obtidos pelas técnicas de RMN, FTIR e UV-Vis associadas à coloração da dispersão aquosa do GO-LP mais escura que a do GO-VD (Figura 12) confirmam que o processo de liofilização leva à redução do GO.^{121,122}

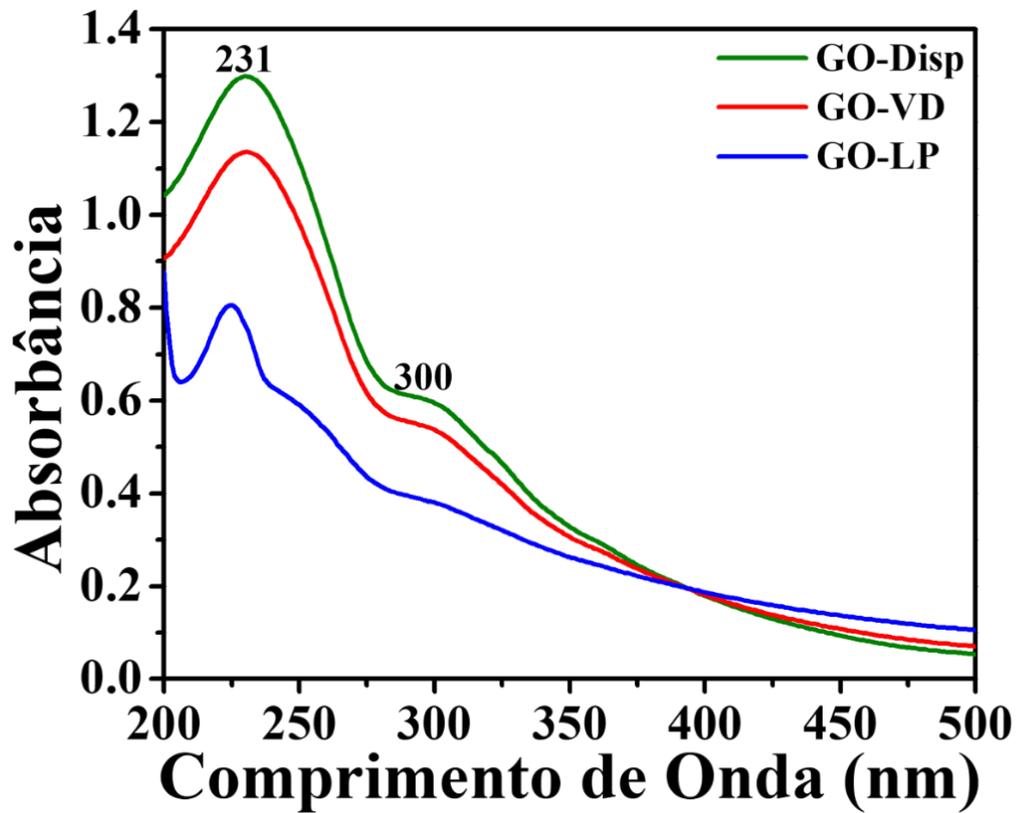


Figura 11. Espectros de espectroscopia de UV-Vis de óxido de grafeno sem ser submetido a procedimento de secagem (GO-Disp), óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e óxido de grafeno liofilizado (GO-LP).



GO-VD



GO-LP

Figura 12. Dispersão aquosa (1 mg mL^{-1}) obtida a partir da redispersão de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e liofilizado - GO-LP.

As Figuras 13A e 13B mostram os perfis de decomposição térmica do GO-VD e GO-LP. A primeira observação térmica nas curvas TGA até 120 °C é atribuída à perda de água adsorvida, cerca de ~14,9% para ambas as amostras GO.^{36,105} O GO-VD e o GO-LP apresentaram perda de massa de aproximadamente 38%, o que foi atribuído à decomposição de grupos oxigenados e moléculas de água aprisionadas entre as camadas de GO, entre 122 °C e aproximadamente 300 °C.^{36,105} A decomposição da estrutura grafítica (átomos de carbono sp^2) de GO-VD e GO-LP terminam a 626 °C e 584 °C, respectivamente.^{36,105} Esses resultados indicam uma maior estabilidade térmica do GO-VD do que do GO-LP, uma vez que o GO-VD apresentou eventos térmicos que terminaram em temperaturas consideravelmente mais altas. Uma possível explicação para este fenômeno é a maior porosidade da amostra GO-LP que favorece um maior contato das folhas GO com o oxigênio presente no ar sintético (atmosfera de análise), acelerando a reação de degradação (combustão) da estrutura grafítica.

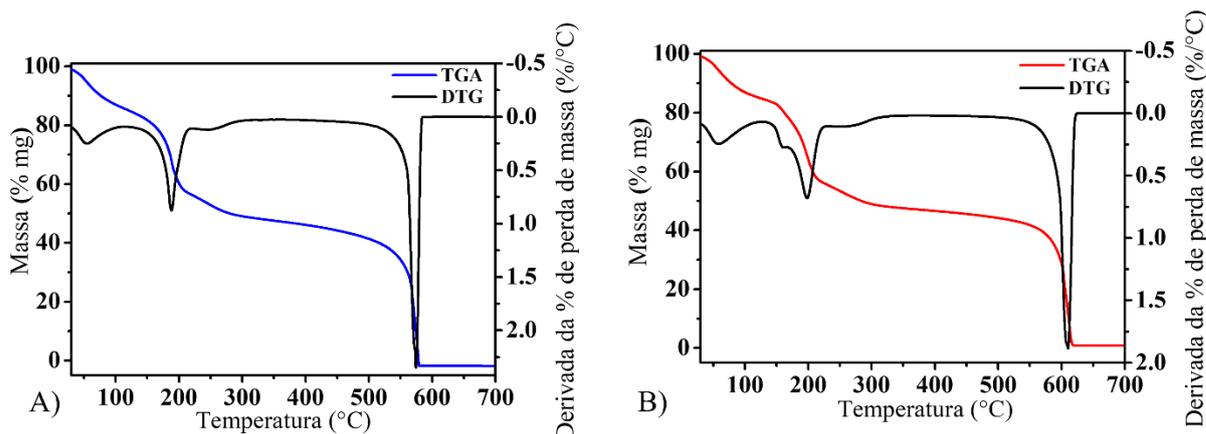


Figura 13. Curvas TGA e DTG de óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) (A) e curvas TGA e DTG de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) (B).

Geralmente, os espectros Raman do óxido de grafeno apresentam duas bandas características (G, D e 2D). A banda G ($\sim 1580\text{ cm}^{-1}$) é atribuída aos átomos de carbono hibridizados com sp^2 na estrutura.^{123,124} A banda D ($\sim 1350\text{ cm}^{-1}$) está relacionada aos defeitos nas estruturas do grafeno. Normalmente, as intensidades dessas bandas são usadas para estimar o grau de defeitos em estruturas de nanomateriais à base de carbono, e qualquer quebra de simetria em uma estrutura de carbono infinita é considerada um defeito.^{123–125} A similaridade relativa na razão de intensidade entre as bandas D e G (ID/IG) nos espectros Raman (Figura 14) de GO-VD (1,00) e GO-LP (1,03) sugerem que o número de defeitos em ambos nanomateriais são similares. Os defeitos das nanofolhas de GO-VD e GO-LP podem estar

associados à maior quantidade média de espécies oxigenadas na superfície e às vacâncias deixadas (*dangling bonds*) pelas espécies oxigenadas, respectivamente. Uma possível explicação, é que ao ser restaurada a ligação covalente entre os átomos de carbono, após a perda dos grupos oxigenados das superfícies da folha GO-LP, a simetria hexagonal não é restaurada, justificando assim as quantidades semelhantes de defeitos (ou seja, valores de razão ID/IG) observados para GO-VD e GO-LP.¹²³⁻¹²⁵

Gómez-Navarro et al. mostrou a partir de seu trabalho utilizando microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução que após a redução do óxido de grafeno, a ligações carbono- carbono com hibridização sp^2 , algumas regiões não a simetria hexagonal. Logo, durante o processo de redução, este nanomaterial passa a apresentar agrupamentos de defeitos topológicos que induzem uma tensão e possíveis tensões no e fora do plano. Tais defeitos, devem ser levados em consideração nos estudos frente as propriedades dos nanomateriais provenientes da redução do GO.¹²⁶

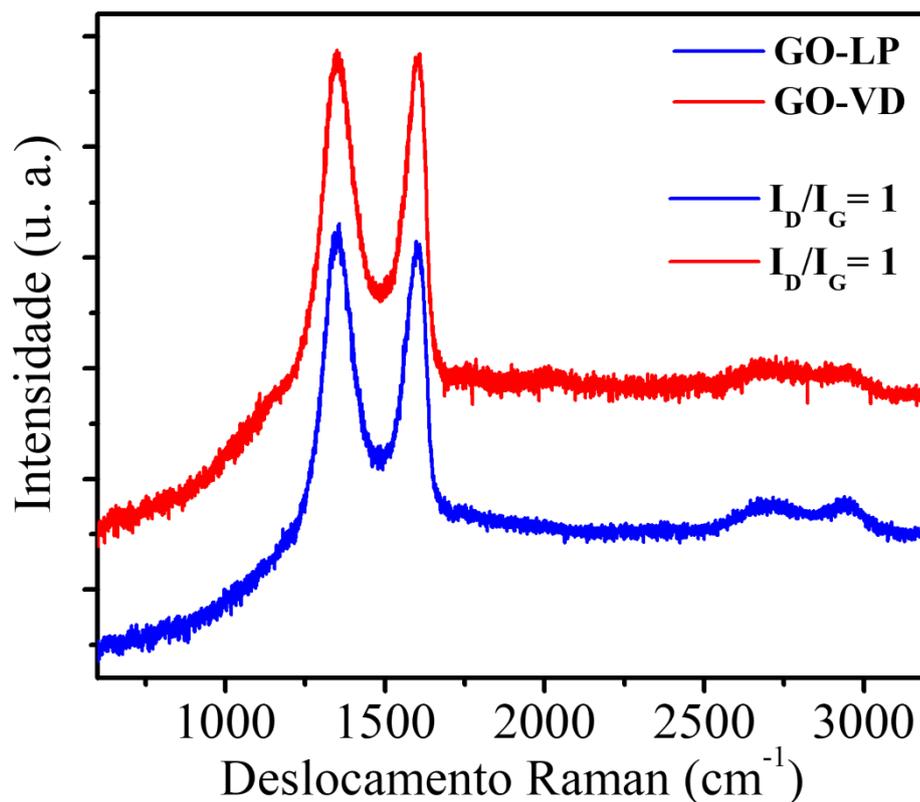


Figura 14. Espectros Raman de óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) (A) e de óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) (B).

4.2 Estudo da estabilidade e determinação do potencial zeta do óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e liofilizado (LP).

As propriedades dos nanomateriais podem ser criticamente impactadas pelo meio que os circundam, influenciando suas interações com sistemas biológicos.^{55,127,128} Assim, avaliamos o comportamento dos nanomateriais GO nos meios utilizados para ensaios biológicos, na presença e ausência de uma proteína corona.

A agregação/aglomeração de materiais GO foi investigada monitorando seu diâmetro hidrodinâmico (DH) em água ultrapura e PBS, com e sem uma corona dura previamente formada (Figura 15). Pelos valores de DH obtidos em água ultrapura, observou-se que GO-Disp. apresentou maior HD (1341 ± 177 nm) em comparação com GO-VD (642 ± 35 nm) e GO-LP (396 ± 29 nm). Isso pode ser explicado pela etapa de sonicação empregada para redispersar os materiais GO secos em água, o que poderia ter quebrado as nanopartículas do GO, reduzindo sua área média e tamanho lateral.^{38,129-131} Além disso, esses valores de DH foram mantidos ao longo do tempo (por 24 h), demonstrando sua alta estabilidade na água. Todos os nanomateriais GO mostraram um aumento significativo de sua DH quando dispersos em PBS, indicando sua aglomeração em função da composição do meio e do tempo de incubação, devido à alta força iônica do PBS que leva à aglomeração de GO, diminuindo as forças eletrostáticas repulsivas.¹³²

Finalmente, os materiais GO previamente revestidos por uma corona dura responderam de maneira distinta em relação à sua estabilidade coloidal. A formação da proteína corona pode levar a fenômenos opostos: a estabilidade da dispersão GO por um efeito de impedimento estérico realizado pelo revestimento protéico¹³³; ou a aglomeração devido a interações proteína-proteína, o que compromete a estabilidade da dispersão GO¹³⁴. O GO-Disp e GO-VD apresentaram um aumento no seu valor de DH na presença de uma corona dura em comparação com suas dispersões na água, sugerindo que a formação da proteína corona leva à aglomeração de GO. De fato, a diminuição dos valores de DH ao longo do tempo, observada no GO-Disp revestido com corona e GO-VD, é devido à sedimentação dos complexos de proteína GO. Por outro lado, a proteína corona melhorou a estabilidade do GO-LP uma vez que o valor de DH era o mesmo que sua dispersão em água, e o mesmo valor foi mantido durante 24 h de incubação. Esses dados sugerem que a química da superfície do GO-LP difere do GO-Disp e GO-VD, uma vez que sua interação com proteínas resultou em diferentes comportamentos coloidais.

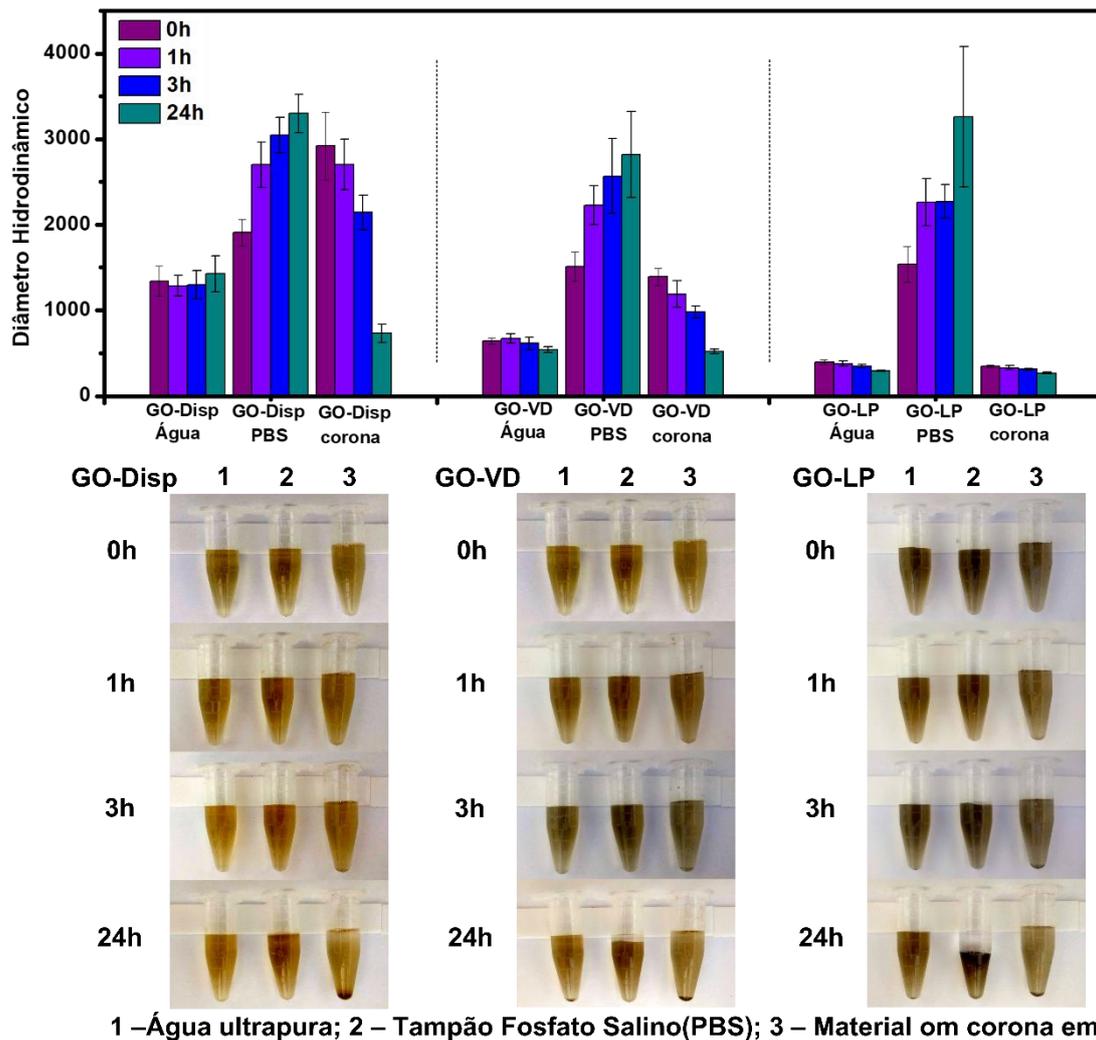


Figura 15. Avaliação do comportamento de agregação de dispersão de óxido de grafeno (GO-Disp.), seca a vácuo (GO-VD) e liofilizada (GO-LP) em água ultrapura, PBS e materiais GO corona rígidos pré-revestidos em PBS, monitorando o diâmetro hidrodinâmico (DH) por DLS por 0, 1, 3 e 24 h.

A sedimentação dos nanomateriais GO ao longo do tempo, em função da composição do meio e da presença da proteína corona, foi avaliada por espectroscopia UV-Vis (Figura 16). Da mesma forma, no estudo de estabilidade do DLS, todos os nanomateriais GO apresentaram alta estabilidade coloidal em água ultrapura (linha preta), com cerca de 100% das partículas em suspensão após 24 h. Mesmo com um aumento no valor de DH observado pelo DLS, o GO-Disp permaneceu em suspensão quando disperso em meio PBS (linha vermelha), indicando que GO-Disp estava flutuando no meio PBS. No entanto, quando GO-Disp. foi previamente revestido por uma corona dura, apenas 30% de suas partículas permaneceram em suspensão após 24 h, mostrando que a formação da proteína corona leva o GO-Disp à

sedimentação, provavelmente devido à grande e pesada formação de complexos de proteína GO.

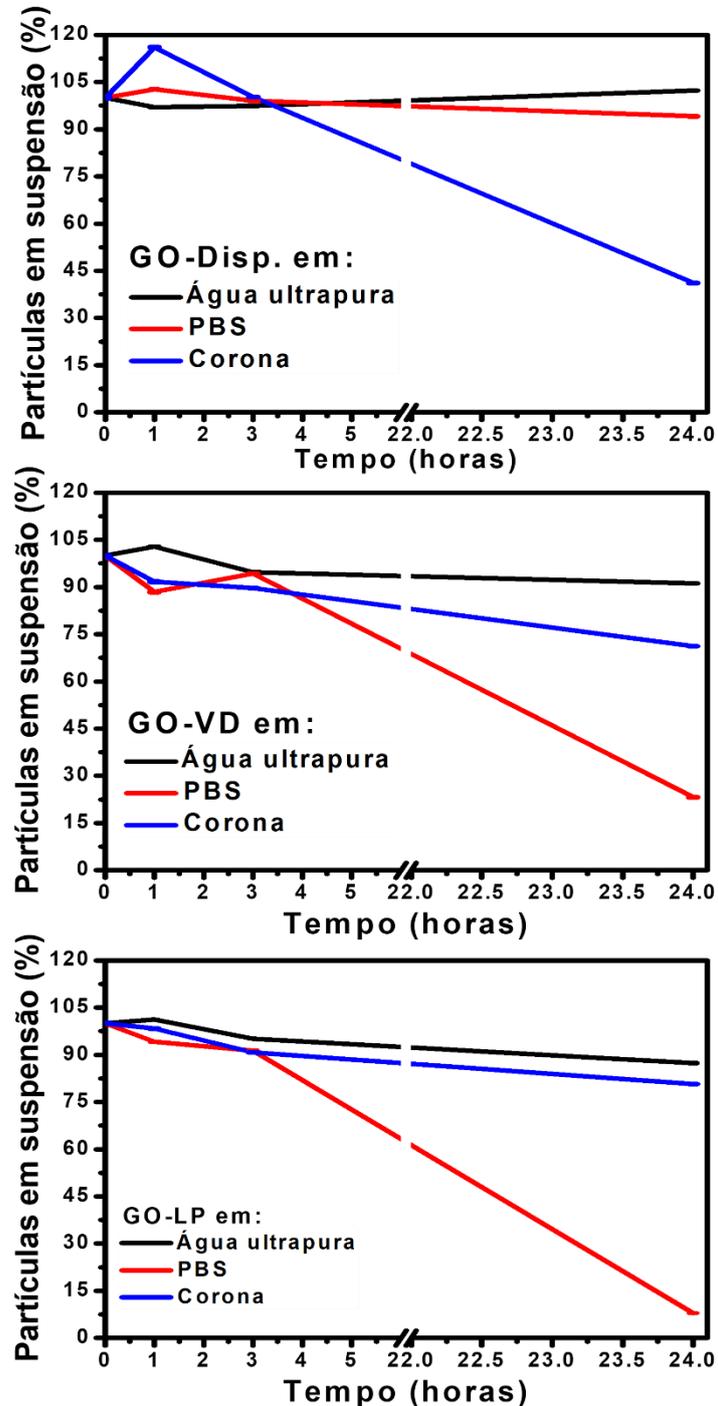


Figura 16. Avaliação do comportamento de sedimentação da dispersão de óxido de grafeno (GO-Disp.), óxido de grafeno seco à vácuo (GO-VD) e óxido de grafeno liofilizado (GO-LP) em água ultrapura, PBS e protein corona dura pré-revestida. Materiais GO em PBS, durante 24 h de incubação por análise UV-Vis por 0, 1, 3 e 24 h.

Por outro lado, o GO-VD e o GO-LP se estabeleceram após 24 h de incubação em PBS, enquanto a presença de uma corona dura melhora substancialmente sua estabilidade no mesmo meio, o que pode ser explicado por sua pequena dimensão lateral em relação ao GO-Disp (como observado pelo AFM), levando à formação de complexos menores de proteína GO. Além disso, a melhoria da estabilidade da corona dura foi mais pronunciada no GO-LP do que no GO-VD. Esses resultados concordam com os dados do DLS, uma vez que o GO-LP revestido de corona apresentou um valor constante de DH durante 24 h de incubação, destacando o melhor efeito de estabilidade da corona dura para este material de GO.

O potencial zeta é outra análise eficiente para dimensionar a estabilidade da dispersão coloidal do GO em diferentes meios. Essas análises fornecem a carga média em nanocamadas e os valores mais positivos que + 30 mV ou mais negativos que - 30 mV, a dispersão é considerada estável em consequência da repulsão eletrostática do interlamellar.^{117,135}

A Tabela 2 mostra que os valores de potencial zeta dos nanomateriais (GO-Disp, GO-VD e GO-LP) foram menores que - 40 mV, justificando a excelente estabilidade coloidal no meio aquoso. Na solução de PBS, o potencial zeta diminuiu em consequência do aumento das forças do meio iônico. Estes resultados e o aumento da DH dos nanomateriais GO com revestimento proteico (Figura 16) corroboram para justificar a redução da estabilidade coloidal dos nanomateriais após a incubação com proteínas plasmáticas.

Tabela 2. Potencial zeta de dispersão de óxido de grafeno (GO-Disp.), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP) em água ultrapura, ou PBS, antes e após a interação com as proteínas plasmáticas (formação da proteína corona).

| Sample | Sem a corona dura | | Com a corona dura | |
|----------------|-------------------|----------------|-------------------|---------------|
| | Água | PBS | Água | PBS |
| GO-Disp | - 40.10 ± 1.08 | - 19.90 ± 1.05 | - 21.16 ± 0.23 | - 7.17 ± 0.23 |
| GO-VD | - 44.76 ± 0.25 | - 20.53 ± 0.73 | - 21.16 ± 1.13 | - 9.61 ± 2.24 |
| GO-LP | - 47.13 ± 2.74 | - 24.00 ± 1.25 | - 21.46 ± 0.40 | - 8.32 ± 0.37 |

4.3 Interações de óxidos de grafeno com proteínas plasmáticas

A Figura 17 mostra o gel SDS-PAGE de proteínas plasmáticas que compõem a corona dura de cada nanomaterial GO. É possível observar que a capacidade de adsorção das proteínas plasmáticas diminui na sequência GO-Disp > GO-VD > GO-LP. A menor capacidade de carga proteica apresentada pelo GO-LP pode ser atribuída à sua redução durante o processo de secagem, como evidenciado pelos dados de FTIR e RMN, bem como pela cor mais escura de sua dispersão aquosa e pelo menor tamanho médio das nanopartículas. Essas propriedades do GO-LP reduzem as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e π - π com proteínas plasmáticas.⁸⁵

A pequena diferença na quantidade de proteínas adsorvidas pelo GO-Disp. e GO-VD podem ser devidos a diferenças nas dimensões laterais e tamanhos médios das nanopartículas conforme observado pelo AFM. O perfil distinto da composição proteica da corona apresentada pelos nanomateriais GO justifica os resultados encontrados nos estudos de estabilidade. Porém esses dados não impactam no efeito hemolítico dos materiais do GO, uma vez que a hemólise foi completamente suprimida pela presença de uma corona dura, independentemente de sua composição.

A liofilização do GO (GO-LP) reduziu os grupos de oxigênio em sua superfície e produziu uma macroestrutura 3D porosa no estado sólido. A secagem do GO pelo processo de vácuo à temperatura ambiente (GO-VD) formou uma macroestrutura baseada em filme em estado sólido com maiores quantidades de grupos oxigenados que o GO-LP. Quando comparado com a dispersão GO sem nenhum processo de secagem (GO-Disp), o processo a vácuo produz um nanomaterial com propriedades físico-químicas mais semelhantes.

A redução do grau do grupo oxigenado associado aos tamanhos médios menores das nanopartículas GO-LP reduziu as interações eletrostática, hidrofóbica e π - π com proteínas plasmáticas e bicamadas lipídicas das hemácias. Esses resultados justificam a menor toxicidade do GO-LP (estimada pelo ensaio hemolítico) e menor capacidade de adsorção de proteínas do que o GO-Disp e o GO-VD.

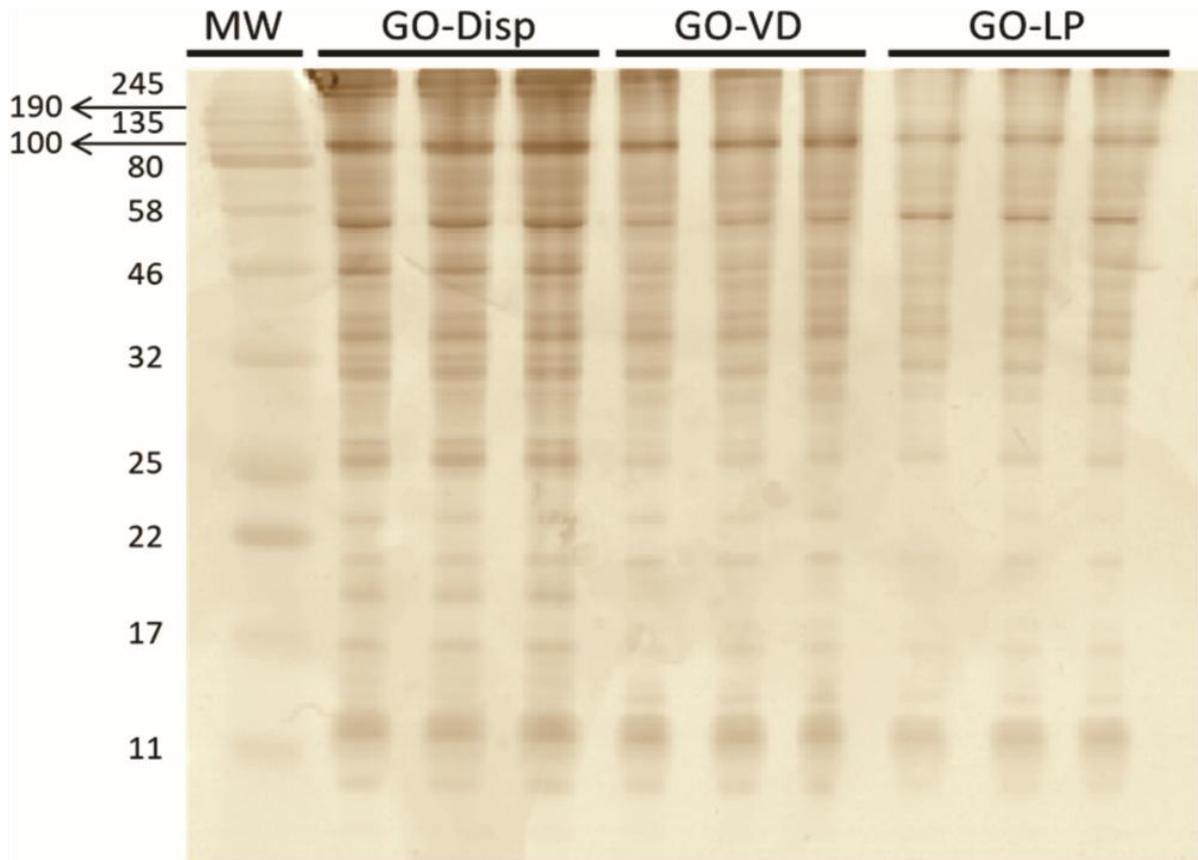


Figura 17. Gel SDS-PAGE de proteínas plasmáticas humanas extraídas de óxido de grafeno disperso (GO-Disp), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP) após incubação de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada GO em plasma humano a 55% em PBS durante 1 h a 37°C .

4.4 Avaliação do efeito hemolítico dos nanomateriais óxido de grafeno na presença e ausência da protein corona

Os estudos hemolíticos das amostras de óxido de grafeno mostraram que o GO-LP apresenta um menor efeito hemolítico quando comparado ao GO-VD e GO-Disp, enquanto estes últimos apresentaram atividade hemolítica similares. (Figura 18A e 19). Verificou-se que GO-VD e GO-Disp apresentam maior toxicidade quando comparadas às GO-LP (Figura 18), e o efeito foi dose-dependente.

Estes resultados estão relacionados à estrutura química anfifílica da superfície das folhas de grafeno com uma região hidrofóbica (estrutura de carbono sp^2) e outras regiões hidrofílicas (grupos de oxigênio ionizado). Essa estrutura GO fornece uma forte interação com bicamadas lipídicas das membranas celulares.⁵⁶ A menor quantidade de grupos de oxigênio ionizado e menores tamanhos médios de nanopartículas do GO-LP contribuíram para justificar sua menor toxicidade na faixa de 0 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparado aos outros dois nanomateriais GO que apresentaram uma maior atividade hemolítica mais tóxicos. No entanto,

na presença de proteínas plasmáticas, o efeito hemolítico de todos os nanomateriais GO foi completamente suprimido (Figura 18B), demonstrando a mitigação da toxicidade de materiais GO para hemácias pela formação da proteína corona.^{105,136}

A supressão do efeito hemolítico em todos os nanomateriais com as proteínas adsorvidas é um resultado que ratifica a nova identidade assumida por estes nanomateriais. Tal resultado abre espaço para as mais diversas aplicações nos campos da nanotecnologia e biomédicas de forma segura.

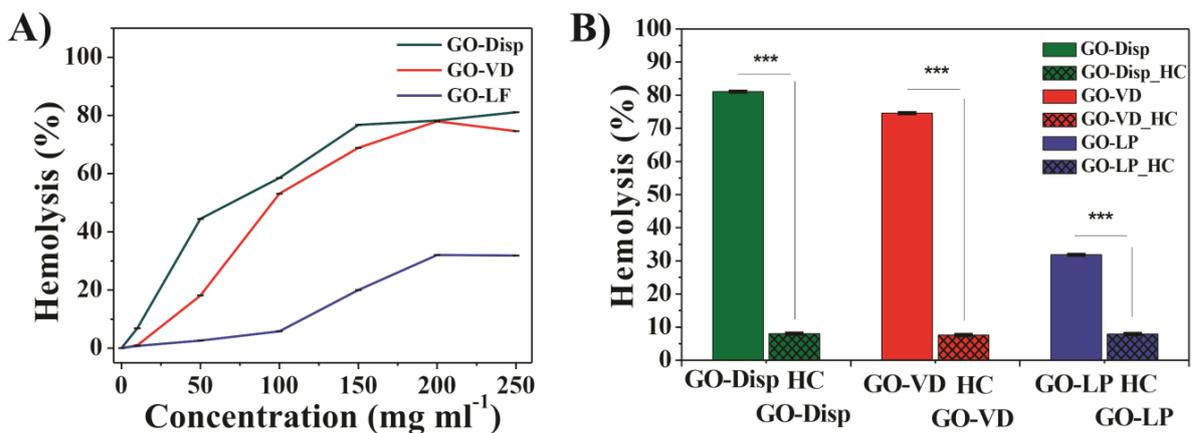


Figura 18. Efeito hemolítico do óxido de grafeno disperso (GO-Disp), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP), após 1 h de incubação com concentrado de hemácias em PBS solução A) porcentagem de hemólise e B) porcentagem de supressão da hemólise após formação da corona dura.

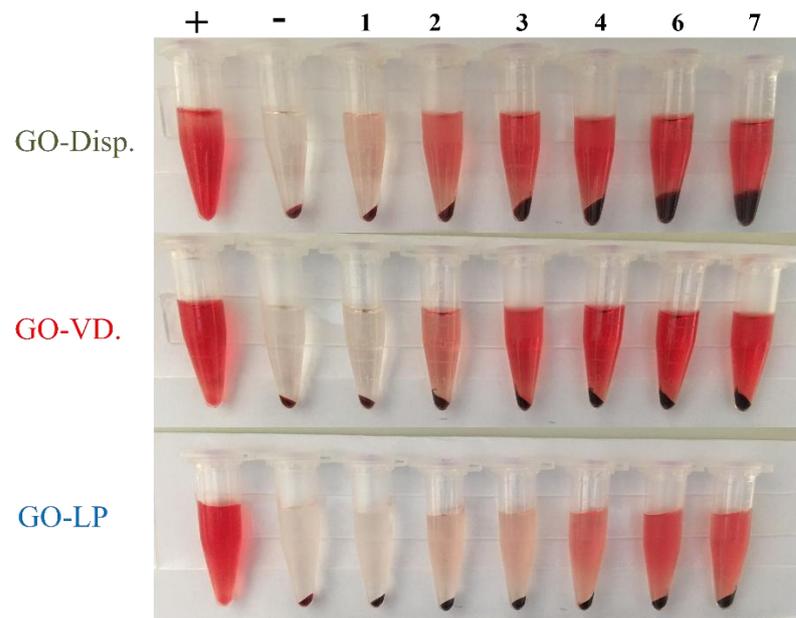


Figura 19. Fotografias do efeito hemolítico do óxido de grafeno disperso (GO-Disp), seco a vácuo (GO-VD) e liofilizado (GO-LP), após 1 h de incubação com concentrado de hemácias em PBS solução.

4.5 Caracterização Físico-química do óxido de grafeno e derivados.

4.5.1 Ressonância Magnética de estado sólido de ^{13}C de óxido de grafeno (GO), GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH), GO-COOH funcionalizado com Flúor (FG1) e GO funcionalizado com flúor (FG2).

Para a determinação dos grupos funcionais presentes nas superfícies do GO (Figura 20), GO-COOH (Figura 21), FG1 (Figura 23) e FG2 (Figura 24) foi utilizada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ^{13}C . Os espectros apresentados na Figura 20, 21, 23 e 24 comprovam a presença de ácidos carboxílicos (COOH, 166 ppm), cetonas (192 ppm), carbono com hibridação sp^2 ($\text{C}=\text{C}$, 130 ppm), lactol (100 ppm), hidroxil (C-OH, 70 ppm) e grupos funcionais orgânicos do epóxido (COC, 59 ppm) em todos os nanomateriais.^{105,137} Com a finalidade de padronizar a avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais no GO e derivados, utilizaremos o referente aos átomos de carbono hibridizados em sp^2 (130 ppm), em que a razão entre a intensidade do pico referente ao C-O-C e C-OH e C-OH serão por $\Delta 1$ e $\Delta 2$ respectivamente.

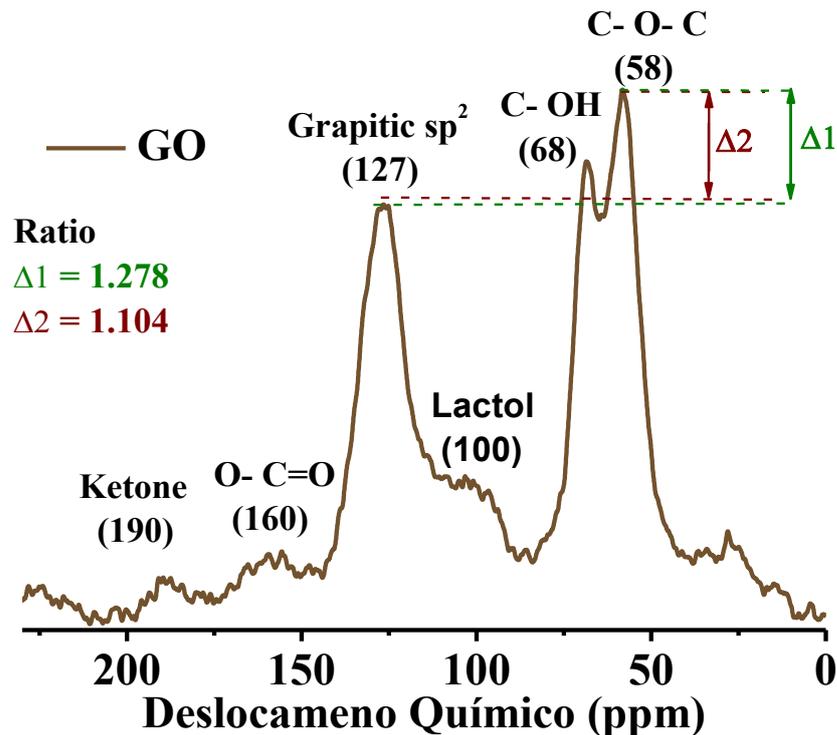


Figura 20. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ^{13}C do óxido de grafeno (GO).

A partir dos espectros (Figura 21) observou-se que após a funcionalização do GO com ácido cloroacético, o nanomaterial, agora denominado de GO-COOH, aumenta consideravelmente o número de carbonos hibridizados em sp^2 (109 ppm) e hidroxil ($\Delta 2$) em relação aos grupamentos grafíticos (carbonos hibridizados em sp^2) paralelamente a uma redução dos grupos C-O-C. Tal resultado sugere a abertura dos anéis epóxidos durante esta etapa de funcionalização do GO visando a síntese do GO-COOH.^{11,105,137}

A funcionalização com ácido cloroacético pode se processar a partir de alguns mecanismos, conforme sugeridos na Figura 22. Um possível mecanismo, seria a partir de uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (SN_2) em que os grupamentos hidróxil presentes as nanofolhas de GO formam uma ligação covalente do tipo sigma com o carbono vicinal a carboxila do ácido cloroacético, que libera o cloro na forma de cloreto. Além disso, seria possível a ocorrência de uma reação SN_2 entre o hidróxido, presente em concentrações relevantes em função do meio ser básico, pH em torno de 13 com o ácido cloroacético que reage posteriormente com os grupamentos carbonila dos grupos funcionais cetona e aldeído e com os epóxidos (Figura 22, Mec 2).

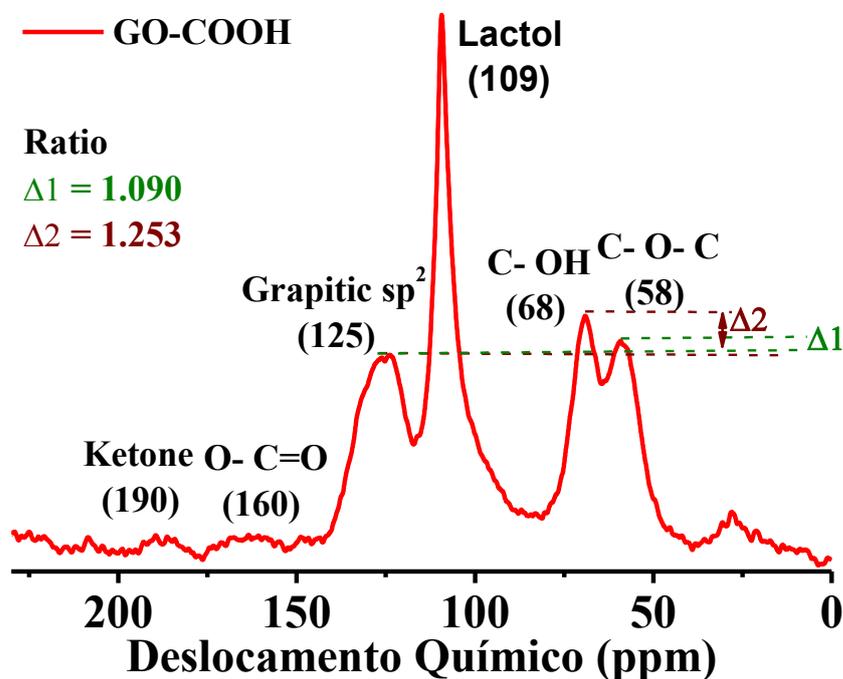
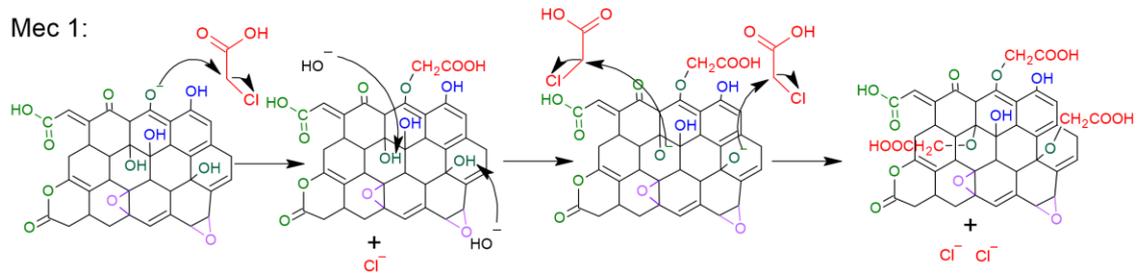
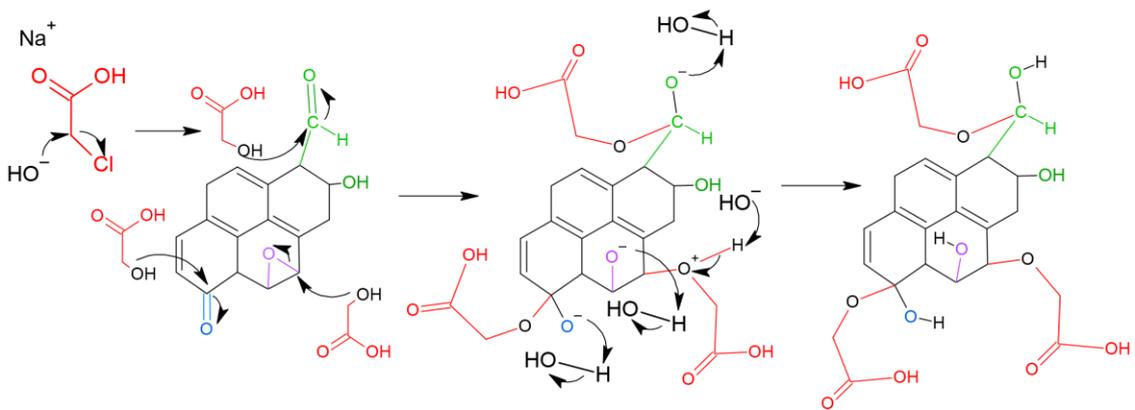


Figura 21. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ^{13}C do óxido de grafeno (GO) funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH).

No entanto, os resultados de RMN de ^{13}C (Figura 21) mostram que houve o surgimento de um pico intenso em 109 ppm, sugerindo uma redução do óxido de grafeno durante a funcionalização com ácido cloroacético. Fonseca et al., Stankovich et al. e Li et al. observaram fenômenos similares durante procedimentos em que foram confirmados a redução do GO a partir RMN de ^{13}C .^{105,138,139} Adicionalmente, Moon et al. relataram em seu trabalho que o ácido cloroacético combinado com o ácido iodídrico, podem atuar como um agente redutor eficiente, logo, é possível afirmar que o ácido cloroacético poderia atuar como um agente redutor do GO, gerando o óxido de grafeno reduzido (RGO). Com a redução mais significativa dos grupos epóxidos em comparação aos grupos hidróxil (Figura 22), é possível sugerir um mecanismo de redução a partir do produto formado a partir da abertura do anel conforme ilustrado no mecanismo 2 da Figura 22. A partir deste produto, o hidrogênio alfa carbonílico que possui uma acidez considerável, pode ser abstraído pelos íons hidróxidos presentes no meio (Figura 22, mec 3) a partir de um rompimento heterolítico da ligação, sendo formada uma ligação dupla entre o carbono e o oxigênio, rompimento da ligação carbono-carbono das nanofolhas de GO e reestabelecimento da ligação dupla carbono-carbono no GO.



Mec 2:



Mec 3:

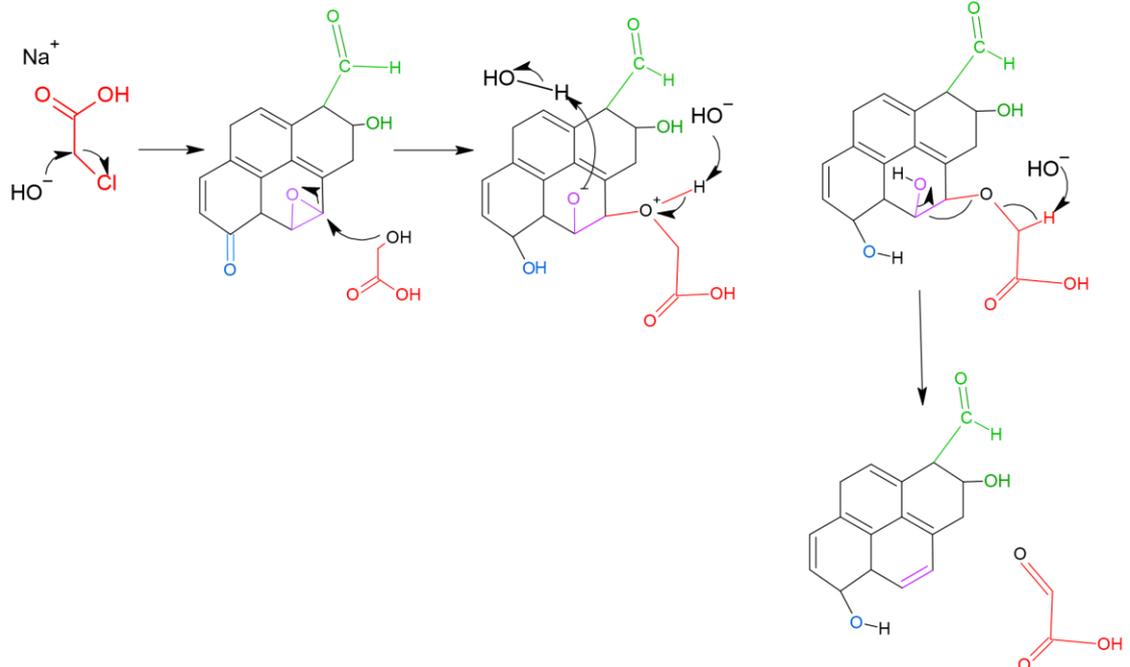


Figura 22. Mecanismo proposto para a funcionalização do Óxido de Grafeno (GO) com ácido cloroacético (mec 1), funcionalização após a reação entre o íon hidróxido e o ácido cloroacético e formação da ligação na carbonila de grupos funcionais aldeído, cetona e epóxidos (mec 2) e sugestão de mecanismo de redução (mec 3).

Durante a funcionalização do GO-COOH com selectflúor, é possível identificar uma redução significativa da presença de grupos lactol (109 ppm), grupos C-O-C (59 ppm) e grupos hidroxil (68 ppm) paralelamente a um aumento do número de carbonos sp^2 (127 ppm). Tal fato sugere que durante a inserção de átomos de flúor na estrutura do GO-COOH, ocorre a abertura de anéis epóxidos está associada a uma redução dos grupos hidróxil e restabelecimento da ligação C=C da estrutura grafítica. No entanto, é possível notar uma presença de grupos funcionais oxigenados mais significativa na estrutura do FG2 (Figura 24) quando comparado ao FG1 (Figura 23), ou seja, este nanomaterial possui um maior número de grupos oxigenados que podem favorecer a sua maior afinidade por solventes polares, a exemplo da água^{11,105,137}.

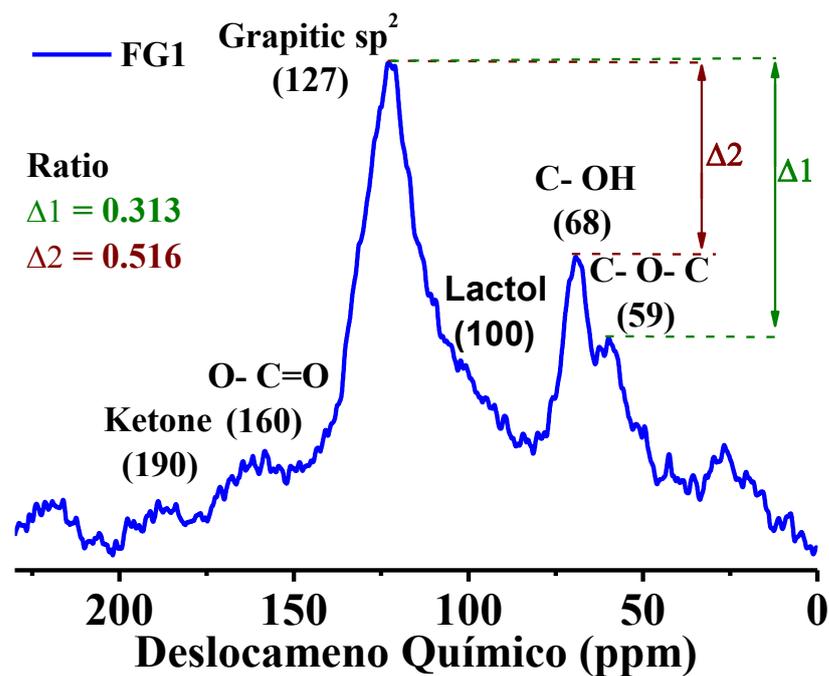


Figura 23. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ^{13}C do GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH) funcionalizado com Selectflúor (FG1).

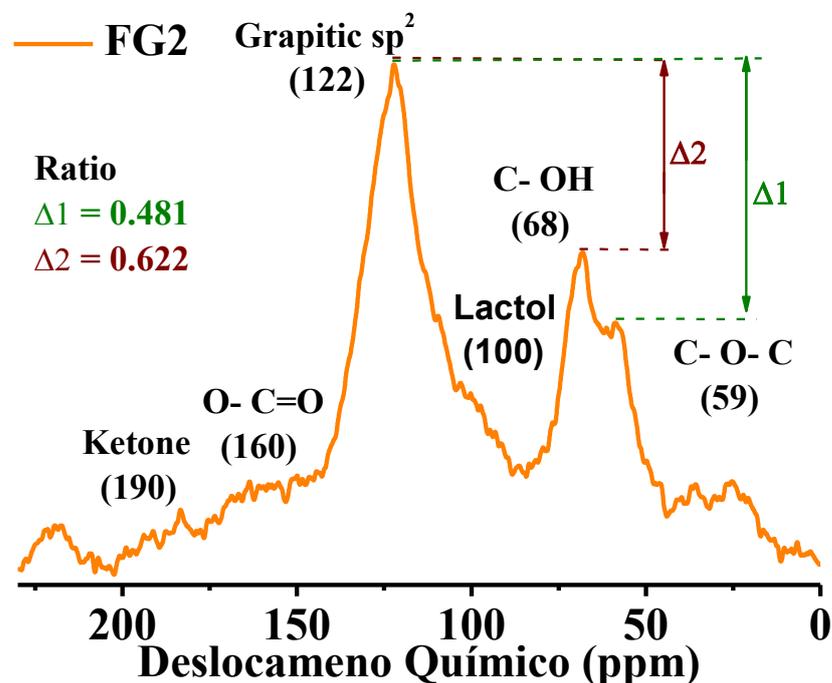


Figura 24. Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ^{13}C do óxido de grafeno (GO) funcionalizado com Selectflúor (FG2).

4.5.2 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier de Óxido de Grafeno (GO), GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH), GO-COOH funcionalizado com Flúor (FG1) e GO funcionalizado com flúor (FG2).

O óxido de grafeno e seus derivados (GO-COOH, FG1 e FG2) foram submetidos a análises de espectroscopia de infravermelho para avaliar qualitativamente a presença dos grupos funcionais na estrutura, conforme observado na Figura 25. A partir destas análises, é possível observar a presença de estiramentos de grupos O-H de carboxilas, hidroxilas e água ($\sim 3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$), estiramentos dos grupos C=O de ácidos carboxílicos ($\sim 1724\text{ cm}^{-1}$), deformação angular de grupos O-H de ácido carboxílico ($\sim 1635\text{ cm}^{-1}$), estiramento de carbonos hibridizados em sp^2 ($\sim 1578\text{ cm}^{-1}$), deformações angulares de grupos O-H de grupos hidróxil presentes na folha do GO ($\sim 1370\text{ cm}^{-1}$), estiramento C-O-C de grupos epóxi ($\sim 1220\text{ cm}^{-1}$) e estiramento C-O de grupos hidróxil presente nas folhas de GO.^{117,118}

A partir dos espectros de infravermelho (Figura 21) é possível identificar algumas diferenças marcante. Dentre elas é possível destacar o grau de sobreposição entre as bandas provenientes do estiramento C=C, deformação angular dos grupos hidroxila de ácidos

carboxílicos e estiramento C=O de ácidos carboxílicos indicam diferentes ambientes químicos, ou seja, graus de oxidação diferentes.^{117,118} Além disso, é possível observar uma banda com mínimo de absorção próximo a 1635 cm^{-1} e 1578 cm^{-1} para o GO e GO-COOH e FG1 e FG2, o que sugere uma redução dos grupamentos oxigenados no nanomateriais funcionalizados com átomos de flúor. Tal resultado corrobora com os resultados observados nas análises de RMN de ^{13}C .

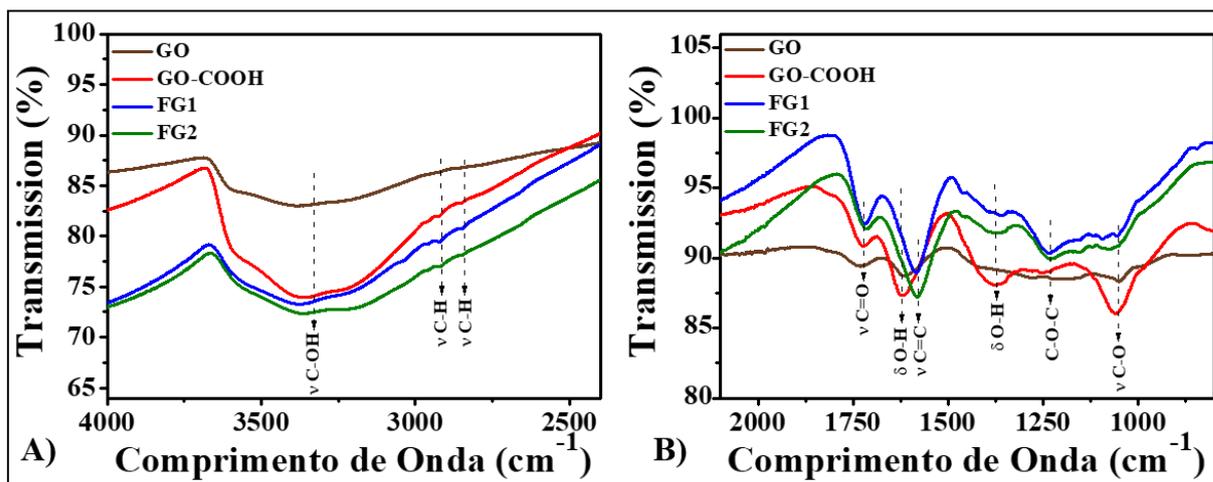


Figura 25. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier do óxido de grafeno GO, GO-COOH, FG1 e FG2. A) região entre 4000 e 2500 cm^{-1} e B) região entre 2200 e 800 cm^{-1} .

4.5.3 Difratometria de raios X (DRX) de óxido de grafeno (GO), GO funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH), GO-COOH funcionalizado com Flúor (FG1) e GO funcionalizado com flúor (FG2).

Os nanomateriais foram submetidos a difração de raios X para análise estrutural. A partir dos padrões de difração mostrados na Figura 26 é possível observar um pico de difração característico intenso do grafite mineral (Figura 26A) em $2\theta = 26,56^\circ$ e do óxido de grafeno (GO) em $2\theta = 10,74^\circ$ (Figura 26B). Estes picos são resultantes do empilhamento com um grau de ordenamento relevante das nanofolhas carbonáceas na direção do eixo z da nanofolhas. Utilizando a lei de Bragg é possível calcular a distância interplanar, sendo elas de $0,33\text{ nm}$ e $0,82\text{ nm}$ para o grafite e GO respectivamente. Este aumento significativo da distância interplanar no GO em relação ao grafite é resultado da inserção de grupos oxigenados durante o processo de oxidação do grafite para a síntese do GO.^{22,105}

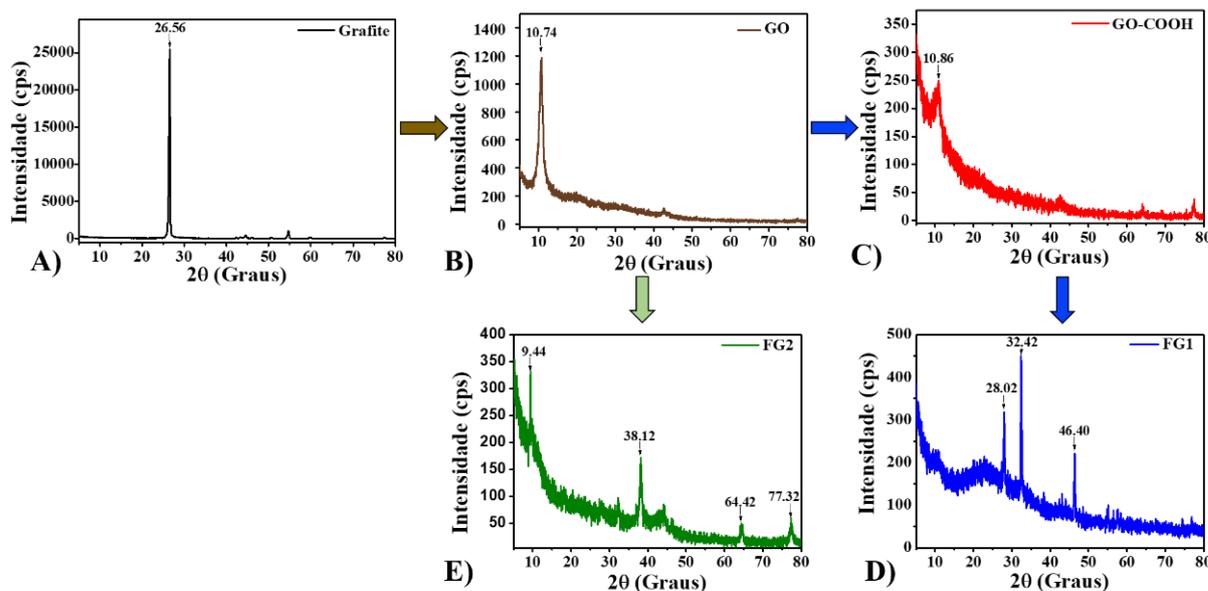


Figura 26. Difratomogramas do A) grafite, B) óxido de grafeno (GO), C) GO funcionalizado com carboxilas (GO-COOH), D) GO-COOH funcionalizado com átomos de flúor (FG1) e E) GO funcionalizado com átomos de flúor (FG2).

Ao analisar o padrão de difração do GO-COOH (Figura 26C) é possível observar um pico não muito bem definido em 2θ igual a $10,86^\circ$, sugerindo que a inserção de grupo carboxila estrutura basal do GO afetou diretamente a perda do ordenamento na direção z das nanofolhas, justificando assim o desaparecimento praticamente em sua totalidade do pico na região de $2\theta = 10$. Por outro lado, o padrão de difração do FG1 (Figura 26D) mostra a presença de picos $28,02^\circ$, $32,42^\circ$ e $46,40^\circ$ com distâncias interplanares de $0,32$ nm, $0,28$ nm e $0,19$ nm respectivamente. Xing et al observaram o mesmo padrão de difração para este nanomaterial.¹⁸

Por fim, a Figura 26E mostra o padrão de difração do FG2 com picos mais intensos em 2θ igual a $9,44^\circ$, $38,12^\circ$ e dois picos menos intensos em $64,42^\circ$ e $77,32^\circ$ com distâncias interplanares de $0,94$ nm, $0,23$ nm, $0,14$ nm e $0,12$ nm respectivamente. Os dados de difração de difração de raios X (Figura 26) mostram que a inserção de átomos de flúor na estrutura GO reduz a distância interplanar entre as nanofolhas. Tal fato pode estar associado a redução dos grupos oxigenados na estrutura do GO durante o processo de inserção de átomos de flúor como observado nas análises de RMN de ^{13}C e infravermelho.

4.5.4 Ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido de ^{19}F de GOCOOH (funcionalizado com ácido cloroacético) ao ser funcionalizado com flúor (FG1) e do Selectflúor.

4.5.2.1 Caracterização do reagente 'SelectFluor' por RMN de sólidos de ^{19}F

Inicialmente, a amostra sólida do reagente SelectFluor foi analisada por RMN de ^{19}F (sequência de pulso '*one pulse*', D1-PW1-aq), na forma estática e em diferentes velocidades de rotação (entre 3,5 e 7 kHz), para estabelecimento dos deslocamentos químicos isotrópicos, após descontado do sinal de *background* (espectro obtido com o rotor vazio, nas mesmas condições). A Figura 27A e 27B apresenta os resultados obtidos, onde o deslocamento químico isotrópico para o F-N foi detectado em -150,7ppm. Chauhan *et al.*⁶¹ e Al-Huniti *et al.*⁶² relataram que, para o reagente em solução, o sinal correspondente ao F-N foi observado em $\delta = -151$ ppm.

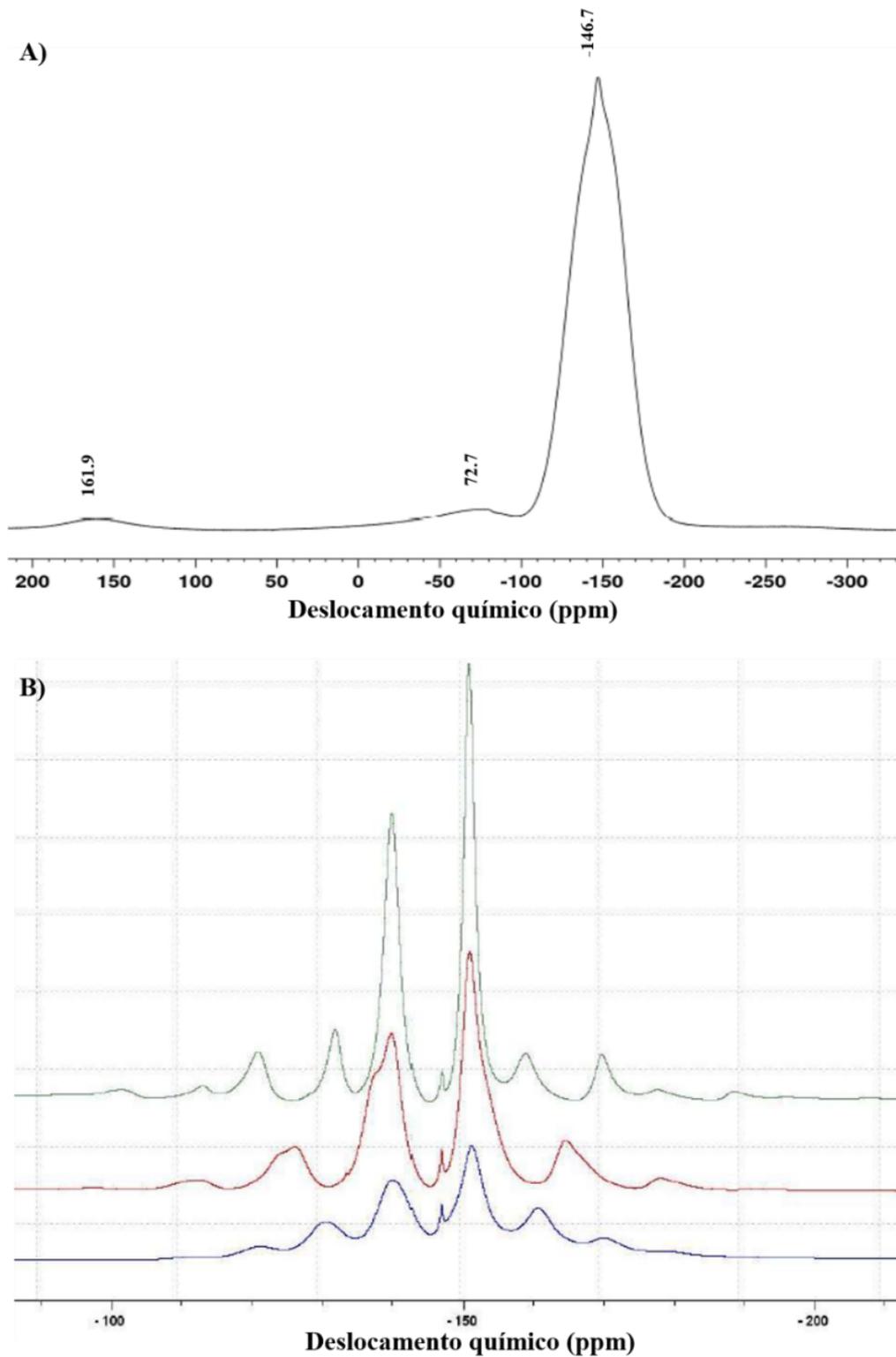


Figura 27. Espectros de RMN de ^{19}F (sequência *one pulse*) obtidos para o Selectfluor. A) estático e B) em diferentes velocidades de rotação – 3,5 kHz (azul), 5 kHz (vermelho) e 7 kHz (verde).

Nossos resultados estão, portanto, em concordância com o relatado na literatura. A aquisição do espectro empregando-se a sequência *spin-echo* de Hahn ($D1-90_x-\tau-180_y-\tau-aq$) foi comparável (Figura 28) ao obtido com aquisição direta.

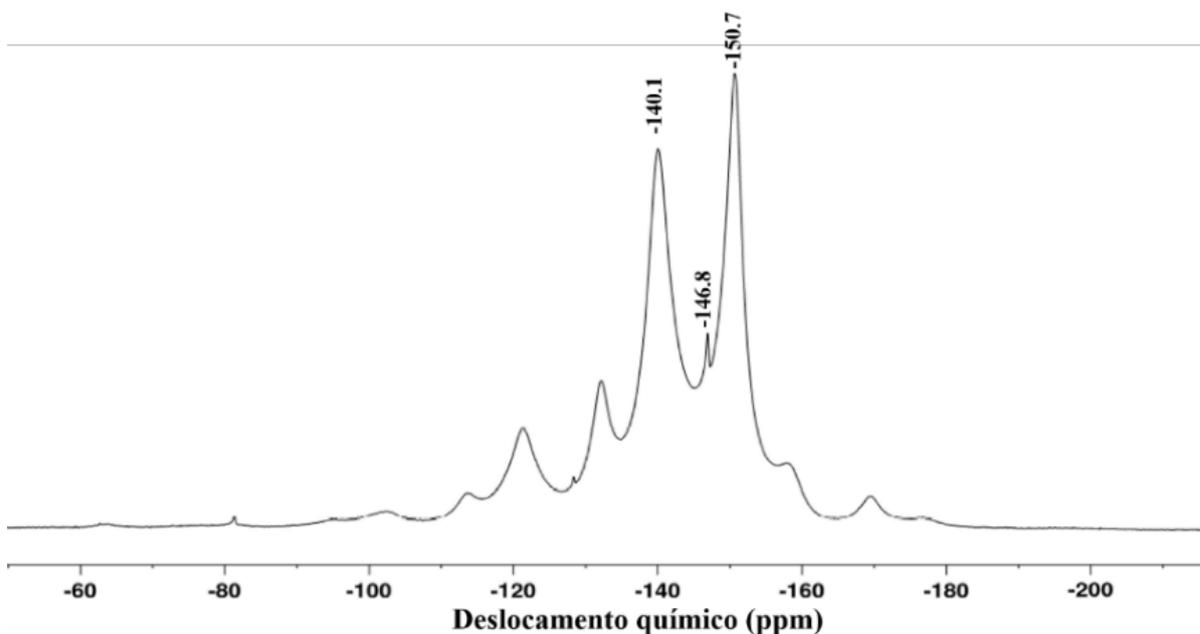


Figura 28. Espectro de RMN de ^{19}F do SelectFluor obtido com a sequência *spin-eco* de Hahn (veloc.7 kHz).

Além do sinal correspondente ao SelectFluor, mais dois sinais, em -146.8 ppm e em -140,1 ppm, devido a presença de impurezas, também foram observados.

4.5.2.2 Caracterização da amostra de óxido de grafeno funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH) funcionalizado com selectflúor (FG1) por RMN de ^{19}F em estado sólido

Compostos fluorados são amplamente utilizados na indústria química, no entanto, a formação da ligação C hibridizado em sp^3 com átomos de flúor ($C_{sp^3}\text{-F}$) é uma tarefa relativamente desafiadora para estes setores. Xing et al. em seu trabalho, consideraram que os átomos de flúor formavam uma ligação covalente com o GO (Figura 25) a partir eliminação de carboxilas na forma de CO_2 , justificando assim, a inserção de uma etapa de funcionalização com ácido cloroacético.¹⁸ Deste modo, se faz necessário um melhor entendimento dos mecanismos de reação envolvidos neste processo de síntese.

Feng Yin et al. Em seu trabalho propuseram um mecanismo catalisado por AgNO_3 em que ácidos carboxílicos sofrem fluoração descarboxilativa ao reagirem com o reagente Selectfluor em solução aquosa em rendimentos satisfatórios (Figura 29).^{18,140}

Neste mecanismo, a primeira etapa consiste em uma reação entre o selectfluor e o íon prata na forma de seu respectivo cátion monovalente, tendo como produto o flúor ligado ao íon prata na forma de seu respectivo cátion trivalente (F-Ag(III)). Em seguida, ocorre a eliminação de carboxilas do GO na forma de CO_2 , formação de espécies radiculares na superfície do GO e o F-Ag(II) . Por fim, ocorre a formação da ligação do flúor com os carbonos anteriormente ligados às carboxilas paralelamente ao rompimento da ligação entre o complexo F-Ag(II) , restabelecendo o íons prata na forma de seus respectivos cátions monovalentes.¹⁴⁰

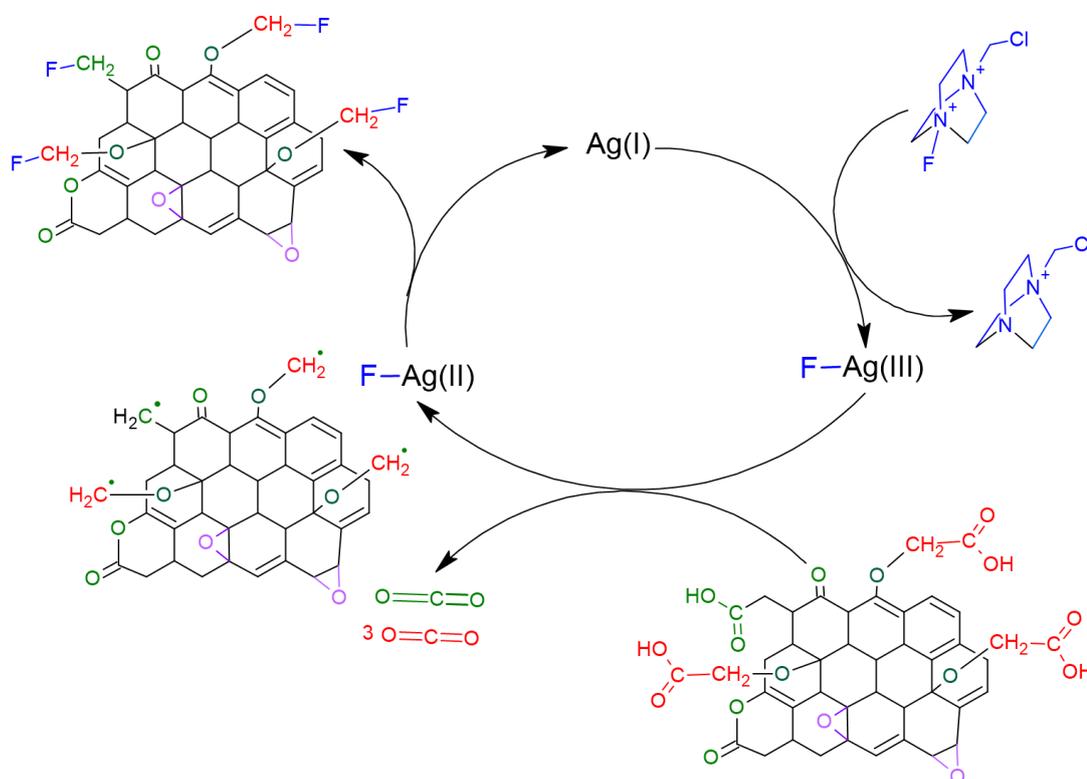


Figura 29. Mecanismo proposto de descarboxilação e inserção de átomos de flúor no óxido de grafeno funcionalizado com ácido cloroacético (GO-COOH) com Selectfluor (FG1). Adaptado^{18,140}

No entanto, estudos recentes propõem que os mecanismos de fluoração descarboxilativa com selectfluor passar por um mecanismo em que o cátion monovalente (Ag^+) é oxidado ao seu respectivo cátion divalente ao reagirem com o selectfluor gerando como um dos produtos o cátion radical TEDA-BF_4 , sendo esta etapa classificada como a etapa limitante

da reação (Figura 30).¹⁴¹ Durante o processo de reação, é possível inferir também a formação de um complexo entre os cátions prata e o ânions carboxilatos (Ag-OOCR), assim como a inibição do catalizador de prata quando complexado entre dois ânions carboxilato. O reagente selectfluor promove a oxidação do ânion carboxilato e o Ag^{2+} resultante oxida o carboxilato ao qual está ligado, produzindo o radical. Por fim, o radical abstrai o átomo de flúor do Selectfluor, sendo formada uma ligação covalente. Adicionalmente, é obtido como produto o dióxido de carbono (CO_2) proveniente da descarboxilação e o cátion radicalar TEDA- BF_4 .¹⁴¹

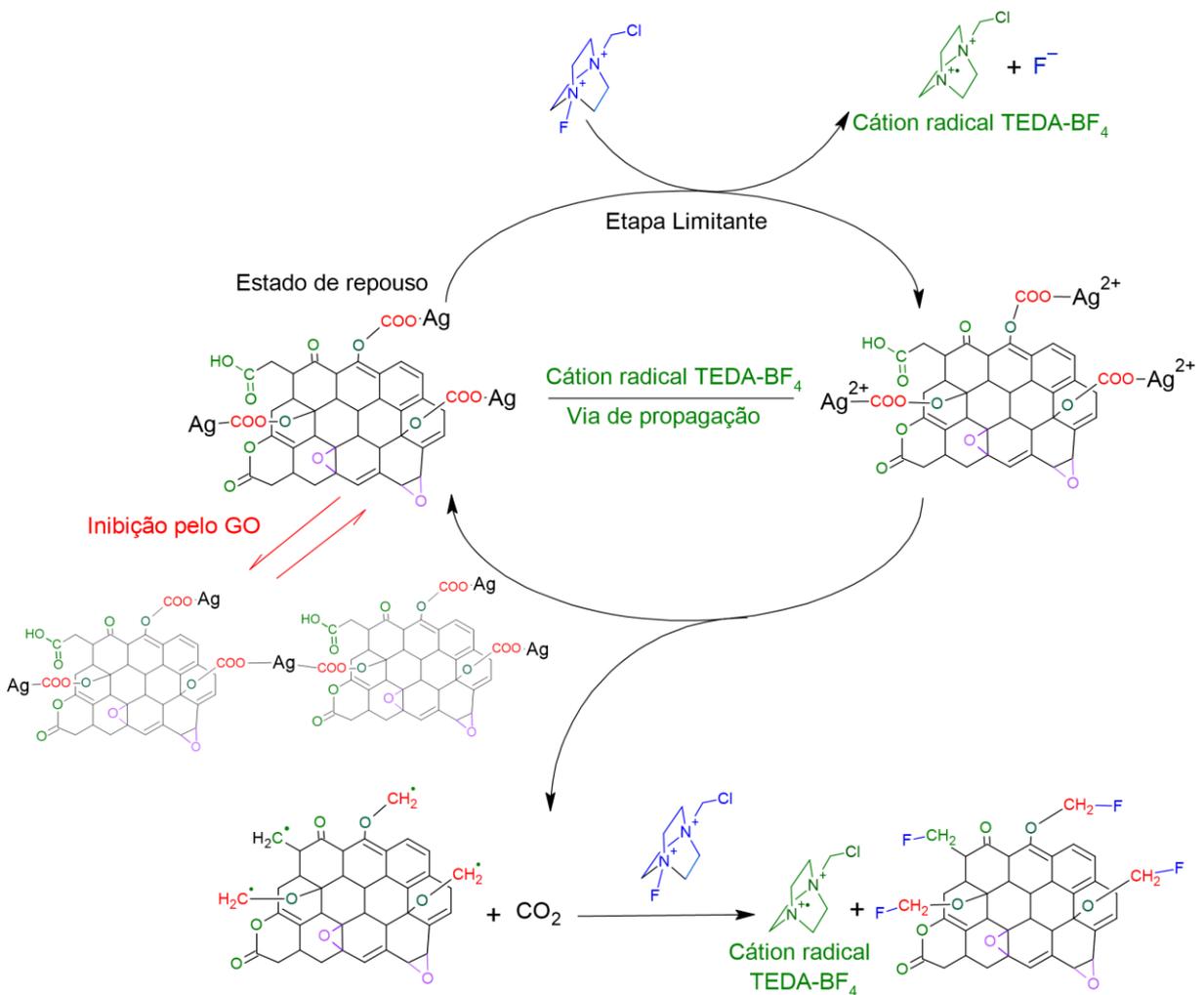


Figura 30. Mecanismo proposto de descarboxilação e inserção de átomos de flúor no óxido de grafeno com Selectfluor (FG1). Adaptado¹⁴¹

No entanto, a partir da análise da amostra de óxido de grafeno funcionalizado com átomos de flúor a partir da ressonância magnética de estado sólido de flúor analisada com as técnicas de one pulse (Figura 31) e spin-eco de Hahn (Figura 32), foram observados dois sinais desdobrados. Um sinal na região de -50 ppm e -80 ppm, que são indicativos do sucesso da

funcionalização estudada. O sinal em maior frequência, em $\delta = -53,5$ ppm, pode ser assinalado como correspondente ao grupamento O-CH₂-F (Figura 32), enquanto o sinal em menor frequência, em $\delta = -88,6$ ppm, pode ser assinalado como correspondente a grupamentos O-CH-F. Esse sinal poderia ser resultado da abertura dos anéis epóxido, presentes ao longo da superfície assim como nas bordas das lamelas de óxido de grafeno, segundo modelo de He, Klinowsky e colaboradores⁶³ (Figura 33). Vale a penas destacar que, de forma distinta do observado para o SelectFluor, pode-se constatar uma melhora significativa na qualidade do espectro com o emprego da sequência spin-eco de Hahn. Logo, o mecanismo proposto por Xing et al.18, estaria incompleto e a funcionalização do GO com átomos de flúor, estaria associado a perda de carboxilas na forma de CO₂ e a abertura de anéis epóxi, conforme ilustrado na Figura 33.

Logo, é possível afirmar que não seria necessária a reação de funcionalização ácido cloroacético, pois ocorre uma redução do GO através de perdas significativas de grupos oxigenados, em especial os grupamentos epóxidos. Tal fato, reduz de sobremaneira o número de sítios reativos para a inserção de átomos de flúor, pois o epóxidos são centros em que os átomos de flúor se inserem na estrutura do GO.

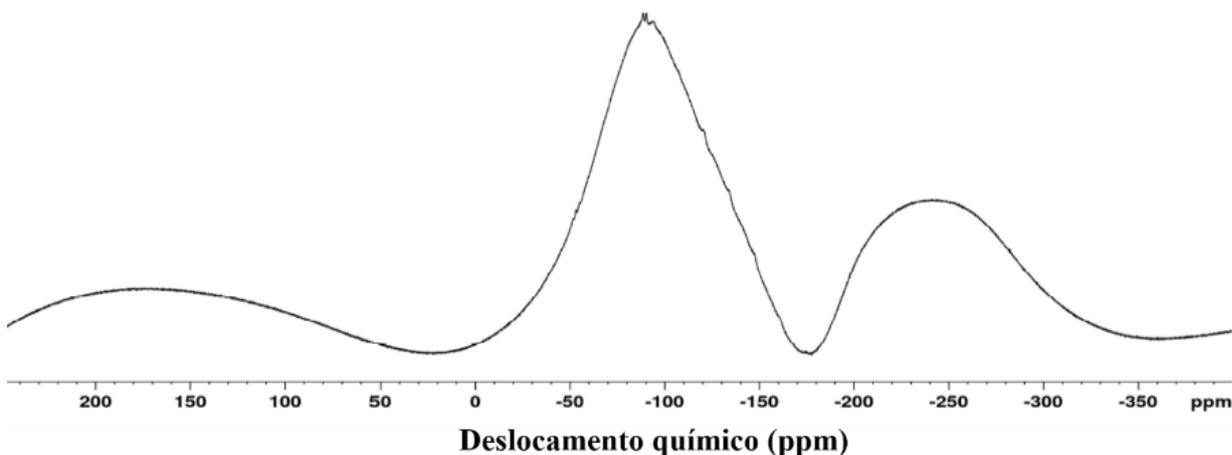


Figura 31. Espectro de RMN-MAS de ¹⁹F do óxido de grafeno funcionalizado, obtido com a sequência *one pulse* (velocidade de rotação 7 kHz).

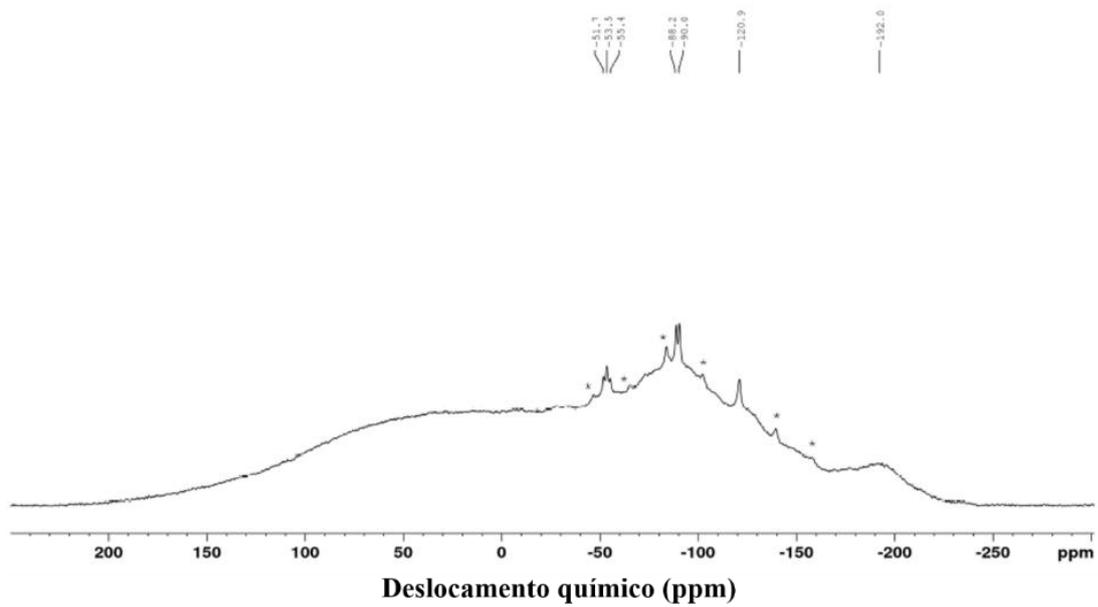


Figura 32. Espectro de RMN de ^{19}F do óxido de grafeno funcionalizado, obtido com a sequência spin-eco de Hahn.

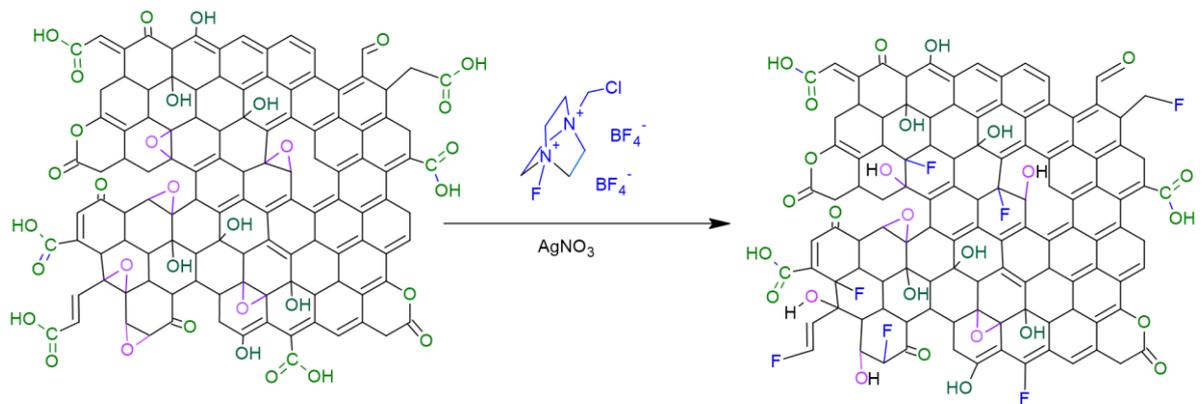


Figura 33. Representação das reações de funcionalização do GO com átomos de flúor a partir dos resultados de RMN de ^{19}F .

5. Conclusão

A partir dos resultados é possível concluir que as propriedades físico-químicas do GO são criticamente afetadas pelo processo de secagem. A liofilização do GO (GO-LP) diminuiu a concentração dos grupos de oxigênio em sua superfície e produziu uma macroestrutura 3D porosa no estado sólido. Por outro lado, a secagem à vácuo do GO a temperatura ambiente (GO-VD) produziu um nanomaterial com uma macroestrutura no estado sólido similar a um filme com um maior grau de grupos funcionais oxigenados do que o GO-LP. Quando comparado com a dispersão GO sem nenhum processo de secagem (GO-Disp), o GO seco à vácuo produz um nanomaterial com propriedades físico-químicas muito semelhantes. Em consequência da redução dos grupos oxigenados e tamanho das nanofolhas, o GO-LP possui interações eletrostáticas, hidrofóbicas e π - π menos intensas com as proteínas plasmáticas do sangue e bicamadas lipídicas de hemácias. Estes resultados suportam a toxicidade mais baixa de GO-LP contra hemácias, bem como adsorção de proteína reduzida (corona dura) do que para GO-Disp e GO-VD. Por fim, este trabalho contribui para um melhor entendimento das propriedades físico-químicas do GO após procedimentos de secagem e seus impactos nas aplicações biomédicas e na toxicidade. Adicionalmente, os resultados obtidos mostraram que a inserção de átomos de flúor ao GO através da funcionalização covalente por uma nova rota sintética apresenta diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas em relação ao fluorografeno obtido seguindo o protocolo relatado na literatura. A versatilidade do GO em relação a diferentes possibilidades de funcionalizações covalentes mostra o quão promissor, sensível é este nanomaterial. Tais funcionalizações, alteram significativamente as propriedades físico-químicas, tornando estes nanomateriais uma plataforma com uma infinidade de possíveis aplicações. Nossos resultados demonstram que a escolha do procedimento de funcionalização covalente dos nanomateriais influenciam profundamente em suas propriedades físico-químicas e, mostram a necessidade de serem realizados estudos robustos, detalhados e aprofundados sob uma temática da química de estado sólido que vise entender com maior riqueza de detalhes estes nanomateriais. Tais conhecimentos possibilitará o desenvolvimento de novos nanomateriais dentro dos conceitos de *Safe by Design* e *Science for Regulation*.

6. Perspectivas Futuras

A partir de um profundo conhecimento destes nanomateriais, aplicar em sistemas eletroquímicos voltados para sensoriamento (fármacos e biomarcadores) e em processos de *water splitting*.

7. Referências Bibliográficas

1. Novoselov, K. S. *et al.* Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* (80-.). **306**, 666 LP – 669 (2004).
2. Geim, A. K. & Novoselov, K. S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* **6**, 183–191 (2007).
3. Novoselov, K. S. *et al.* A roadmap for graphene. *Nature* **490**, 192–200 (2012).
4. Tiwari, S. K., Sahoo, S., Wang, N. & Huczko, A. Graphene research and their outputs: Status and prospect. *J. Sci. Adv. Mater. Devices* **5**, 10–29 (2020).
5. Georgakilas, V., Perman, J. A., Tucek, J. & Zboril, R. Broad Family of Carbon Nanoallotropes: Classification, Chemistry, and Applications of Fullerenes, Carbon Dots, Nanotubes, Graphene, Nanodiamonds, and Combined Superstructures. *Chem. Rev.* **115**, 4744–4822 (2015).
6. Jung, I. *et al.* Simple Approach for High-Contrast Optical Imaging and Characterization of Graphene-Based Sheets. *Nano Lett.* **7**, 3569–3575 (2007).
7. Tang, L. *et al.* Preparation, Structure, and Electrochemical Properties of Reduced Graphene Sheet Films. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 2782–2789 (2009).
8. Parvez, K. *et al.* Electrochemically Exfoliated Graphene as Solution-Processable, Highly Conductive Electrodes for Organic Electronics. *ACS Nano* **7**, 3598–3606 (2013).
9. Rao, C. N. R., Sood, A. K., Subrahmanyam, K. S. & Govindaraj, A. Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 7752–7777 (2009).
10. Soldano, C., Mahmood, A. & Dujardin, E. Production, properties and potential of graphene. *Carbon N. Y.* **48**, 2127–2150 (2010).
11. Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W. & Ruoff, R. S. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 228–240 (2010).
12. Liu, Y. *et al.* Recent advances on graphene microstructure engineering for propellant-related applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **138**, 50474 (2021).
13. Tuček, J. *et al.* Room temperature organic magnets derived from sp³ functionalized graphene. *Nat. Commun.* **8**, 14525 (2017).
14. Pumera, M. & Wong, C. H. A. Graphane and hydrogenated graphene. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 5987–5995 (2013).
15. Liu, B. *et al.* A c Transistor. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1900422 (2019).
16. Iribarne, F. & Denis, P. A. Adsorption of organic molecules on graphene and fluorographene: An unresolved discrepancy between experiment and theory. *Int. J. Quantum Chem.* **121**, e26605 (2021).
17. Lim, C. S., Sofer, Z., Plutnar, J. & Pumera, M. Fluorographenes for Energy and Sensing

- Application: The Amount of Fluorine Matters. *ACS Omega* **3**, 17700–17706 (2018).
18. Xing, R., Li, Y. & Yu, H. Preparation of fluoro-functionalized graphene oxide via the Hunsdiecker reaction. *Chem. Commun.* **52**, 390–393 (2016).
 19. Seifi, T. & Reza Kamali, A. Antiviral performance of graphene-based materials with emphasis on COVID-19: A review. *Med. Drug Discov.* **11**, 100099 (2021).
 20. Frisenda, R., Niu, Y., Gant, P., Muñoz, M. & Castellanos-Gomez, A. Naturally occurring van der Waals materials. *npj 2D Mater. Appl.* **4**, 38 (2020).
 21. Hummers, W. S. & Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1339 (1958).
 22. de Moraes, A. C. M. *et al.* Fabrication of transparent and ultraviolet shielding composite films based on graphene oxide and cellulose acetate. *Carbohydr. Polym.* **123**, 217–227 (2015).
 23. Shih, C.-J., Lin, S., Sharma, R., Strano, M. S. & Blankschtein, D. Understanding the pH-Dependent Behavior of Graphene Oxide Aqueous Solutions: A Comparative Experimental and Molecular Dynamics Simulation Study. *Langmuir* **28**, 235–241 (2012).
 24. Sanchez, V. C., Jachak, A., Hurt, R. H. & Kane, A. B. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: an interdisciplinary review. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 15–34 (2012).
 25. Kim, J. *et al.* Graphene Oxide Sheets at Interfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 8180–8186 (2010).
 26. Kim, F., Cote, L. J. & Huang, J. Graphene Oxide: Surface Activity and Two-Dimensional Assembly. *Adv. Mater.* **22**, 1954–1958 (2010).
 27. Guo, F. *et al.* Hydration-Responsive Folding and Unfolding in Graphene Oxide Liquid Crystal Phases. *ACS Nano* **5**, 8019–8025 (2011).
 28. Bitounis, D., Ali-Boucetta, H., Hong, B. H., Min, D.-H. & Kostarelos, K. Prospects and Challenges of Graphene in Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **25**, 2258–2268 (2013).
 29. Sun, X. *et al.* Nano-Graphene Oxide for Cellular Imaging and Drug Delivery. *Nano Res.* **1**, 203–212 (2008).
 30. Liu, J., Cui, L. & Losic, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* **9**, 9243–9257 (2013).
 31. Goenka, S., Sant, V. & Sant, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Release* **173**, 75–88 (2014).
 32. Liu, Z., Liu, B., Ding, J. & Liu, J. Fluorescent sensors using DNA-functionalized

- graphene oxide. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 6885–6902 (2014).
33. Wang, F. & Liu, J. Platinated DNA oligonucleotides: new probes forming ultrastable conjugates with graphene oxide. *Nanoscale* **6**, 7079–7084 (2014).
 34. Li, R. *et al.* Identification and Optimization of Carbon Radicals on Hydrated Graphene Oxide for Ubiquitous Antibacterial Coatings. *ACS Nano* **10**, 10966–10980 (2016).
 35. Li, X. *et al.* Highly conducting graphene sheets and Langmuir–Blodgett films. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 538 (2008).
 36. Marcano, D. C. *et al.* Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **4**, 4806–4814 (2010).
 37. Vryonis, O., Andritsch, T., Vaughan, A. S. & Lewin, P. L. An alternative synthesis route to graphene oxide: influence of surface chemistry on charge transport in epoxy-based composites. *J. Mater. Sci.* **54**, 8302–8318 (2019).
 38. Ye, S. & Feng, J. The effect of sonication treatment of graphene oxide on the mechanical properties of the assembled films. *RSC Adv.* **6**, 39681–39687 (2016).
 39. Kumar, S., Garg, A. & Chowdhuri, A. Sonication effect on graphene oxide (GO) membranes for water purification applications. *Mater. Res. Express* **6**, 85620 (2019).
 40. Barbolina, I. *et al.* Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. *2D Mater.* **3**, 25025 (2016).
 41. Mazánek, V. *et al.* Ultrapure Graphene Is a Poor Electrocatalyst: Definitive Proof of the Key Role of Metallic Impurities in Graphene-Based Electrocatalysis. *ACS Nano* **13**, 1574–1582 (2019).
 42. Zhao, Q. & Chen, B. Concurrent enhancement of structure stability and adsorption capacity of freeze-dried graphene oxide aerogels via the removal of oxidation debris nanoparticles on nanosheets. *Environ. Sci. Nano* **8**, 1000–1009 (2021).
 43. Coluci, V. R. *et al.* Noncovalent Interaction with Graphene Oxide: The Crucial Role of Oxidative Debris. *J. Phys. Chem. C* **118**, 2187–2193 (2014).
 44. Faria, A. F. *et al.* Unveiling the Role of Oxidation Debris on the Surface Chemistry of Graphene through the Anchoring of Ag Nanoparticles. *Chem. Mater.* **24**, 4080–4087 (2012).
 45. Zhang, Z., Ma, M., Chen, C., Cai, Z. & Huang, X. The morphology, structure and electrocatalytic ability of graphene prepared with different drying methods. *RSC Adv.* **6**, 28005–28014 (2016).
 46. Platero, E., Fernandez, M. E., Bonelli, P. R. & Cukierman, A. L. Graphene oxide/alginate beads as adsorbents: Influence of the load and the drying method on their

- physicochemical-mechanical properties and adsorptive performance. *J. Colloid Interface Sci.* **491**, 1–12 (2017).
47. Hench, L. L. & West, J. K. The sol-gel process. *Chem. Rev.* **90**, 33–72 (1990).
 48. Venkateswara Rao, A., Bhagat, S. D., Hirashima, H. & Pajonk, G. M. Synthesis of flexible silica aerogels using methyltrimethoxysilane (MTMS) precursor. *J. Colloid Interface Sci.* **300**, 279–285 (2006).
 49. Dutoit, D. C. M., Schneider, M. & Baiker, A. Titania-Silica Mixed Oxides: I. Influence of Sol-Gel and Drying Conditions on Structural Properties. *J. Catal.* **153**, 165–176 (1995).
 50. Dutoit, D. C. M., Göbel, U., Schneider, M. & Baiker, A. Titania–Silica Mixed Oxides: V. Effect of Sol-Gel and Drying Conditions on Surface Properties. *J. Catal.* **164**, 433–439 (1996).
 51. Job, N. *et al.* Carbon aerogels, cryogels and xerogels: Influence of the drying method on the textural properties of porous carbon materials. *Carbon N. Y.* **43**, 2481–2494 (2005).
 52. Gies, V. & Zou, S. Systematic toxicity investigation of graphene oxide: evaluation of assay selection, cell type, exposure period and flake size. *Toxicol. Res. (Camb)*. **7**, 93–101 (2018).
 53. Pinto, A. M., Gonçalves, I. C. & Magalhães, F. D. Graphene-based materials biocompatibility: A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **111**, 188–202 (2013).
 54. Seabra, A. B., Paula, A. J., de Lima, R., Alves, O. L. & Durán, N. Nanotoxicity of Graphene and Graphene Oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 159–168 (2014).
 55. Fadeel, B. *et al.* Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment. *ACS Nano* **12**, 10582–10620 (2018).
 56. Rhazouani, A. *et al.* Synthesis and Toxicity of Graphene Oxide Nanoparticles: A Literature Review of *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Biomed Res. Int.* **2021**, 5518999 (2021).
 57. Georgakilas, V. *et al.* Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chem. Rev.* **112**, 6156–6214 (2012).
 58. Yue, H. *et al.* The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular responses. *Biomaterials* **33**, 4013–4021 (2012).
 59. Liang, H. *et al.* Co-immobilization of multiple enzymes by metal coordinated nucleotide hydrogel nanofibers: improved stability and an enzyme cascade for glucose detection. *Nanoscale* **8**, 6071–6078 (2016).
 60. de Sousa, M., Visani de Luna, L. A., Fonseca, L. C., Giorgio, S. & Alves, O. L. Folic-

- Acid-Functionalized Graphene Oxide Nanocarrier: Synthetic Approaches, Characterization, Drug Delivery Study, and Antitumor Screening. *ACS Appl. Nano Mater.* **1**, 922–932 (2018).
61. Catania, F. *et al.* A Review on Recent Advancements of Graphene and Graphene-Related Materials in Biological Applications. *Applied Sciences* vol. 11 (2021).
 62. Liu, L. *et al.* Recent progress of graphene oxide-based multifunctional nanomaterials for cancer treatment. *Cancer Nanotechnol.* **12**, 18 (2021).
 63. Mei, D. *et al.* PEGylated Graphene Oxide Carried OH-CATH30 to Accelerate the Healing of Infected Skin Wounds. *Int. J. Nanomedicine* **16**, 4769–4780 (2021).
 64. Palmieri, V., Perini, G., De Spirito, M. & Papi, M. Graphene oxide touches blood: in vivo interactions of bio-coronated 2D materials. *Nanoscale Horizons* **4**, 273–290 (2019).
 65. Liao, K.-H., Lin, Y.-S., Macosko, C. W. & Haynes, C. L. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **3**, 2607–2615 (2011).
 66. Sasidharan, A. *et al.* Hemocompatibility and Macrophage Response of Pristine and Functionalized Graphene. *Small* **8**, 1251–1263 (2012).
 67. Xiong, S. *et al.* Targeted graphene oxide for drug delivery as a therapeutic nanoplatform against Parkinson's disease. *Biomater. Sci.* **9**, 1705–1715 (2021).
 68. Kesavan, S. *et al.* Ulvan loaded graphene oxide nanoparticle fabricated with chitosan and d-mannose for targeted anticancer drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **65**, 102760 (2021).
 69. Di Santo, R. *et al.* Protein corona profile of graphene oxide allows detection of glioblastoma multiforme using a simple one-dimensional gel electrophoresis technique: a proof-of-concept study. *Biomater. Sci.* **9**, 4671–4678 (2021).
 70. Di Santo, R. *et al.* Personalized Graphene Oxide-Protein Corona in the Human Plasma of Pancreatic Cancer Patients. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 491 (2020).
 71. Monopoli, M. P., Åberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 779 (2012).
 72. Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Understanding the correlation between in vitro and in vivo immunotoxicity tests for nanomedicines. *J. Control. Release* **172**, 456–466 (2013).
 73. Yadav, N., Kannan, D., Patil, S., Singh, S. & Lochab, B. Amplified Activity of Artesunate Mediated by Iron Oxide Nanoparticles Loaded on a Graphene Oxide Carrier for Cancer Therapeutics. *ACS Appl. Bio Mater.* **3**, 6722–6736 (2020).

74. Cai, B., Hu, K., Li, C., Jin, J. & Hu, Y. Bovine serum albumin bioconjugated graphene oxide: Red blood cell adhesion and hemolysis studied by QCM-D. *Appl. Surf. Sci.* **356**, 844–851 (2015).
75. Cao, W. *et al.* Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant. *Acta Biomater.* **112**, 14–28 (2020).
76. Xie, M., Deng, T., Li, J. & Shen, H. The camouflage of graphene oxide by red blood cell membrane with high dispersibility for cancer chemotherapy. *J. Colloid Interface Sci.* **591**, 290–299 (2021).
77. Mishra, R. K. *et al.* Biological effects of formation of protein corona onto nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* **175**, 1–18 (2021).
78. Mei, K.-C., Costa, P. M., Kreuzer, M. & Al-Jamal, K. T. Interpreting 2D Materials Bio-Nano Interactions: Influence of Aggregation Status, Protein Corona, Cell Culture Media, and Cell Types. *Adv. Mater. Interfaces* **n/a**, 2100251 (2021).
79. Li, H. *et al.* The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomater.* **129**, 57–72 (2021).
80. Kumari, S. *et al.* Time-dependent study of graphene oxide-trypsin adsorption interface and visualization of nano-protein corona. *Int. J. Biol. Macromol.* **163**, 2259–2269 (2020).
81. Braccia, C. *et al.* The lipid composition of few layers graphene and graphene oxide biomolecular corona. *Carbon N. Y.* **185**, 591–598 (2021).
82. Yin, X. & Wen, L. Protein corona reduced graphene oxide cytotoxicity by inhibiting endocytosis. *Colloid Interface Sci. Commun.* **45**, 100514 (2021).
83. Hajipour, M. J. *et al.* Personalized disease-specific protein corona influences the therapeutic impact of graphene oxide. *Nanoscale* **7**, 8978–8994 (2015).
84. Franqui, L. S. *et al.* Interaction of graphene oxide with cell culture medium: Evaluating the fetal bovine serum protein corona formation towards in vitro nanotoxicity assessment and nanobiointeractions. *Mater. Sci. Eng. C* **100**, 363–377 (2019).
85. Qi, Y. *et al.* Aggregation morphology is a key factor determining protein adsorption on graphene oxide and reduced graphene oxide nanomaterials. *Environ. Sci. Nano* **6**, 1303–1309 (2019).
86. Ci, X. *et al.* How the fluorographene replaced graphene as nanoadditive for improving tribological performances of GTL-8 based lubricant oil. *Friction* **9**, 488–501 (2021).
87. Robinson, J. T. *et al.* Properties of Fluorinated Graphene Films. *Nano Lett.* **10**, 3001–3005 (2010).
88. Duan, Q. *et al.* Molecular Dynamics Simulation for the Effect of Fluorinated Graphene

- Oxide Layer Spacing on the Thermal and Mechanical Properties of Fluorinated Epoxy Resin. *Nanomaterials* vol. 11 (2021).
89. Khan, A. H., Schirmann, E. & Kovi, K. K. Fluorinated graphene oxide, nanocrystalline diamond multilayer thin films for optical and electromagnetic limiting applications. *Emergent Mater.* **4**, 525–530 (2021).
 90. Karlický, F., Kumara Ramanatha Datta, K., Otyepka, M. & Zbořil, R. Halogenated Graphenes: Rapidly Growing Family of Graphene Derivatives. *ACS Nano* **7**, 6434–6464 (2013).
 91. Mandal, Peetam; Debbarma, J. S. M. A Review on the Emergence of Graphene in Photovoltaics Industry. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **11**, 15009–150036 (2021).
 92. Darabi, H., Adelifard, M. & Rajabi, Y. Characterization of nonlinear optical refractive index for graphene oxide–silicon oxide nanohybrid composite. *J. Nonlinear Opt. Phys. Mater.* **28**, 1950005 (2019).
 93. Bonavolontà, C. *et al.* Reduced graphene oxide on silicon-based structure as novel broadband photodetector. *Sci. Rep.* **11**, 13015 (2021).
 94. Ho, K.-I. *et al.* Fluorinated Graphene as High Performance Dielectric Materials and the Applications for Graphene Nanoelectronics. *Sci. Rep.* **4**, 5893 (2014).
 95. Wang, L. *et al.* Tuning the light response of organic field-effect transistors using fluorographene nanosheets as an interface modification layer. *J. Mater. Chem. C* **2**, 6484–6490 (2014).
 96. Wu, Y., Jiang, F., Qiang, Y. & Zhao, W. Synthesizing a novel fluorinated reduced graphene oxide-CeO₂ hybrid nanofiller to achieve highly corrosion protection for waterborne epoxy coatings. *Carbon N. Y.* **176**, 39–51 (2021).
 97. Mamaril, G. S. S. *et al.* Nitrogen and fluorine co-doped 3-dimensional reduced graphene oxide architectures as high-performance electrode material for capacitive deionization of copper ions. *Sep. Purif. Technol.* **272**, 117559 (2021).
 98. Razaghi, M. *et al.* Highly fluorinated graphene oxide nanosheets for anticancer linoleic-curcumin conjugate delivery and T2-Weighted magnetic resonance imaging: In vitro and in vivo studies. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **60**, 101967 (2020).
 99. Allen, C., Metternicht, G. & Wiedmann, T. Priorities for science to support national implementation of the sustainable development goals: A review of progress and gaps. *Sustain. Dev.* **29**, 635–652 (2021).
 100. Zinchenko, V. V, Levkulych, V. V, Levkulych, V. V & Svyshcho, V. Y. Sustainable development goals as an integrative basis of the global public strategy for the

- effectiveness of ecology, education and science at all levels. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **635**, 12001 (2021).
101. Zhan, J. X. & Santos-Paulino, A. U. Investing in the Sustainable Development Goals: Mobilization, channeling, and impact. *J. Int. Bus. Policy* **4**, 166–183 (2021).
 102. Anastas, P., Warner, John Charles., & P. T. *Green chemistry : theory and practice*. (Oxford University Press, 1998).
 103. Anastas, P. & Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 301–312 (2010).
 104. Zuin, V. G., Eilks, I., Elschami, M. & Kümmerer, K. Education in green chemistry and in sustainable chemistry: perspectives towards sustainability. *Green Chem.* **23**, 1594–1608 (2021).
 105. Fonseca, L. C. *et al.* Nanocomposites based on graphene oxide and mesoporous silica nanoparticles: Preparation, characterization and nanobiointeractions with red blood cells and human plasma proteins. *Appl. Surf. Sci.* **437**, 110–121 (2018).
 106. Alves, O. L. Técnicas de Síntese em Atmosfera Inerte. *Quim. Nova* **9**, 276–281 (1986).
 107. Yu, L., Dong, K., Zhang, Y., Wang, Q. & Zhi, Q. Tuned n/n or n/p heterojunctions for reduced graphene oxide and titania nanosheets and their electrochemical properties. *Mater. Chem. Phys.* **148**, 803–809 (2014).
 108. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* **235**, 337–351 (2016).
 109. Chen, K., Liu, F., Song, S. & Xue, D. Water crystallization to create ice spacers between graphene oxide sheets for highly electroactive graphene paper. *CrystEngComm* **16**, 7771–7776 (2014).
 110. Stankovich, S. *et al.* Graphene-based composite materials. *Nature* **442**, 282–286 (2006).
 111. Pan, Y., Wu, T., Bao, H. & Li, L. Green fabrication of chitosan films reinforced with parallel aligned graphene oxide. *Carbohydr. Polym.* **83**, 1908–1915 (2011).
 112. Huh, S. H. X-ray diffraction of multi-layer graphenes: Instant measurement and determination of the number of layers. *Carbon N. Y.* **78**, 617–621 (2014).
 113. Ju, H.-M., Huh, S. H., Choi, S.-H. & Lee, H.-L. Structures of thermally and chemically reduced graphene. *Mater. Lett.* **64**, 357–360 (2010).
 114. Liaros, N., Iliopoulos, K., Stylianakis, M. M., Koudoumas, E. & Couris, S. Optical limiting action of few layered graphene oxide dispersed in different solvents. *Opt. Mater. (Amst)*. **36**, 112–117 (2013).
 115. Akbari, A. *et al.* Large-area graphene-based nanofiltration membranes by shear

- alignment of discotic nematic liquid crystals of graphene oxide. *Nat. Commun.* **7**, 10891 (2016).
116. Dimiev, A. M. & Eigler, S. *Graphene Oxide: Fundamentals and Applications*. (Wiley, 2016).
117. Konkana, B. & Vasudevan, S. Understanding Aqueous Dispersibility of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide through pKa Measurements. *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 867–872 (2012).
118. Acik, M. *et al.* The Role of Oxygen during Thermal Reduction of Graphene Oxide Studied by Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **115**, 19761–19781 (2011).
119. Eda, G. *et al.* Blue Photoluminescence from Chemically Derived Graphene Oxide. *Adv. Mater.* **22**, 505–509 (2010).
120. Luo, Z., Lu, Y., Somers, L. A. & Johnson, A. T. C. High Yield Preparation of Macroscopic Graphene Oxide Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 898–899 (2009).
121. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K. & Kim, S.-J. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon N. Y.* **53**, 38–49 (2013).
122. Pei, S. & Cheng, H.-M. The reduction of graphene oxide. *Carbon N. Y.* **50**, 3210–3228 (2012).
123. Wu, J.-B., Lin, M.-L., Cong, X., Liu, H.-N. & Tan, P.-H. Raman spectroscopy of graphene-based materials and its applications in related devices. *Chem. Soc. Rev.* **47**, 1822–1873 (2018).
124. Ferrari, A. C. *et al.* Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. *Phys. Rev. Lett.* **97**, 187401 (2006).
125. Toh, S. Y., Loh, K. S., Kamarudin, S. K. & Daud, W. R. W. Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: Synthesis and characterisation. *Chem. Eng. J.* **251**, 422–434 (2014).
126. Gómez-Navarro, C. *et al.* Atomic Structure of Reduced Graphene Oxide. *Nano Lett.* **10**, 1144–1148 (2010).
127. McCallion, C., Burthem, J., Rees-Unwin, K., Golovanov, A. & Pluen, A. Graphene in therapeutics delivery: Problems, solutions and future opportunities. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **104**, 235–250 (2016).
128. Bussy, C., Ali-Boucetta, H. & Kostarelos, K. Safety Considerations for Graphene: Lessons Learnt from Carbon Nanotubes. *Acc. Chem. Res.* **46**, 692–701 (2013).

129. Jia, J., Kan, C.-M., Lin, X., Shen, X. & Kim, J.-K. Effects of processing and material parameters on synthesis of monolayer ultralarge graphene oxide sheets. *Carbon N. Y.* **77**, 244–254 (2014).
130. Pan, S. & Aksay, I. A. Factors Controlling the Size of Graphene Oxide Sheets Produced via the Graphite Oxide Route. *ACS Nano* **5**, 4073–4083 (2011).
131. Chen, H., Wu, M. & Li, C. Structural integrity versus lateral size: Enhancing graphene-based film materials by reducing planar defects rather than flake boundary. *Carbon N. Y.* **139**, 216–225 (2018).
132. Derjaguin, B. & Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **43**, 30–59 (1993).
133. Hong, B. J., Compton, O. C., An, Z., Eryazici, I. & Nguyen, S. T. Successful Stabilization of Graphene Oxide in Electrolyte Solutions: Enhancement of Biofunctionalization and Cellular Uptake. *ACS Nano* **6**, 63–73 (2012).
134. Wei, X.-Q. *et al.* Insight into the Interaction of Graphene Oxide with Serum Proteins and the Impact of the Degree of Reduction and Concentration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 13367–13374 (2015).
135. Chen, J., Yao, B., Li, C. & Shi, G. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon N. Y.* **64**, 225–229 (2013).
136. de Sousa, M. *et al.* Covalent functionalization of graphene oxide with d-mannose: evaluating the hemolytic effect and protein corona formation. *J. Mater. Chem. B* **6**, 2803–2812 (2018).
137. Gao, W. The Chemistry of Graphene Oxide BT - Graphene Oxide: Reduction Recipes, Spectroscopy, and Applications. in (ed. Gao, W.) 61–95 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-15500-5_3.
138. Li, Y. *et al.* Synthesis of partially hydrogenated graphene and brominated graphene. *J. Mater. Chem.* **22**, 15021–15024 (2012).
139. Stankovich, S. *et al.* Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon N. Y.* **45**, 1558–1565 (2007).
140. Yin, F., Wang, Z., Li, Z. & Li, C. Silver-Catalyzed Decarboxylative Fluorination of Aliphatic Carboxylic Acids in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10401–10404 (2012).
141. Patel, N. R. & Flowers, R. A. Mechanistic Study of Silver-Catalyzed Decarboxylative Fluorination. *J. Org. Chem.* **80**, 5834–5841 (2015).