

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Engenharia de Materiais

CATARINA BRUNHARA BATISTA

**Síntese e redução do grafeno oxidado estabilizado com diferentes moléculas
para possíveis aplicações em fotohipertermia**

São Carlos
2016

CATARINA BRUNHARA BATISTA

**Síntese e redução do grafeno oxidado estabilizado com diferentes moléculas
para possíveis aplicações em fotohipertermia**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo (USP) para
obtenção do título de Engenheira de Materiais
e Manufatura.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Salomão.

São Carlos

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

BB
333s Brunhara Batista, Catarina
Síntese e redução do grafeno oxidado estabilizado
com diferentes moléculas para aplicação em
fotohipertermia / Catarina Brunhara Batista; orientador
Rafael Salomão. São Carlos, 2016.

Monografia (Graduação em Engenharia De Materiais e
Manufatura) -- Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2016.

1. Grafeno. 2. Nanomedicina. 3. Nanomaterial. 4.
Fotohipertermia. I. Título.

FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO DE DEFESA DE TCC

Relatório de defesa pública de Trabalho de Conclusão de Curso da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo.

Nome: Catarina Brunhara Batista		Nº USP: 7591351
Orientador: Rafael Salomão		Nº USP: 6265000
Título do TCC: Síntese e redução do grafeno oxidado estabilizado com diferentes moléculas para aplicação em fotohipertermia		
Curso: Engenharia de Materiais e Manufatura		
Disciplina: SMM0325 - Trabalho de Conclusão		
Local da defesa:	Data de defesa: 10/10/2016	Hora da defesa: 10:00:00

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passou a palavra aos examinadores para as devidas arguições. Em seguida, a Comissão Julgadora proclamou o resultado:

Membros da Comissão Julgadora	Vínculo	Sigla Unidade	Nota
Rafael Salomão	EESC	SMM	10,0
Eduardo Bellini Ferreira	EESC	SMM	9,0
Ligia Maria Manzine Costa	EESC	SMM	8,0

Média= 9,0			
Resultado final	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado	<input checked="" type="checkbox"/> Necessita de ajustes	<input type="checkbox"/> Reprovado

Observações da Comissão Julgadora
Ver sugestões da banca no texto impresso

Eu, *Priscila Granato* Auxiliar Acadêmico, lavrei o presente relatório que assino com os(as) senhores(as). São Carlos, 10/10/2016.

<i>Eduardo</i> Eduardo Bellini Ferreira	<i>Ligia Maria Manzine Costa</i> Ligia Maria Manzine Costa
<i>Rafael Salomão</i> Rafael Salomão	<i>Priscila Granato</i> Auxiliar Acadêmico

À minha querida família, com muito amor,
respeito e gratidão, por sempre me apoiarem a
alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade de São Paulo, à Escola de Engenharia de São Carlos e ao Departamento de Engenharia de Materiais pelo comprometimento com a educação de seus alunos.

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Rafael Salomão, por me orientar neste trabalho de conclusão de curso. Agradeço também ao Dr. Valtencir Zucolotto e ao Doutorando Fabrício Santos pela oportunidade e parceria no projeto de iniciação científica que originou este trabalho, do qual eu muito me orgulho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo por financiar o projeto de iniciação científica (processo FAPESP: 2015/07909-0) possibilitando que eu conduzisse essa pesquisa.

E mais importante, agradeço aos meus pais, Marcia e Sebastião, e às minhas irmãs, Gabriela e Patricia, pelo amor, carinho e compreensão que foram essenciais durante meus anos de graduação.

RESUMO

BATISTA, C. B. **Síntese e redução do grafeno oxidado estabilizado com diferentes moléculas para possíveis aplicações em fototerapia hipertermia.** 2016. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Departamento de Engenharia de Materiais, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Conhecido por suas propriedades únicas e excepcionais, o grafeno foi descoberto em 2004 e desde então é amplamente estudado e analisado. Já a nanomedicina, por sua vez, é uma das áreas nas quais este material tem suas aplicações exploradas: desde estudos do grafeno na liberação controlada de drogas até a sua utilização em novas terapias para o tratamento de alguns tipos de câncer. Esta última aplicação foi o foco deste trabalho, o qual se iniciou pela obtenção do grafeno em sua forma oxidada através do método de Hummer's modificado, partindo-se do grafite expandido. Em seguida, o Grafeno Oxidado (GO) foi reduzido junto às moléculas orgânicas de glutamina e lactose, utilizadas em sínteses distintas. O resultado obtido consistiu em um material estabilizado e funcionalizado, com potencial para utilização em terapias fototérmicas contra células tumorais. Através das técnicas de caracterização, foram identificadas as propriedades do Grafeno Reduzido (RGO) que consistiram em pequeno tamanho de folhas e alta estabilidade por um período de pouco mais de um mês, preservando-se assim suas propriedades e evitando a formação de agregados. Para avaliar as propriedades fototérmicas do grafeno, testes foram realizados a fim de verificar sua resposta na região do infravermelho próximo e os resultados mostraram que o aumento de temperatura das amostras de RGO é proporcional à sua concentração, além de evidenciar o potencial deste material para aplicações na terapia de fototerapia hipertermia para tratamento de tumores sólidos.

Palavras-chave: grafeno, nanomaterial, nanomedicina, fototerapia hipertermia.

ABSTRACT

BATISTA, C. B. **Synthesis and reduction of graphene oxide stabilized with different molecules for possible applications in photohyperthermia.** 2016. Monograph (Coursework Final) – Department of Materials Engineering, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2016.

Known for its unique and exceptional properties, graphene was discovered in 2004 and since then it has been widely studied and analysed. Nanomedicine is one of the areas at which this material has its applications explored, from studies on the performance of the graphene in drug delivery up to new therapies that aim the treatment of some types of cancer. This last example of application was the focus of this project, which was initiated by obtaining graphene in its oxidized form through Hummer's modified method, based on expanded graphite. Following, the Oxide Graphene (GO) was reduced with organic molecules like glutamine and lactose, used in separate syntheses. The result was a stable and functionalized material with potential for use in photothermal therapies against tumoral cells. Using characterization techniques, the properties of Reduced Graphene Oxide (RGO) were identified, which consisted of sheets with small size and high stability for a about a month, preserving its properties and avoiding the formation of aggregates. In order to evaluate photothermal properties of graphene, tests were performed to verify its response in the near infrared region and the results have shown that the temperature increase of the RGO sample was proportional to its concentration, thus demonstrating the potential of this material for applications in photohyperthermia for treating tumoral cells.

Key-words: graphene, nanomaterial, nanomedicine, photohyperthermia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O grafeno como material bidimensional, base para os outros compostos de carbono. Pode-se observar, da esquerda para direita: fulereno, nanotubo de carbono e grafite. FONTE: (GEIM; NOVOSELOV, 2007).....	18
Figura 2 - Grafeno: (a) Representação do grafeno com várias camadas atômicas, (b) Única camada de grafeno, (c) Grafeno Oxidado, (d) Grafeno Reduzido. FONTE: (JASTRZEBSKA; KURTYCZ; OLSZYNA, 2012).	19
Figura 3 - Configuração dos equipamentos utilizados nos testes de fotohipertermia.	25
Figura 4 - Amostras dos materiais produzidos a) GO, b) RGO/GLU, c) RGO/LAC e d) Grafeno Reduzido apenas com hidróxido de amônia (RGO/NH ₃).....	28
Figura 5 - Espectro UV-vis obtido para o GO e RGO/GLU.....	29
Figura 6 - Espectro UV-vis obtido para o GO e RGO/LAC.	30
Figura 7 - Distribuição do tamanho das folhas do Grafeno Oxidado (a) após síntese (b) após 35 horas no ultrassom de ponta.	31
Figura 8 - Potencial Zeta para do grafeno oxidado após sua síntese (GO 0h) e após 35 horas no ultrassom de ponta.	32
Figura 9 - Distribuição do tamanho das folhas de RGO/GLU.	33
Figura 10 - Acompanhamento do Potencial Zeta para o RGO/GLU durante 20 dias.	34
Figura 11 - Distribuição do tamanho das folhas de RGO/LAC.	35
Figura 12- Imagens obtidas pelo Microscópio de Força Atômica. a) GO obtido após síntese. b) GO após as 35 horas no ultrassom de ponta.	36
Figura 13 - a) Imagens obtidas pelo Microscópio de Força Atômica para o RGO/GLU e b) Perfil de rugosidade de quatro regiões da amostra na qual o eixo y mostra a espessura do material.....	37
Figura 14 - Espectro de FTIR para o GO e RGO/GLU.	38
Figura 15 - Espectro de FT-IR para o RGO/LAC e α -lactose.....	39

Figura 16 - Análises para o RGO/GLU. Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente para amostras (a) 5mg.L⁻¹ (b) 10 mg.L⁻¹ (c) 15mg.L⁻¹. Taxa de aquecimento e Porcentagem de aumento de temperatura para amostras (d) 5mg.L⁻¹ (e) 10 mg.L⁻¹ (f) 15mg.L⁻¹ 40

Figura 17 - Análises para o RGO/LAC. Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente para amostras (a) 5mg.L⁻¹ (b) 10 mg.L⁻¹ (c) 15mg.L⁻¹. Taxa de aquecimento e Porcentagem de aumento de temperatura para amostras (d) 5mg.L⁻¹ (e) 10 mg.L⁻¹ (f) 15mg.L⁻¹ 41

Figura 18 - Análises para o RGO/NH₃. Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente para amostras (a) 5mg.L⁻¹ (b) 10 mg.L⁻¹ (c) 15mg.L⁻¹. Taxa de aquecimento e Porcentagem de aumento de temperatura para amostras (d) 5mg.L⁻¹ (e) 10 mg.L⁻¹ (f) 15mg.L⁻¹ 42

Figura 19 - a) Tempo necessário para equilíbrio da temperatura das amostras. b) Tempo necessário para aumentar em 6°C a temperatura das amostras. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Potencial Zeta para o RGO/LAC.	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E COMPOSTOS

AFM – Microscópio de Força Atômica (sigla do inglês, *Atomic Force Microscopy*)

AP - Porcentagem do aumento da temperatura em relação à temperatura máxima atingida

AT - Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente

DLS – Espalhamento Dinâmico da Luz (sigla do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

FTIR – Espectros de Infravermelho Médio (sigla do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

GLU – L-glutamina

GO – Grafeno Oxidado

GQR – Grafeno Quimicamente Reduzido

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

HCl – Ácido Clorídrico

KMnO₄ - Permanganato de Potássio

K₂S₂O₈ - Persulfato de Potássio

LAC – α -Lactose

P₂O₅ – Pentóxido de Fósforo

RGO – Grafeno Reduzido

RGO/GLU – Grafeno Reduzido com L-glutamina

RGO/LAC - Grafeno Reduzido com α -Lactose

RGO/NH₃ - Grafeno Reduzido com Hidróxido de Amônio

TA - Taxa de aquecimento em função do tempo

UV-vis - Espectroscopia no Ultravioleta Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1.OBJETIVOS	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1.NANOMEDICINA E NANOTECNOLOGIA	17
2.2.O GRAFENO.....	18
2.3.GRAFENO EM APLICAÇÕES NA NANOMEDICINA	21
3. METODOLOGIA	23
3.1.SÍNTESE E OBTENÇÃO DO GRAFENO OXIDADO.....	23
3.2.DIMINUIÇÃO DO TAMANHO DAS FOLHAS DE GRAFENO OXIDADO.	24
3.3.REDUÇÃO DO GRAFENO OXIDADO COM L-GLUTAMINA	24
3.4.REDUÇÃO DO GRAFENO OXIDADO COM α -LACTOSE	25
3.5.TERAPIA DE FOTOHIPERTERMIA	25
3.6.CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1. OBTENÇÃO DO GO E REDUÇÃO DO RGO/GLU E RGO/LAC	28
4.2. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL	29
4.2.1. GRAFENO OXIDADO (GO) E GRAFENO REDUZIDO COM L- GLUTAMINA (RGO/GLU)	29
4.2.2. GRAFENO REDUZIDO COM α -LACTOSE (RGO/LAC)	30
4.3. ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ E POTENCIAL ZETA	30
4.3.1. GRAFENO OXIDADO (GO)	30
4.3.2. GRAFENO REDUZIDO COM L-GLUTAMINA (RGO/GLU).....	33
4.3.3. GRAFENO REDUZIDO COM α -LACTOSE (RGO/LAC)	34
4.4. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	36
4.5. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO MÉDIO	38
4.5.1. GRAFENO OXIDADO (GO) E GRAFENO REDUZIDO COM L- GLUTAMINA (RGO/GLU)	38
4.5.2. GRAFENO REDUZIDO COM α -LACTOSE	39
4.6. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOTÉRMICAS DO GRAFENO... 40	
4.6.1. RGO/GLU EM ÁGUA.....	40
4.6.2. RGO/LAC EM ÁGUA.....	41

4.6.3. RGO/NH ₃ EM ÁGUA.....	42
4.6.4. COMPARAÇÃO ENTRE O RGO/GLU, RGO/LAC E RGO/NH ₃	43
5. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho de conclusão de curso é baseado no projeto de iniciação científica da autora, que teve como principal tema a produção do grafeno quimicamente reduzido e suas aplicações na área da nanomedicina. O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa (processo FAPESP: 2015/07909-0) e desenvolvido de junho/2015 a maio/2016 no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC – USP) orientado pelo Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Por se tratar de um material relativamente novo, o grafeno tem suas aplicações cada vez mais estudadas e conhecidas nas mais diversas áreas do conhecimento. Na nanomedicina, este material possui grande potencial em aplicações voltadas a terapias contra células tumorais, tema que incentivou a realização deste trabalho. Partindo-se de tal aplicação, o trabalho visou à produção de um grafeno mais estável e menos tóxico através da hipótese de que sua redução junto a moléculas de compostos inofensivos à saúde humana resultaria em um material com melhores propriedades e que facilitaria sua internalização nas células doentes, potencializando sua aplicação neste novo tipo de terapia e, conseqüentemente, trazendo avanço e inovação na área da nanomedicina.

Assim, neste trabalho o grafeno oxidado foi obtido e posteriormente reduzido com as moléculas orgânicas de glutamina e lactose, componentes comuns ao corpo humano, explorando a hipótese de que esta maneira de redução resulta em um produto menos agressivo à saúde. Em seguida, a caracterização do material produzido permitiu que suas propriedades fossem conhecidas e comparadas com os dados existentes na literatura. Da mesma forma, os testes de hipertermia posteriormente realizados serviram para verificar as propriedades fototérmicas do grafeno, tema de grande relevância no seu estado da arte.

1.1. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo consistiu em reduzir o grafeno oxidado na presença de moléculas orgânicas a fim de se obter um material estável, de baixa toxicidade e pouca agregação em meios biológicos e que responda na região do infravermelho próximo (808 nm) para aplicação na terapia fototérmica, também conhecida por fotohipertermia.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Obtenção do grafeno oxidado através do método de Hummer's modificado e sua caracterização;

- Redução do grafeno oxidado junto à molécula de glutamina e sua caracterização;
- Redução do grafeno oxidado junto à molécula de lactose e sua caracterização;
- Avaliação das propriedades fototérmicas das duas formas de grafeno reduzido obtidas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. NANOMEDICINA E NANOTECNOLOGIA

A nanomedicina pode ser compreendida como uma intervenção médica em escala molecular, que visa curar uma doença ou reparar danos em tecidos, músculos ou órgãos. Assim, a união do que se conhece sobre o corpo humano e de tecnologias utilizadas em escala molecular possibilitam o diagnóstico e tratamento de doenças. Nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse por explorar e conhecer mais sobre a nanomedicina, gerando um grande aumento no número de artigos publicados sobre esse assunto, chegando a mais de 1000 no ano de 2004 (WAGNER et al., 2006). Já a nanotecnologia, por sua vez, é uma área da ciência que visa à manipulação de átomos e moléculas visando à construção de estruturas em escala nanométricas que, em geral, possuem propriedades distintas daquelas observadas nas escalas micro e macroscópicas (MOGHIMI; HUNTER; MURRAY, 2005). Este ramo da ciência é multidisciplinar, uma vez que envolve o conhecimento de áreas como a biologia, química, engenharia e física. É graças a esse entrelaçamento de informações que tecnologias tais como a entrega controlada de fármacos, imageamento por nanoveículos e dispositivos feitos de nanocomponentes puderam ser desenvolvidas (FERRARI, 2005). Desta maneira, estudos nas áreas de nanomedicina e nanotecnologia, quando desenvolvidos em conjunto, podem trazer novas metodologias de diagnóstico e tratamento de doenças. Isto ocorre porque os nanomateriais levam a grandes oportunidades de inovação em diversos ramos da ciência por possuírem propriedades e características únicas, sendo aquelas em medicina o foco deste trabalho.

Nas últimas décadas, técnicas e dispositivos baseados em nanopartículas aumentaram, bem como o número de empresas de pequeno e médio porte que investem em projetos e pesquisas nesta área (WAGNER et al., 2006). Dentre esses, destacam-se aqueles compostos por drogas-lipossomais e de nanocápsulas de polímero-medicamento, onde a droga pode estar internalizada na nanocápsula, ou ligada externamente à nanopartícula, sendo estas poliméricas, metálicas, óxidos metálicos, terras raras e a base de carbono (DE JONG; BORM, 2008).

Entre as nanopartículas à base de carbono destacam-se o grafeno e os nanotubos de carbono mostrados na Figura 1. Esses últimos consistem em uma estrutura cilíndrica composta por átomos de carbono e são explorados em diversas áreas da nanomedicina, como na liberação controlada de drogas e no tratamento de câncer (LIU et al., 2011). Já o grafeno,

por sua vez, é um material bidimensional (2D) no qual seus átomos de carbono estão empacotados em uma estrutura hexagonal em uma única camada atômica (SCHNIEPP et al., 2006).

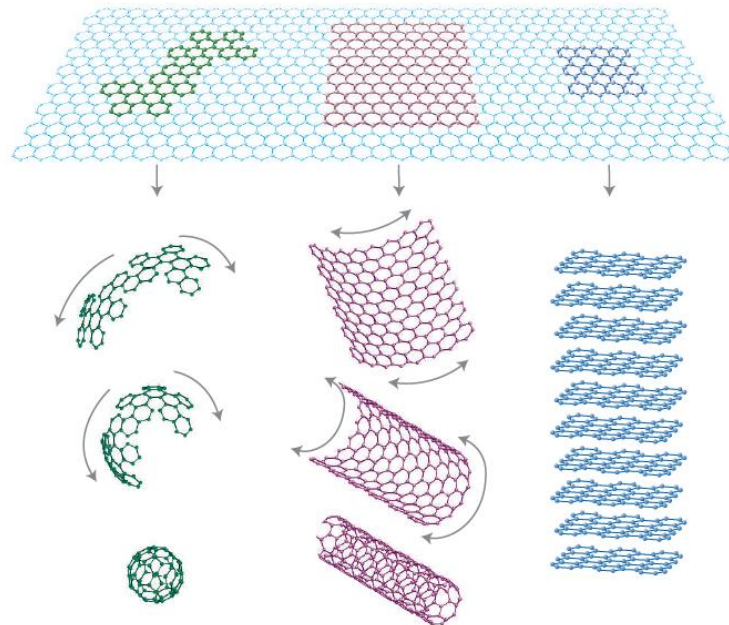


Figura 1 - O grafeno como material bidimensional, base para os outros compostos de carbono. Pode-se observar, da esquerda para direita: fullereno, nanotubo de carbono e grafite. FONTE: (GEIM; NOVOSELOV, 2007)

2.2.O GRAFENO

Na década de 1960, o grafite foi estudado mais intensamente e se constatou a alta condutividade elétrica dos seus planos basais quando intercalado com outros componentes. No entanto, baseando-se em cálculos teóricos, não se acreditava que fosse possível a existência de materiais bidimensionais (SINGH et al., 2011). Em 2004, na cidade de Manchester, Inglaterra, Andre Geim e Konstantin Novoselov conseguiram isolar e estudar pela primeira vez o grafeno. É possível que existam grafenos compostos por apenas uma camada atômica, duas ou várias, como mostrado na Figura 2(a) e 2(b). No entanto, este número se limita a 10 camadas, uma vez que este é o limite que aproxima o material do limite 3D devido a sua estrutura eletrônica progredir com o seu número de camadas (GEIM; NOVOSELOV, 2007).

Este material apresenta propriedades excepcionais, tais como alta mobilidade elétrica de seus portadores de carga, o que lhe confere grande potencial eletrônico, bem como suas propriedades mecânicas, térmicas e óticas; diferenciando o grafeno de outros materiais e

possibilitando suas mais diversas aplicações como transistores, sensores e até mesmo dispositivos para armazenamento de energia (SCHWIERZ, 2010) (SCHEDIN et al., 2007), (SUN; WU; SHI, 2011). Além disso, na área da nanomedicina, este material vem sendo amplamente analisado e explorado, podendo destacar suas aplicações mais comuns na terapia fotodinâmica e fototérmica, entrega controlada de drogas e como biosensores (FENG; LIU, 2011).

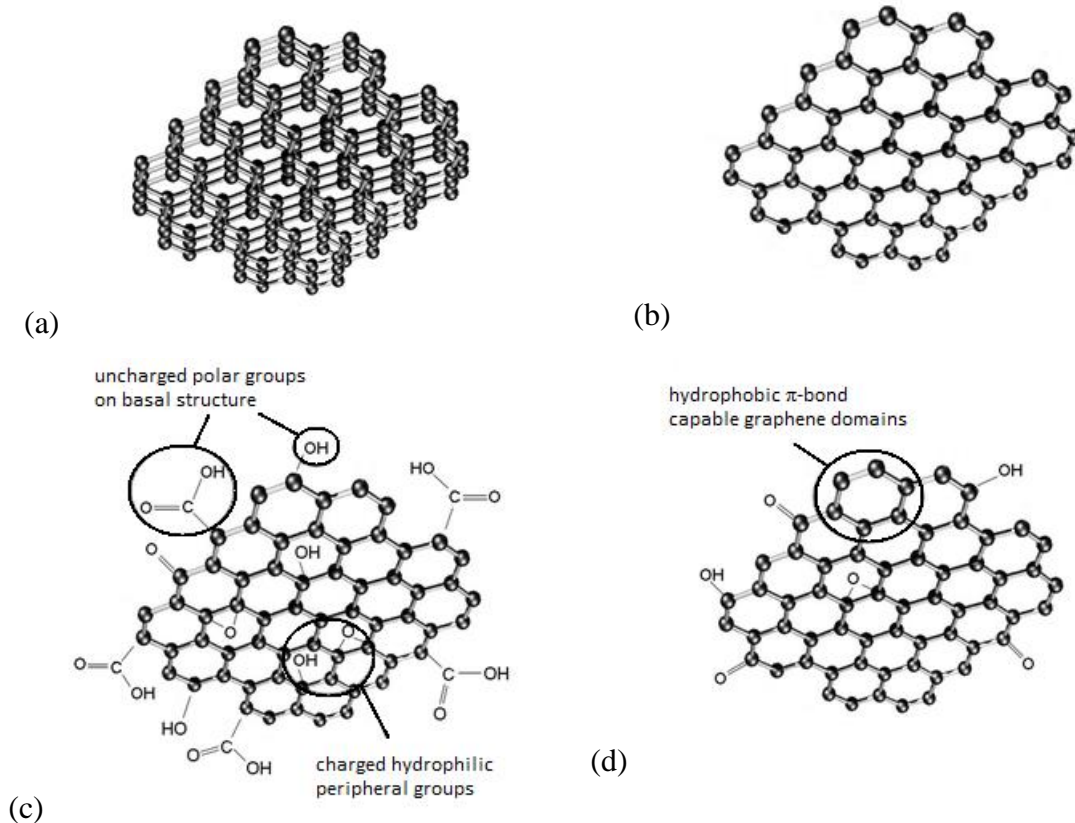


Figura 2 - Grafeno: (a) Representação do grafeno com várias camadas atômicas, (b) Única camada de grafeno, (c) Grafeno Oxidado, (d) Grafeno Reduzido. FONTE: (JASTRZEBSKA; KURTYCZ; OLSZYNA, 2012).

No entanto, pouco se sabe sobre a interação do grafeno com o meio biológico e ambiental. Por isso, vários estudos estão sendo realizados a fim de se conhecer mais sobre a toxicidade deste nanomaterial. Em um deles, (WANG et al., 2011), foi analisada a interação entre o Grafeno Oxidado (GO), Figura 2(c), e células de fibroblasto humano, bem como os efeitos da presença deste material em camundongos. Os resultados mostraram que a citotoxicidade do grafeno depende principalmente da sua concentração, ou seja, altas doses de grafeno oxidado proporcionam uma toxicidade severa, tornando-o difícil de ser excretado pelos rins e se acumulando nesses órgãos dos animais testados. Outro estudo, que também

utilizou camundongos para análise da toxicidade do grafeno oxidado, mostrou que este material se acumulou principalmente nos pulmões, sendo mais uma vez, dificilmente excretado e levando a efeitos adversos nos organismos testados (ZHANG, X. et al., 2011). Desta forma, um grande desafio para utilização do grafeno na nanomedicina e, conseqüentemente, no corpo humano, consiste em diminuir ou até mesmo acabar com os efeitos adversos deste material em organismos vivos.

Para obtenção do grafeno, diversos são os métodos propostos. Entre eles pode-se citar: esfoliação mecânica, esfoliação química, deposição química de vapor, síntese do grafeno oxidado, redução química, entre outras (SINGH et al., 2011). No entanto, o mais utilizado é o método de Hummer's modificado (HUMMERS; OFFEMAN, 1958), que consiste na oxidação do grafite. Neste procedimento, ocorre a quebra das ligações de Van der Waals entre as camadas de carbono e a inserção de grupos funcionais nessa folha, como hidroxilas, epóxidos, carboxilas e carbonilas, formando-se o grafeno oxidado. Devido à presença de tais grupos funcionais, este material é muito oxigenado, fato que torna suas folhas altamente hidrofílicas e resulta em um material dispersável em água e que forma dispersões estáveis, mas não é compatível com a maioria dos polímeros orgânicos.

O grafeno em sua forma oxidada é isolante elétrico, característica que limita muitas de suas aplicações (STANKOVICH et al., 2006). No entanto, sua condutividade elétrica pode ser aumentada com a redução química desse material, resultando no Grafeno Reduzido (RGO), Figura 2(d). Durante a reação de redução, os grupos funcionais contendo oxigênio são retirados da estrutura do grafeno oxidado e, conseqüentemente, ligações são restauradas. Isto resulta em um material condutor e com alta tendência de agregação de suas folhas em meio aquoso (STANKOVICH et al., 2007). Entre as maneiras de obtenção do grafeno reduzido, pode-se destacar a redução térmica; redução química que engloba a utilização de agentes químicos, foto-catalisadores ou até mesmo redução eletroquímica; reações envolvendo mais que uma etapa (PEI; CHENG, 2012).

Existem aplicações distintas tanto para o GO quanto para a sua forma reduzida. Isto porque mesmo que ambos sejam feitos basicamente do mesmo material, a quantidade de oxigênio ligado às folhas de grafeno resulta em propriedades muito diferentes. Em geral, para obtenção do RGO são utilizados agentes redutores tais como hidrazina e o hidrato de hidrazina ou dimetil-hidrazina. No entanto, esses compostos são muitas vezes tóxicos e perigosos (ZHU et al., 2010), o que levou a busca por uma síntese mais branda que resultassem em produtos menos agressivos ao corpo humano. Essas alternativas podem ser encontradas reduzindo-se o GO na presença de moléculas como glicose, frutose e sacarose,

por exemplo (AKHAVAN et al., 2012). O produto resultante é menos tóxico e estável em água por longos períodos. Além disso, o Grafeno Quimicamente Reduzido (GQR) possui uma ampla faixa de absorção óptica, estendendo-se do ultravioleta ao infravermelho médio, podendo ser utilizado em diferentes aplicações ópticas (MARKOVIC et al., 2011; TIAN et al., 2011).

2.3. GRAFENO EM APLICAÇÕES NA NANOMEDICINA

A palavra “hipertermia” denomina uma elevação da temperatura corporal de um organismo vivo, evento que pode causar danos e comprometer o metabolismo. Para o corpo humano, o aumento de temperatura acima dos 37°C indica uma anormalidade que leva o organismo à febre, podendo causar danos irreversíveis ou até mesmo a destruição dos tecidos. Isto porque acima de 39°C a desnaturação das proteínas é iniciada e, como consequência, ocorre sua agregação, afetando a dinâmica celular (LEPOCK et al., 1987). No entanto, apesar do fenômeno da hipertermia ser maléfico ao corpo humano, quando controlado pode ser utilizado de maneira positiva no tratamento de doenças como o câncer (WUST et al., 2002).

Assim, induzir à morte células doentes no organismo de forma localizada, como por exemplo, células tumorais, é uma maneira de utilizar a hipertermia para obter resultados terapêuticos. Em geral, é utilizada em conjunto com outros tipos de tratamentos contra o câncer, como a radioterapia e quimioterapia, pois potencializa os danos causados às células tumorais (HILDEBRANDT et al., 2002; WUST et al., 2002). Atualmente, esse mecanismo vem sendo estudado pela nanomedicina através do uso de nanopartículas que atuem como agente capaz de absorver radiação e transformá-la em calor, causando um aquecimento local e levando à morte as células atingidas (CHENG et al., 2012). Assim, a fototerapia, ou terapia fototérmica, utiliza o fenômeno da hipertermia para causar danos às células ou aos tecidos corporais doentes, através do aumento da temperatura.

Para que uma nanopartícula possa ser utilizada nesta terapia é importante que ela possua algumas características, como: a) ter tamanho reduzido (escala de nanômetros) para que possa circular pelas veias e artérias do organismo e ser incorporada pelas células; b) permitir a formação de uma dispersão estável no meio de interesse; c) ser biocompatível com os fluidos corporais e produzir calor quando excitada por uma fonte externa (KONG; BRAUN; DEWHIRST, 2000). A terapia fototérmica é utilizada principalmente no tratamento de tumores sólidos e superficiais e a princípio, esperava-se que tanto tecidos saudáveis quanto os tumorais absorvessem o calor, reduzindo a eficiência do tratamento. No entanto, para evitar

que partes saudáveis do corpo absorvam a irradiação e sejam induzidas à morte, lasers com determinados comprimentos de onda são utilizados para atingir a chamada janela biológica (SMITH; MANCINI; NIE, 2009) (WEISSLEDER, 2001). Este termo pode ser definido como um intervalo no espectro onde o tecido corporal parece ser transparente, ou seja, não absorve a luz emitida e conseqüentemente, não a transforma em calor.

Em relação ao grafeno reduzido, este nanomaterial apresenta as propriedades citadas acima que são necessárias para sua aplicação em terapias contra o câncer que utilizem o fenômeno da hipertermia, além de também possuir a característica intrínseca de alta absorção no infravermelho, ou seja, radiação entre 1 μm e 700 nm. Vários artigos contemplam estudos realizados com o grafeno em aplicações em terapias contra tumores. Em um deles, a doxorrubicina, medicamento tradicionalmente utilizado na quimioterapia, foi ligada ao grafeno funcionalizado com um polímero e a nanopartícula resultante foi utilizada na terapia fototérmica. Além de o grafeno apresentar todas as propriedades requeridas para aplicação neste tipo de terapia, a doxorrubicina ligada às suas folhas potencializou sua aplicação, aumentando a eficiência do teste realizado (ZHANG, W. et al., 2011).

Outro estudo mostra que o grafeno, com seu potencial de absorção na região do infravermelho próximo e relativa grande área superficial, pode ser utilizado como portador de medicamentos, como no exemplo citado anteriormente com doxorrubicina, confirmando seu potencial para terapia fototérmica (SHENG et al., 2013). Nesse mesmo estudo, o grafeno foi reduzido e funcionalizado com polietilenoglicol e apresentou grande estabilidade e baixa toxicidade, podendo ser utilizado como um agente em terapias baseadas na fotohipertermia.

3. METODOLOGIA

3.1. SÍNTESE E OBTENÇÃO DO GRAFENO OXIDADO

A primeira etapa deste trabalho consistiu na obtenção do grafeno oxidado a partir do grafite expandido, doado pela empresa Nacional de Grafite (Brasil). Esse processo de síntese ocorre por via química e pode ser dividida em três etapas: pré-oxidação, oxidação e limpeza, descrito por Tung e colaboradores (TUNG et al., 2009). Todos os reagentes usados foram adquiridos da Sigma Aldrich[®], utilizando 150 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 1 g de pentóxido de fósforo (P_2O_5), 1 g de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) e 1 g de grafite. A mistura de todos os reagentes foi aquecida até 80°C, durante 4 h e 30 min. Em seguida, foi feita a filtragem do material obtido utilizando filtro qualitativo e o material retido foi deixado em estufa a 60 °C por 24 h.

Em seguida, 40 mL de H_2SO_4 foi adicionado ao grafite seco em um *erlenmeyer*, mantendo-se a temperatura próxima de 0 °C utilizando um banho de gelo. Foram adicionados 5 g de permanganato de potássio $KMnO_4$ vagorosamente para evitar o aumento da temperatura, não devendo ultrapassar os 10 °C durante a adição. Por fim, a solução foi mantida por 2 h em temperatura ambiente e o grafite em meio ácido apresentou coloração esverdeada.

Logo após, um total de 75 mL de água ultrapura foram adicionados no *erlenmeyer* ainda no banho de gelo. Uma vez que nesta etapa é crucial não deixar ultrapassar os 50 °C, a adição da água ocorreu em pequenas quantias e vagorosamente, pois a adição de água em ácido gera uma reação violenta, com grande liberação de calor. Após o fim da adição, a solução apresentou coloração marrom e mais 155 mL de água foram adicionados, seguido da adição de 5 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Finalmente, obteve-se grafeno na coloração dourada e que foi deixado decantar por um dia.

Após esse período, foi necessário realizar a limpeza do grafeno para retirar todas as possíveis impurezas presentes, como ácido e traços de metais. O sobrenadante foi retirado e adicionado 1 L de ácido clorídrico (HCl) 10% no precipitado, seguido da centrifugação desta solução três vezes a 10000 rpm durante 10 minutos. Após cada 10 minutos na centrífuga, o sobrenadante foi retirado e adicionado mais água até a neutralização da solução, a qual foi colocada em uma membrana de diálise de celulose com *cutoff* de 10 KDa durante uma semana, onde água foi trocada duas vezes ao dia durante todo esse período.

A concentração de $3,4 \text{ gL}^{-1}$ do grafeno oxidado foi obtida por gravimetria, pela adição de 10 mL de GO em um vidro de relógio, mantido a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa de secagem. O vidro foi pesado antes e depois de colocada a amostra, repetindo-se este método três vezes para uma melhor aferição da massa.

3.2. DIMINUIÇÃO DO TAMANHO DAS FOLHAS DE GRAFENO OXIDADO.

Foi utilizado o ultrassom de ponta DES 500 de frequência 20 KHz, 500 W (UNIQUE, Brasil) na potência de 40% por 35 horas, que foram divididas em períodos de 30 minutos intercalados com períodos em que o ultrassom estava desligado. A diminuição do tamanho das folhas de grafeno ocorre devido ao fenômeno de cavitação, o qual ocorre em quedas repentinas de pressão. Desta forma, a pressão, temperatura e velocidade do sistema resultam na liberação de ondas e micro-ondas altamente energéticas, que provocam danos na superfície do material, os quais contribuem para a quebra e diminuição das folhas de grafeno.

Nesta etapa, 12 ml da solução de GO na concentração de $3,4 \text{ gL}^{-1}$ foram diluídos até a concentração de 1 gL^{-1} e o volume final foi colocado em um tubo falcon resfriado em banho de gelo. A variação no tamanho das folhas foi registrada utilizando-se Espalhamento Dinâmico da luz (DLS), através do equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Inglaterra), considerando cinco contagens para cada amostra.

3.3. REDUÇÃO DO GRAFENO OXIDADO COM L-GLUTAMINA

Foram adicionados 0,01 M de L-glutamina obtida da Sigma Aldrich® em $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de GO e 500 μL de hidróxido de amônia em um volume final de 50 mL. A mistura foi mantida em agitação e aquecida até 90°C , a partir da qual a reação foi mantida por 8 horas. O monitoramento da redução do material foi feito utilizando a Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis) através do equipamento UV-Visible Spectrophotometers U-2900 (Hitachi). Uma vez que é característica do grafeno reduzido apresentar um pico de absorção em 270 nm, amostras foram retiradas e testadas ao longo das 8 horas de reação, até que a última exibiu tal resultado, confirmando a redução do GO. Por fim, o material foi deixado em diálise durante uma semana para que todas as impurezas fossem removidas.

3.4. REDUÇÃO DO GRAFENO OXIDADO COM α -LACTOSE

A redução do grafeno na presença de lactose partiu do mesmo GO utilizado na redução do grafeno com glutamina. Foram utilizados $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de GO com $0,01 \text{ M}$ de lactose e $400 \text{ }\mu\text{L}$ de hidróxido de amônia concentrado até um volume final de 40 mL . A dispersão foi mantida em agitação e aquecida até a temperatura de 90°C durante 8 horas. Novamente, após a redução do material, este foi deixado em diálise durante uma semana.

3.5. TERAPIA DE FOTOHIPERTERMIA

O grafeno quimicamente reduzido foi testado em radiação utilizando-se um laser no comprimento de onda de 808 nm e potência de $0,6 \text{ W/cm}^2$, o qual foi posicionado a cerca de 30 cm da amostra. Esta, por sua vez, consistiu em uma cubeta de quartzo transparente contendo 1 mL de RGO na concentração desejada. A fibra ótica inserida dentro da amostra captou sua temperatura e emitiu o sinal para o detector, que ligado a um computador, registrou sua temperatura a cada segundo. A Figura 3 representa a configuração dos equipamentos para todos os testes de fotohipertermia realizados neste trabalho, que visaram avaliar as propriedades fototérmicas do grafeno reduzido. Os testes foram realizados para comparar a resposta na região do infravermelho próximo do RGO/GLU, RGO/LAC e Grafeno Reduzido apenas com Hidróxido de Amônio (RGO/ NH_3), sem nenhuma molécula orgânica. Para os três tipos de grafeno reduzido, amostras nas concentrações de 5 mgL^{-1} , 10 mgL^{-1} e 15 mgL^{-1} foram preparadas em triplicada.

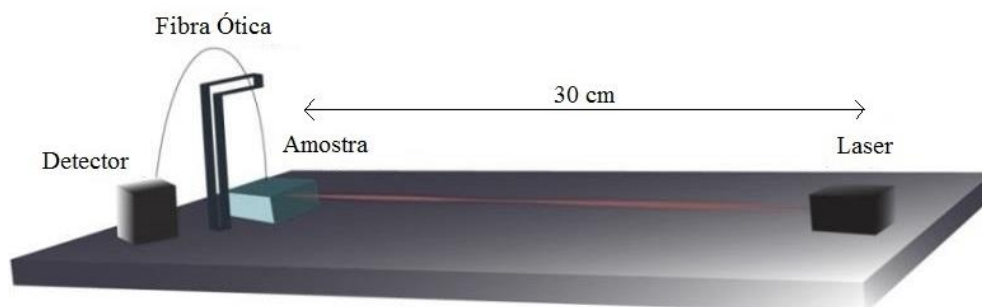


Figura 3 - Configuração dos equipamentos utilizados nos testes de fotohipertermia.

Como as amostras analisadas estavam à temperatura ambiente no momento em que foram testadas, poderiam apresentar diferentes temperaturas de acordo com o dia do

experimento, precisando ser normalizadas. Assim, durante o primeiro minuto de teste a temperatura inicial de cada amostra foi registrada com o laser desligado. Ao final do experimento, foi possível saber a temperatura máxima atingida por cada amostra de grafeno e, conseqüentemente, calcular-se o aumento da temperatura da respectiva amostra em relação a sua temperatura ambiente. Desta forma, foi possível relacionar o aquecimento com a concentração de grafeno. Além disso, foi calculada a porcentagem de aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente e a taxa de aquecimento para cada um dos materiais nas três concentrações, que permitiu analisar a resposta do grafeno no laser em função do tempo.

Esses resultados são apresentados como curvas de: aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente (AT); porcentagem do aumento da temperatura em relação à temperatura máxima atingida (AP); taxa de aquecimento e função do tempo do experimento (TA). Esses parâmetros foram calculados, respectivamente, pelas equações 1, 2 e 3 a seguir:

$$AT = T_{medida} - T_{inicial} \quad (1)$$

$$AP = 100\% \times \left(\frac{T_{máxima} - T_{medida}}{T_{máxima} - T_{inicial}} \right) \quad (2)$$

Onde:

- T_{medida} = temperatura da amostra medida em um dado momento, com o laser ligado;
- $T_{inicial}$ = temperatura inicial da amostra, medida com o laser desligado;
- $T_{máxima}$ = temperatura máxima atingida pela amostra durante o experimento.

$$TA_i = \frac{T_{(i+10)} - T_{(i-10)}}{t_{(i+10)} - t_{(i-10)}} \quad (3)$$

Onde:

- T_{i+10} = temperatura da amostra 10 segundo depois de um dado instante;
- T_{i-10} = temperatura da amostra 10 segundo antes de um dado instante;
- t_{i+10} = tempo referente à temperatura medida em T_{i+10} ;
- t_{i-10} = tempo referente à temperatura medida em T_{i-10} .

3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

A análise qualitativa da redução das amostras de grafeno foi acompanhada através da análise das bandas de absorção do nanomaterial por UV-vis, pois cada material apresenta um

determinado espectro de absorção no ultravioleta visível. Por sua vez, o grafeno reduzido apresenta um máximo de absorção em torno de 270 nm, característica que contribui para sua identificação. O equipamento utilizado para esta análise foi UV-Visible Spectrophotometers U-2900 (Hitachi) e cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

A estabilidade das dispersões foi analisada através da medição de seu Potencial-Zeta, equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Inglaterra). Esta propriedade física é exibida por qualquer material finamente particulado em uma dispersão e está relacionada ao potencial elétrico entre a superfície da partícula e o líquido onde ela está dispersa. Partículas que apresentam altas cargas, positiva ou negativa, tendem a se repelir, enquanto outras com pouco ou nenhuma carga se atraem, podendo ocorrer formação de aglomerados. Uma vez que o pH da dispersão influencia seu potencial-zeta, as amostras de RGO foram medidas em pH 7,0, considerando sua possível aplicação na terapia fototérmica contra células tumorais.

O DLS foi a técnica utilizada para determinar o tamanho das folhas de grafeno, ou seja, seu perfil de distribuição de suas dimensões, através do equipamento Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Inglaterra), com cinco contagens para cada amostra.

Espectros de Infravermelho médio (FTIR) foram realizados nas amostras a fim de determinar quais grupos funcionais estavam presentes através da análise das bandas de absorção presente. O aparelho utilizado nessa análise foi o Nicolet iS50 FT-IR Spectrometer (Thermo Scientific, EUA) e as amostras foram preparadas pelo método *casting*, que usa lâminas de silício não dopado.

Análise morfológica das amostras foi feita através da Microscopia de Força Atômica (AFM), utilizado o FlexAFM (Nanosurf, Suíça) com *isostage* e gaiola de Faraday. As amostras foram preparadas em mica, sendo o substrato imerso na solução diluída de grafeno, por 2 minutos, seguido de enxague com água ultrapura e seca em um dessecador a vácuo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. OBTENÇÃO DO GO E REDUÇÃO DO RGO/GLU E RGO/LAC

Ao final da síntese do GO, obteve-se um material estável na concentração de $3,4 \text{ gL}^{-1}$, mostrado na Figura 4(a).

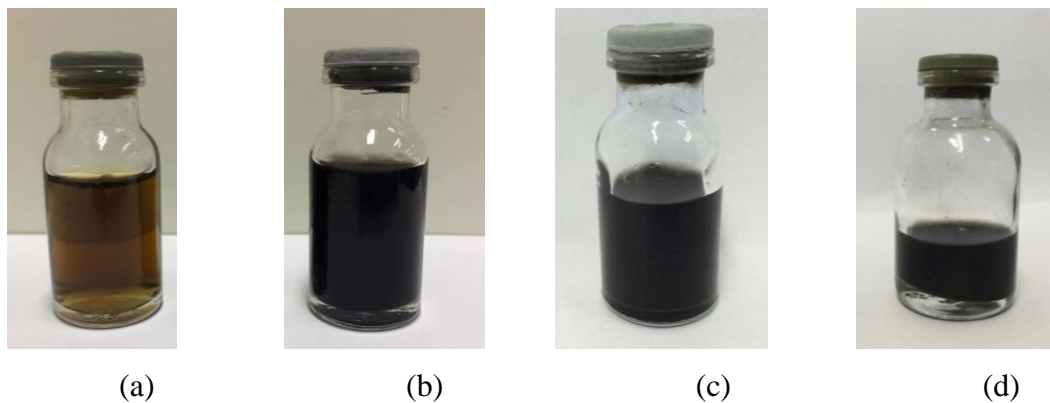


Figura 4 - Amostras dos materiais produzidos a) GO, b) RGO/GLU, c) RGO/LAC e d) Grafeno Reduzido apenas com hidróxido de amônia (RGO/NH₃).

Já a Figura 4 (b) e (c) representam o GO reduzido em meio contendo L-glutamina e α -Lactose, respectivamente. Ambos os materiais apresentaram concentração de $0,2 \text{ gL}^{-1}$ e concentrações diluídas são recomendadas devido a agregação que o material poderia apresentar em concentrações superiores. Além disso, o RGO/GLU e RGO/LAC apresentaram-se estáveis por pouco mais de um mês, pois após tal período de tempo, observou-se a formação de agregados e a decantação do grafeno.

A fim de possuir um grafeno quimicamente reduzido para controle dos resultados de fotohipertermia, uma amostra de GO foi reduzida apenas na presença de hidróxido de amônia. O material obtido também na concentração de $0,2 \text{ gL}^{-1}$ é mostrado na Figura 4(d).

4.2. ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA VISÍVEL

4.2.1. GRAFENO OXIDADO (GO) E GRAFENO REDUZIDO COM L-GLUTAMINA (RGO/GLU)

A Espectroscopia no Ultravioleta Visível (UV-vis) foi utilizada para analisar qualitativamente o grau de redução do GO através do deslocamento de sua banda de absorção. Os resultados para o GO e RGO/GLU são mostrados na Figura 5.

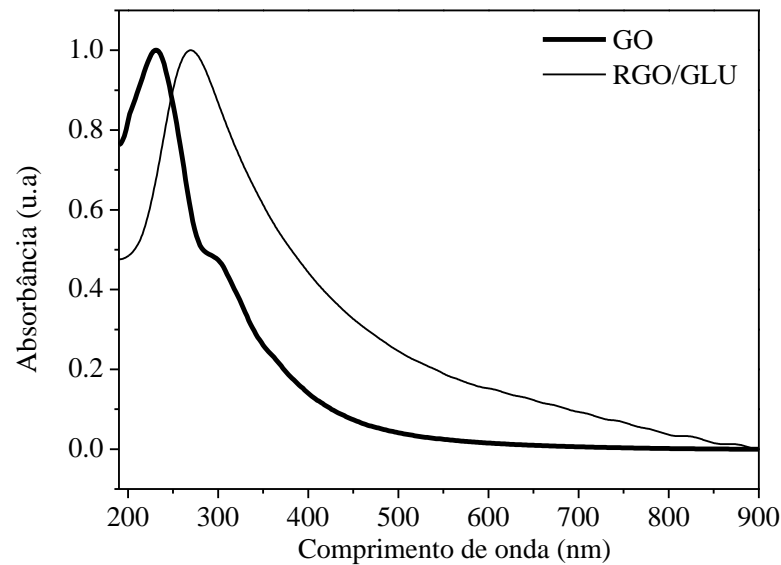


Figura 5 - Espectro UV-vis obtido para o GO e RGO/GLU.

No espectro do GO destaca-se um pico de absorção em torno do comprimento de onda de 230 nm correspondente à presença de ligações C=C fora do plano cristalino, devido à presença de ligações sp^3 que causa uma distorção na rede. Já em torno de 300 nm, observa-se um leve aumento na absorbância do material, evidência da presença de duplas ligações entre átomos de carbono e oxigênio, confirmando que a amostra sofreu o processo de oxidação (HUANG et al., 2011; ZHOU et al., 2009). Já no espectro UV-vis do RGO/GLU, nota-se um pico de absorção em torno do comprimento de 270 nm. Isto ocorre pela presença de ligações C=C ao longo da rede cristalina. Já a pequena absorção em torno de 300 nm observada no espectro do GO não é observada nitidamente no espectro do GQR, pois pode estar levemente sobreposta à banda em 270 nm e, principalmente, devido ao fato de que há poucas duplas ligações entre átomos de carbono e oxigênio no material em virtude do processo de redução da amostra (ZHU et al., 2010). Esse resultado indica, portanto, a real redução do grafeno oxidado, originando o RGO.

4.2.2. GRAFENO REDUZIDO COM α -LACTOSE (RGO/LAC)

Através do UV-vis, o grau de redução do grafeno com α -lactose foi analisado pela espectroscopia UV-vis, mostrado na Figura 6.

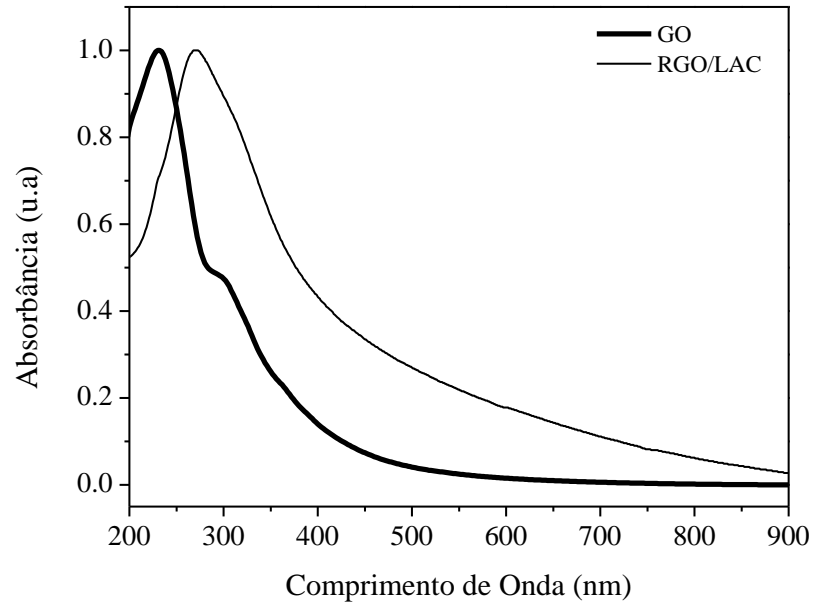


Figura 6 - Espectro UV-vis obtido para o GO e RGO/LAC.

Novamente, nota-se que o pico de absorção ocorre em 270 nm, valor relacionado à presença de ligações C=C na rede cristalina do material. A pequena absorção em torno de 300 nm observada para o GO aparece de uma maneira suave no espectro do RGO/LAC. Isto ocorre pelo menor número de ligações duplas entre os átomos de carbono e oxigênio, comprovando a perda da maior parte dos grupos funcionais anteriormente ligados aos átomos de carbono fora do plano cristalino e, conseqüentemente, a redução da amostra.

4.3. ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ E POTENCIAL ZETA

4.3.1. GRAFENO OXIDADO (GO)

Para determinar o tamanho das folhas de grafeno esfoliado foi utilizada a técnica de DLS. A Figura 7(a) mostra a distribuição de tamanhos do GO após sua síntese, apresentando duas principais modas de seu tamanho, em torno de 80 nm e 108 nm. Já a Figura 7(b) representa o material depois das 35 horas no ultrassom de ponta, como descrito anteriormente no item 3.2. Pode-se notar o tamanho já reduzido, sendo observadas também duas modas de

seus tamanhos (em torno de 14 nm e 70 nm). Esta redução é muito significativa, pois afeta positivamente a etapa da redução do GO e conseqüentemente, quanto menor o material obtido, mais facilmente será internalizado pelas células.

As barras de erro presentes na Figura 7 representam o desvio padrão das medidas.

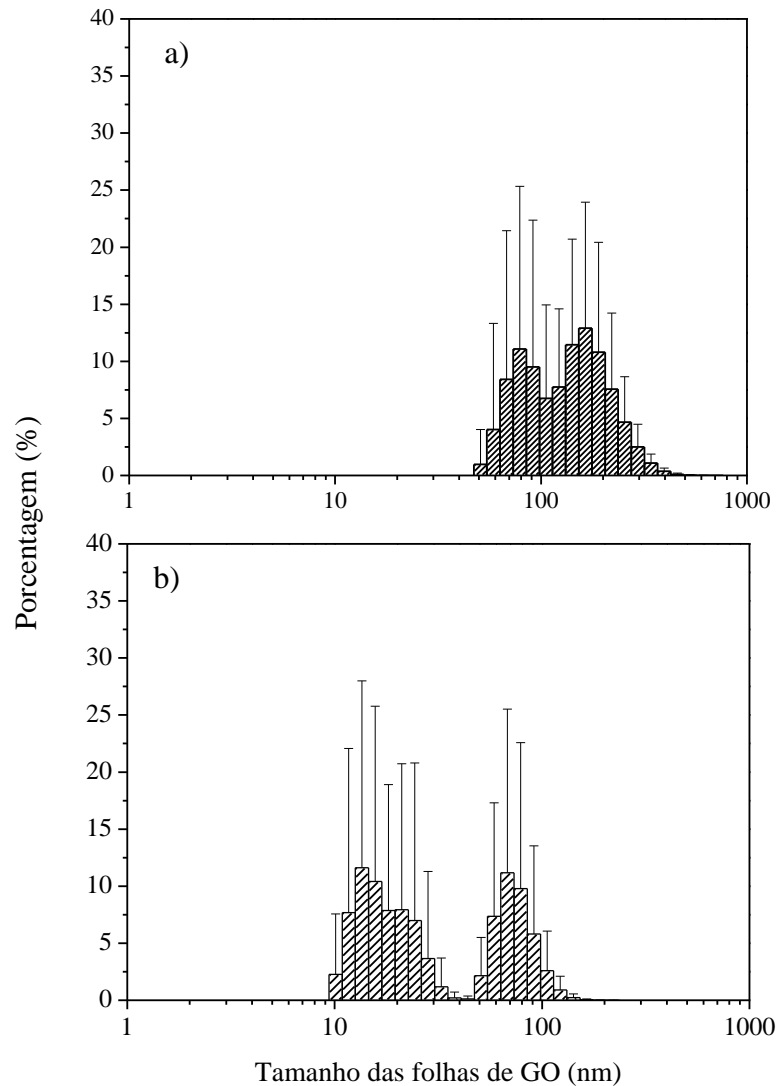


Figura 7 - Distribuição do tamanho das folhas do Grafeno Oxidado (a) após síntese (b) após 35 horas no ultrassom de ponta.

Entretanto, nota-se que o desvio padrão das medidas é maior do que seu valor médio. Possivelmente, isto ocorreu pelo fato de que o aparelho usa a relação de Einstein-Stokes durante suas medidas. Esta relação considera as partículas da dispersão analisada como esféricas, não sendo este o formato das folhas de grafeno. Além disso, algumas das folhas podem ter formado aglomerados, que foram considerados como uma única partícula de maior

tamanho durante a análise. Em suma, o DLS se aproxima de uma análise mais semi-qualitativa do que quantitativa.

Em relação ao Potencial Zeta para o GO, os resultados são mostrados na Figura 8 e as barras de erro representam o desvio padrão das medidas.

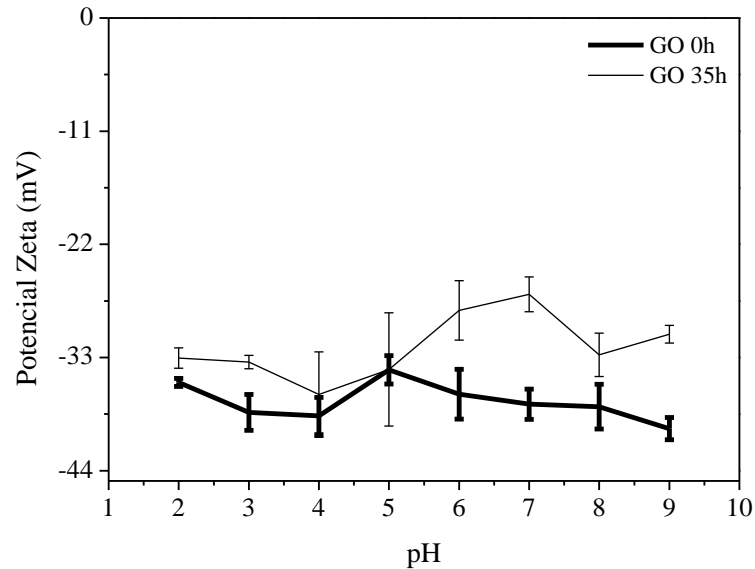


Figura 8 - Potencial Zeta para do grafeno oxidado após sua síntese (GO 0h) e após 35 horas no ultrassom de ponta.

O potencial zeta é um fator importante ao caracterizar dispersões e fornece uma medida da carga superficial associada às folhas de grafeno oxidado. Valores de potencial zeta mais positivos que +30 mV e mais negativos que -30 mV são encontrados em dispersões estáveis devido à repulsão eletrostática (KONKENA; VASUDEVAN, 2012). Para o grafeno oxidado, os valores são negativos devido à presença de grupos funcionais eletronegativos, como ácidos carboxílicos. Assim, a amostra de GO que não sofreu ação do ultrasonicador formou uma dispersão estável nos valores de pH de 2 até 9, visto que todos os valores de potencial zeta estão abaixo do valor de -30 mV. Para a mostra de GO que sofreu sonicação por 35 horas, observou-se uma ligeira diminuição da sua distribuição de cargas e estes resultados podem ser explicado pela desoxigenação do nanomaterial ao ser submetido por longos períodos de tempo no ultrassom. Nos valores de pH 6 e 7, o valor do potencial zeta foi de -28.42 mV e -26.86 mV, respectivamente.

4.3.2. GRAFENO REDUZIDO COM L-GLUTAMINA (RGO/GLU)

O GO apresenta grande estabilidade em soluções aquosas, devido à presença de grupos funcionais ligado às folhas deste nanomaterial, como $-C-O-C$, $-COOH$, e $-OH$. Já o grafeno reduzido perde grande quantidade desses grupos funcionais durante o processo de redução, o que afeta sua estabilidade e contribui tanto para a formação de agregados como a diminuição das características bidimensionais deste material. A medição do tamanho das folhas de RGO/GLU foi feita ao longo de 10 dias, como mostra a Figura 9.

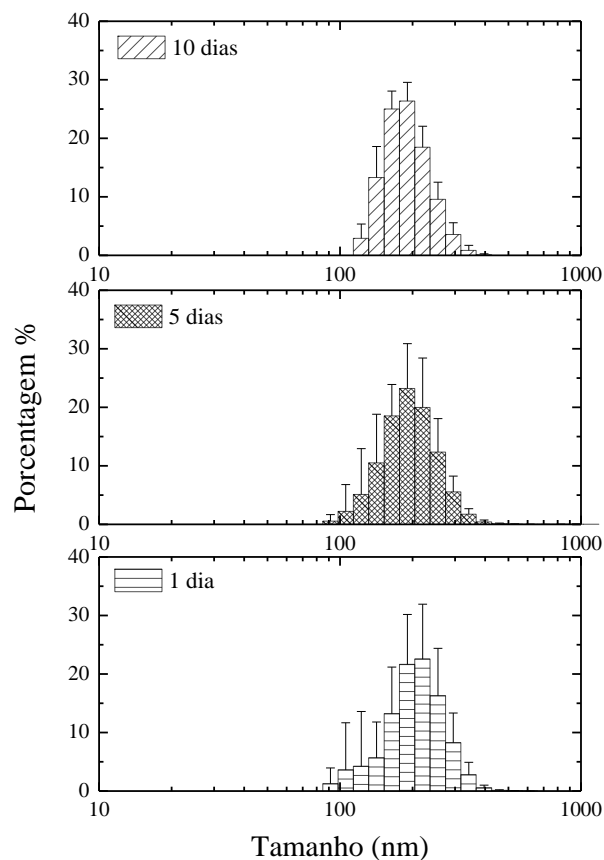


Figura 9 - Distribuição do tamanho das folhas de RGO/GLU.

Nos três cenários analisados não houve grandes diferenças e a distribuição do tamanho das partículas ocorreu por volta dos 200 nm. Isto mostra que não houve formação de agregados durante esse período, evidenciando a grande estabilidade do material produzido.

Outra análise que deve ser feita é comparar a distribuição de tamanho do GO utilizado na redução com a distribuição de tamanho do RGO/GLU. A Figura 7(b) mostra que o tamanho médio das partículas de GO após 35 horas no ultrassom é de 70 nm, o que equivale a aproximadamente apenas 30% do tamanho do material reduzido. A diferença entre o

tamanhos das folhas de grafeno oxidado e reduzido pode ser explicada pela perda dos grupos funcionais do GO durante o processo de redução e o consequente aumento de ligações C=C na rede cristalina, ocasionando a formação de agregados, uma vez que o GQR apresenta estabilidade em água inferior quando comparado ao GO.

Já o Potencial Zeta das amostras de RGO/GLU em pH 7,0 foi medido na temperatura de 25°C a cada 5 dias, afim de verificar se as folhas de grafeno tendem a se agregar com o tempo. A Figura 10 mostra a média e o desvio padrão das cinco medidas feitas em cada um dos dias em que foi realizado o acompanhamento da estabilidade do material.

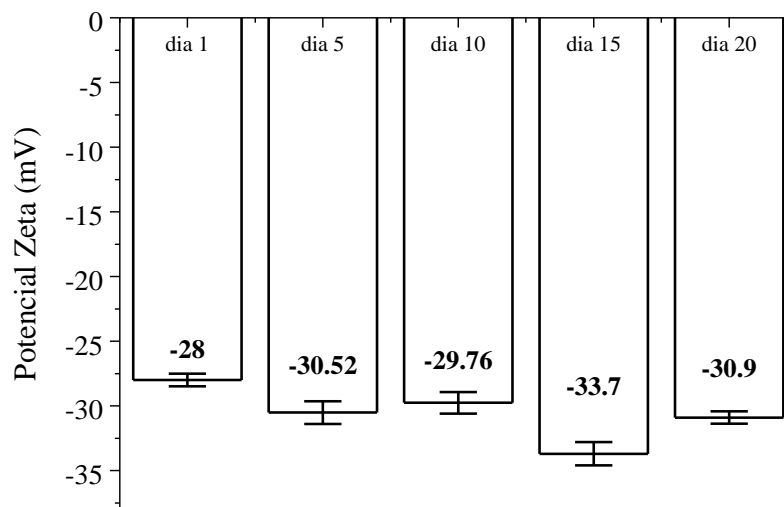


Figura 10 - Acompanhamento do Potencial Zeta para o RGO/GLU durante 20 dias.

De acordo com o resultado, o valor médio do potencial zeta não apresenta variação significativa com o passar dos dias, sendo de -5,7mV a diferença entre os valores extremos. Em relação à estabilidade do nanomaterial, analisando-se a média das 25 medidas de Potencial Zeta encontra-se o valor de -30,6 mV, o que mostra a relativa estabilidade do RGO/GLU em pH 7,0 durante o período analisado.

4.3.3. GRAFENO REDUZIDO COM α -LACTOSE (RGO/LAC)

O grafeno reduzido quimicamente junto às moléculas de α -Lactose foi caracterizado pelas mesmas técnicas que as utilizadas para o GO e RGO/GLU. Em relação à análise por DLS, o resultado é mostrado na Figura 11 e as barras de erro representam o desvio padrão das medidas.

É possível notar duas modas de tamanhos: a primeira em torno de 55 nm e a segunda em 110 nm. Esses valores mostram que o RGO/LAC apresentou tamanho médio menor que o RGO/GLU, ou seja, houve uma menor agregação das folhas do grafeno, tornando-se uma alternativa mais interessante para ensaios e testes que necessitem de um material com tamanho mais reduzido. Os elevados valores de desvios padrões podem ser explicados como feito para a Figura 7.

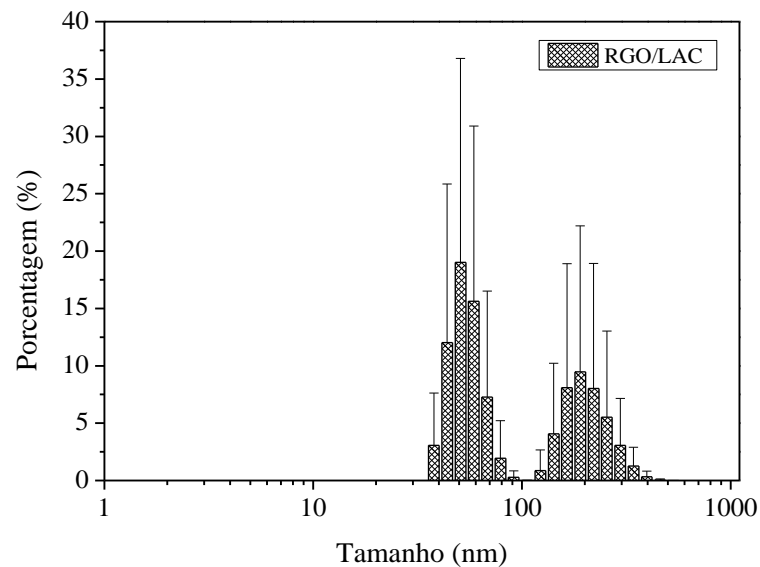


Figura 11 - Distribuição do tamanho das folhas de RGO/LAC.

Em seguida, foi realizada a caracterização do Potencial Zeta para o RGO/LAC, através de cinco medições feitas em pH 7,0 e temperatura de 25°C, que geraram uma média e erro das medidas. Os resultados podem ser verificados pela Tabela 1.

Tabela 1- Potencial Zeta para o RGO/LAC.

Grafeno Quimicamente Reduzido com Lactose	
Potencial Zeta [mV]	
Medida 1	-22.9 ± 0.1
Medida 2	-23.7 ± 0.1
Medida 3	-24.6 ± 0.1
Medida 4	-26.9 ± 0.1
Medida 5	-32.5 ± 0.1
Média	-26.1 ± 0.1

Esses valores representam a carga superficial das folhas de grafeno reduzido, os quais estão associados à estabilidade da dispersão. Além de o material mostrar-se bem disperso, ao

se comparar esses resultados com aqueles obtidos para o GO, percebe-se que o RGO/LAC apresentou valor médio menos negativo que o grafeno oxidado, o que se era esperado, uma vez que o GO é naturalmente mais estável por apresentar maior número de grupos funcionais ligados aos átomos de carbono em cada uma das folhas de grafeno.

4.4. ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Imagens de GO antes e depois do ultrassom de ponta são mostradas na Figura 12.

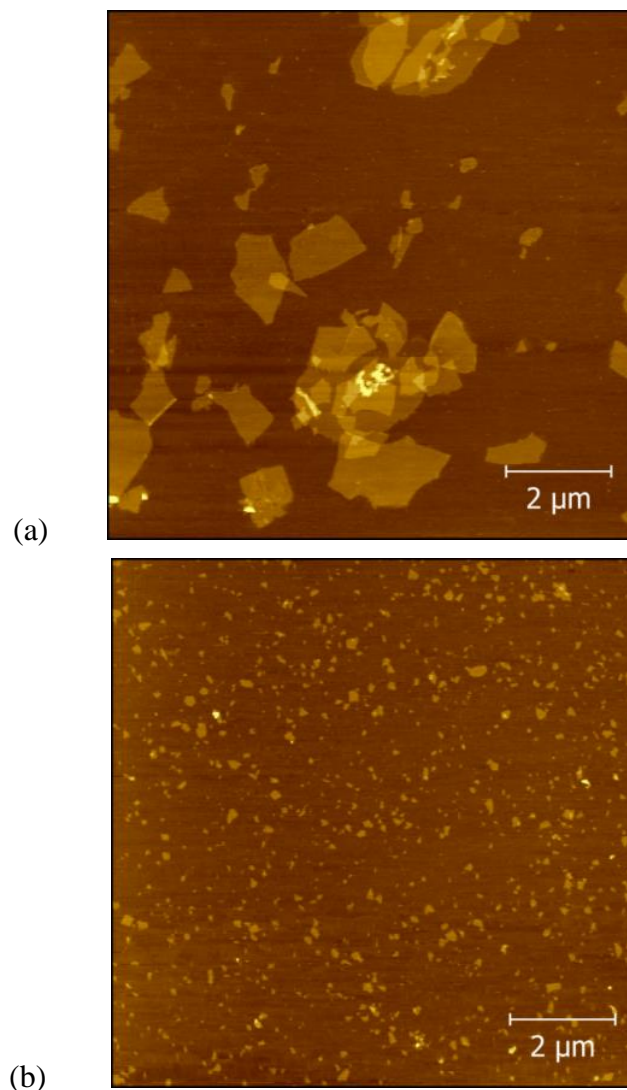


Figura 12- Imagens obtidas pelo Microscópio de Força Atômica. a) GO obtido após síntese. b) GO após as 35 horas no ultrassom de ponta.

Uma redução significativa no tamanho das folhas de grafeno pode ser observada, fato anteriormente confirmado pela análise por DLS dessa amostra.

Análise por AFM também foi feita para o RGO/GLU produzido, como mostra Figura 13(a).

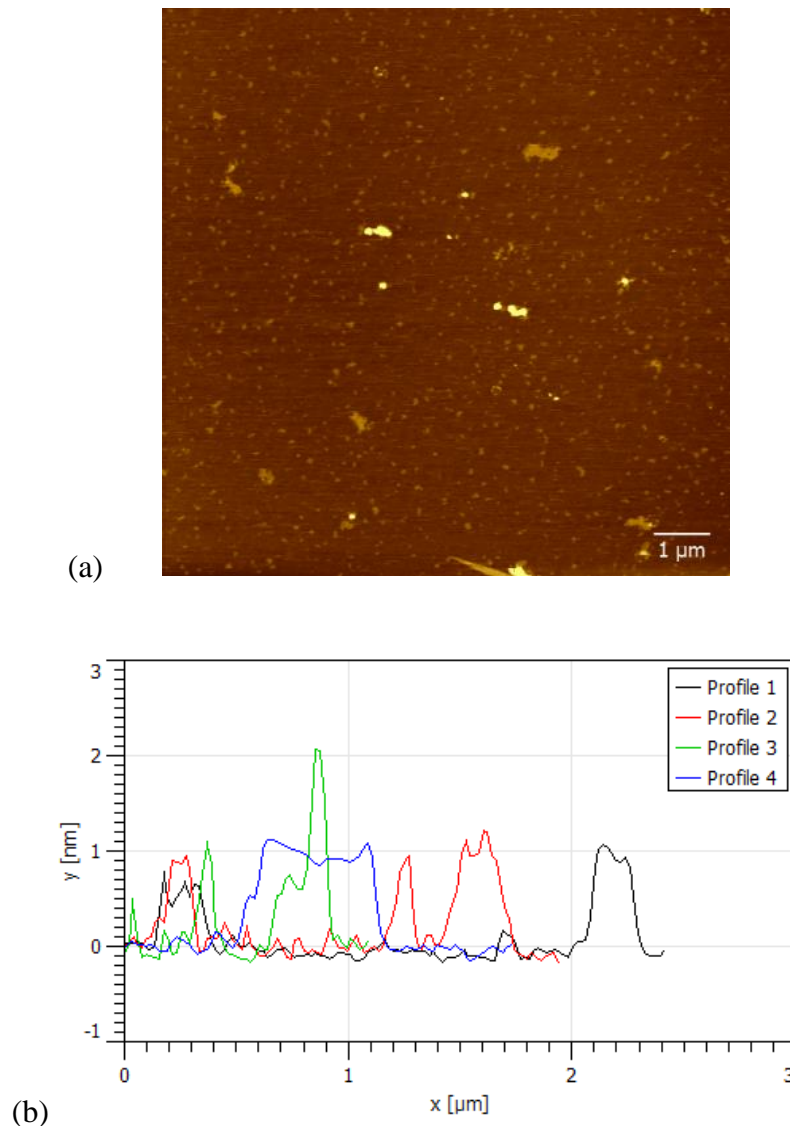


Figura 13 - a) Imagens obtidas pelo Microscópio de Força Atômica para o RGO/GLU e b) Perfil de rugosidade de quatro regiões da amostra na qual o eixo y mostra a espessura do material.

As imagens obtidas confirmam a distribuição de tamanhos de partículas encontrada pela análise por DLS, uma vez que a maioria das folhas de grafeno apresenta tamanho compatível com os medidos por DLS. Além disso, o perfil de rugosidade medido em quatro diferentes regiões da Figura 13(b) mostra que as folhas de grafeno apresentam espessura entre 1 a 2 nm, ou seja, elas não estão sobrepostas ou empilhadas, o que mais uma vez evidencia o baixo volume de agregados presentes no material.

4.5. ESPECTRO DE INFRAVERMELHO MÉDIO

4.5.1. GRAFENO OXIDADO (GO) E GRAFENO REDUZIDO COM L-GLUTAMINA (RGO/GLU)

A determinação dos grupos funcionais presentes nas amostras de grafeno foi feita usando FTIR como mostra o espectro da Figura 14.

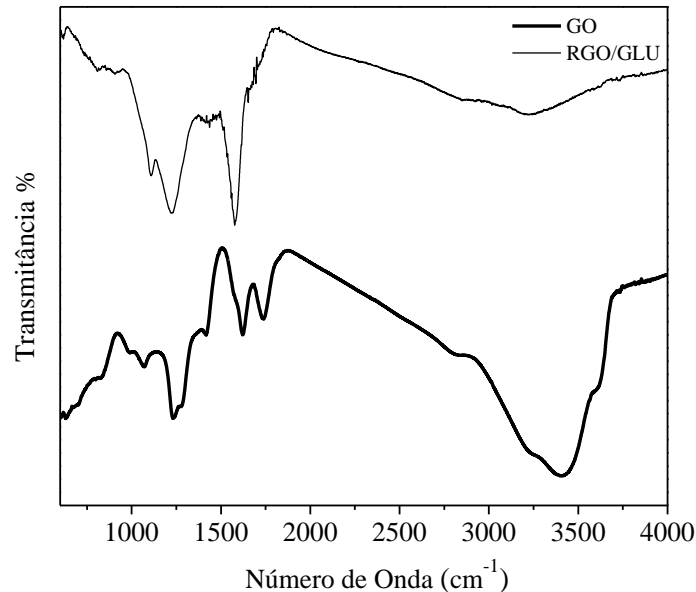


Figura 14 - Espectro de FTIR para o GO e RGO/GLU.

Observa-se a existência de uma banda de grande intensidade em torno dos 3400 cm^{-1} , a qual representa a existência de grupos hidroxilas ($-\text{OH}$); já a banda em torno do valor de 1738 cm^{-1} corresponde ao modo de estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) dos grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$). Em 1622 cm^{-1} existe uma banda de intensidade média, a qual está relacionada com a presença de grupos aromáticos, ou seja, ela representa a ligação dupla entre átomos de carbono ($\text{C}=\text{C}$). Já a existência de uma banda em 1416 cm^{-1} está relacionada com a presença de grupos que contenham a ligação simples entre átomos de carbono e de oxigênio ($\text{O}-\text{H}$), como os grupos éter e éster (ACIK et al., 2010). O dublete 1277 e 1233 cm^{-1} e a banda em 828 cm^{-1} correspondem ao grupo $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$. Já em 1070 cm^{-1} tem-se o estiramento do grupo $\text{C}-\text{O}$. A presença destes grupos explica a grande estabilidade deste material em soluções aquosas.

Em relação ao espectro obtido para o RGO/GLU, observa-se a existência de uma banda de baixa intensidade em torno dos 3400 cm^{-1} , a qual evidencia que ainda existe, mesmo que em menor quantidade, alguns grupos hidroxilas ($-\text{OH}$); já em torno de 1600 cm^{-1} existe

uma banda de alta intensidade, a qual está relacionada com o maior número de ligações duplas entre átomos de carbono (C=C). O dublete 1108 e 1230 cm^{-1} corresponde ao grupo –C–O–C– o qual é extremamente difícil de ser removido devido à forte ligação simples entre os átomos de Carbono e Oxigênio. Por esta técnica não foi possível verificar a presença dos grupos funcionais da GLU, necessitando o uso de técnicas mais precisas.

4.5.2. GRAFENO REDUZIDO COM α -LACTOSE

A análise por FTIR permitiu determinar os grupos funcionais presentes no RGO/LAC produzido, e o espectro obtido é mostrado na Figura 15.

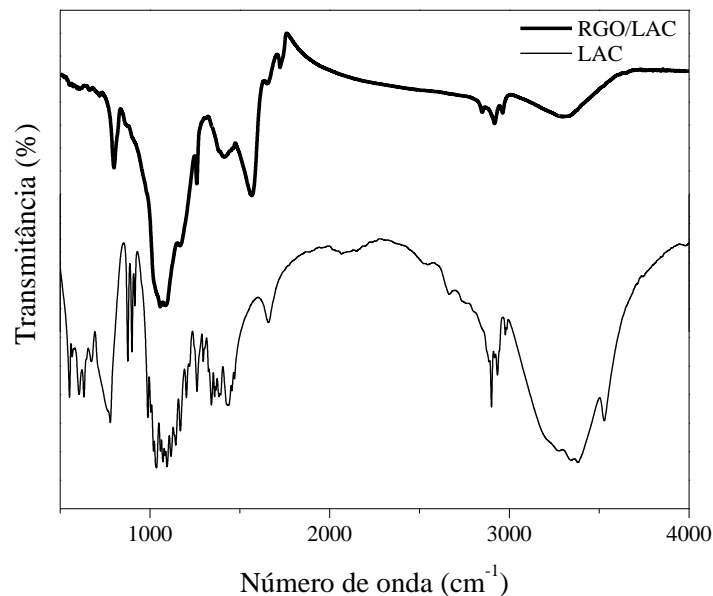


Figura 15 - Espectro de FT-IR para o RGO/LAC e α -lactose.

Cada banda pode ser relacionada a um grupo funcional específico, assim, como explicado para o RGO/GLU, a banda de pequena intensidade perto dos 3400 cm^{-1} mostra a existência de uma baixíssima quantidade de grupos hidroxilas (-OH), enquanto a banda presente em torno de 1600 cm^{-1} representa grande quantidade de ligações C=C. Uma vez que o espectro da α -Lactose também está representado na Figura 15, nota-se a existência de bandas equivalentes tanto neste como no espectro do RGO/LAC. Assim, as bandas em torno de 1100 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} evidenciam a existência da molécula de lactose ligada ao grafeno obtido.

4.6. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FOTOTÉRMICAS DO GRAFENO

4.6.1. RGO/GLU EM ÁGUA

As Figuras 16 (a), (b) e (c) mostram o aumento de temperatura das amostras de RGO/GLU nas concentrações de 5 mgL^{-1} , 10 mgL^{-1} e 15 mgL^{-1} em função do tempo. Já a Figura 16 (d), (e) e (f) representam o aumento percentual e a taxa de aquecimento, em minutos, das mesmas concentrações desse material.

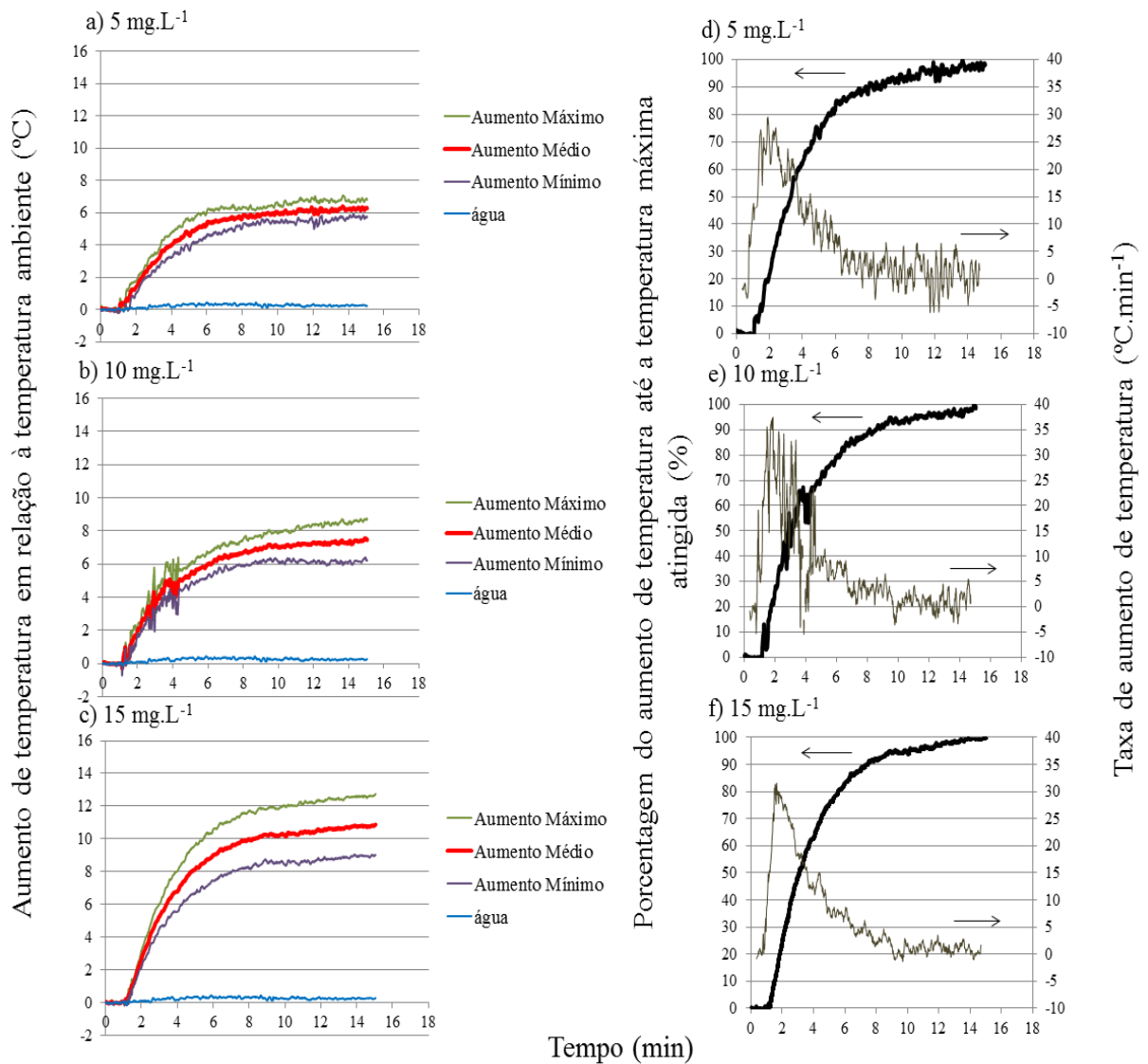


Figura 16 - Análises para o RGO/GLU. Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente para amostras (a) 5 mg.L^{-1} (b) 10 mg.L^{-1} (c) 15 mg.L^{-1} . Taxa de aquecimento e Porcentagem de aumento de temperatura para amostras (d) 5 mg.L^{-1} (e) 10 mg.L^{-1} (f) 15 mg.L^{-1} .

4.6.2. RGO/LAC EM ÁGUA

Para as amostras de RGO/LAC, a Figura 17 (a), (b) e (c) também mostram seu aumento nas concentrações de 5 mg.L^{-1} , 10 mg.L^{-1} e 15 mg.L^{-1} em função do tempo. Da mesma forma, a Figura 17 (d), (e) e (f) representam o aumento percentual e a taxa de aquecimento, em minutos, das mesmas concentrações desse material.

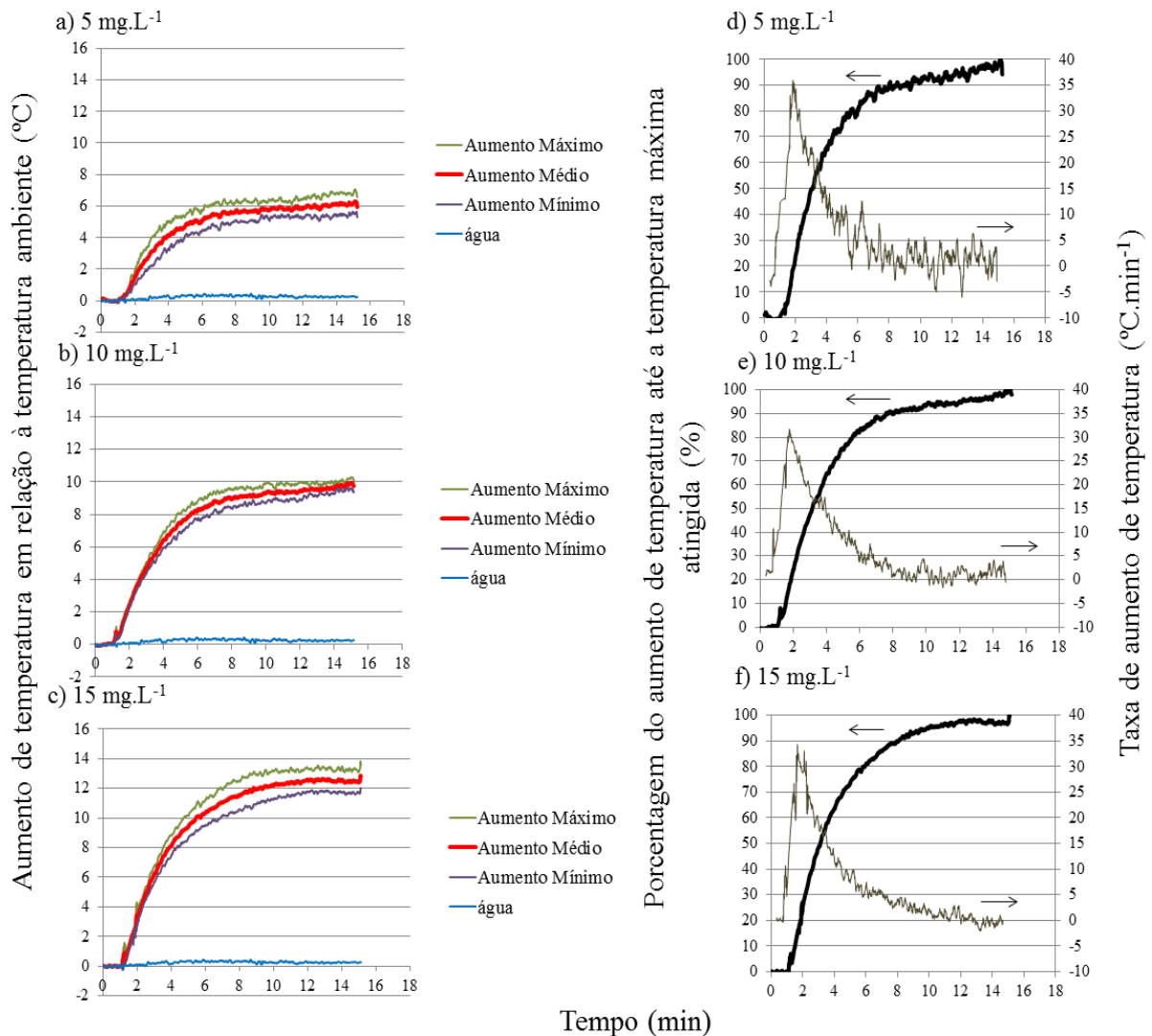


Figura 17 - Análises para o RGO/LAC. Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente para amostras (a) 5 mg.L^{-1} (b) 10 mg.L^{-1} (c) 15 mg.L^{-1} . Taxa de aquecimento e Porcentagem de aumento de temperatura para amostras (d) 5 mg.L^{-1} (e) 10 mg.L^{-1} (f) 15 mg.L^{-1} .

4.6.3. RGO/NH₃ EM ÁGUA

A Figura 18 (a), (b) e (c), por sua vez, representam o aumento de temperatura das amostras de RGO/ NH₃ nas concentrações de 5 mgL⁻¹, 10 mgL⁻¹ e 15 mgL⁻¹ em função do tempo, enquanto a Figura 18 (d), (e) e (f) representam o aumento percentual e a taxa de aquecimento, em minutos, para esse mesmo material nas concentrações mencionadas.

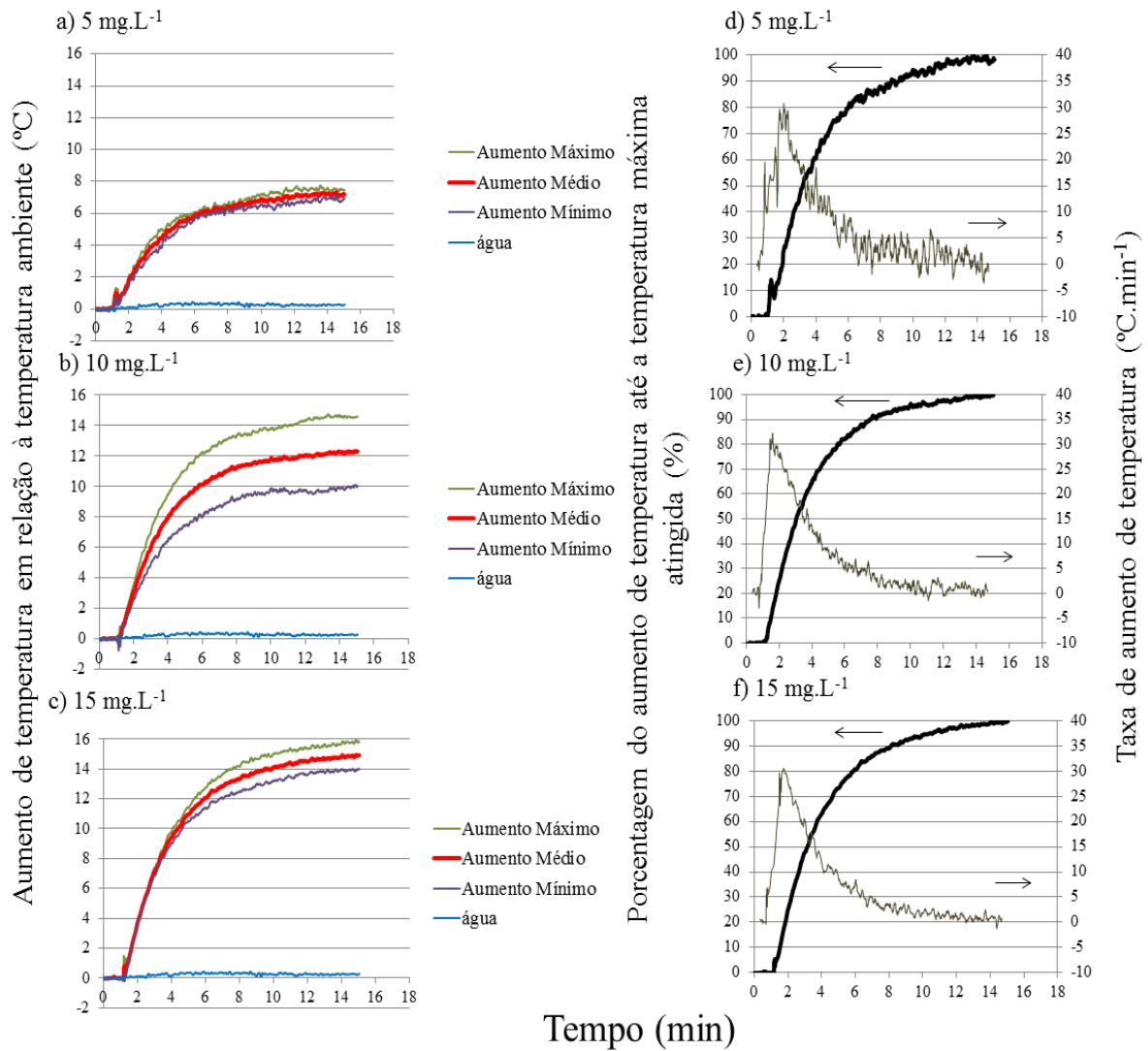


Figura 18 - Análises para o RGO/NH₃. Aumento de temperatura em relação à temperatura ambiente para amostras (a) 5mg.L⁻¹ (b) 10 mg.L⁻¹ (c) 15mg.L⁻¹. Taxa de aquecimento e Porcentagem de aumento de temperatura para amostras (d) 5mg.L⁻¹ (e) 10 mg.L⁻¹ (f) 15mg.L⁻¹.

4.6.4. COMPARAÇÃO ENTRE O RGO/GLU, RGO/LAC E RGO/NH₃

Para os gráficos (a), (b) e (c) das Figuras 16, 17 e 18, o patamar inicial em zero corresponde ao período que a temperatura da amostra foi registrada com o laser desligado. Já a curva em torno de 0°C corresponde à análise feita utilizando-se apenas a água na cubeta de quartzo exposta ao laser. Este resultado comprova que tanto a água como a cubeta não respondem na região do infravermelho próximo, ou seja, não interferiram nos resultados para o grafeno reduzido, sendo este o único responsável por todo o aumento de temperatura nas amostras analisadas. Além disso, a análise dessas mesmas curvas mostra que quanto maior a concentração de grafeno, maior o aumento de temperatura da amostra, sendo este comportamento observado para os três tipos de GQR.

Para analisar o efeito do grafeno reduzido na velocidade de aquecimento do sistema, a sua taxa de aumento de temperatura, em °C.min⁻¹, foi calculada com base no aumento percentual de temperatura de cada amostra em relação à temperatura ambiente. As curvas (d), (e) e (f) das Figuras 16, 17 e 18 mostram esses resultados para o RGO/GLU, RGO/LAC e RGO/NH₃, respectivamente. O pico existente nas curvas de taxa (eixo y da direita) corresponde ao exato momento em que o laser foi ligado e o grafeno iniciou seu aquecimento.

Ao se analisar tais curvas, percebe-se que as amostras dos três tipos de GQR nas três concentrações testadas apresentaram comportamentos semelhantes. Elas apresentaram taxas de aquecimento entre 30 e 35 °C.min⁻¹ e o momento em que chegaram próximo à zero representa o mesmo tempo que levaram para ter sua temperatura estabilizada durante o experimento, ou seja, não aqueceram mais, mesmo quando ainda expostas ao laser. A Figura 19(a) mostra esses resultados.

As análises mostraram que o meio com grafeno teve sua temperatura aumentada conforme maior é sua concentração quando exposto ao laser. Por outro lado, a análise da taxa de aquecimento mostrou que esta é praticamente independente da concentração de grafeno, o que permite maior controle da temperatura do sistema, algo ideal para a aplicação em fototerapia. Conseqüentemente, a definição da concentração de grafeno para aplicação em terapias fototérmicas pode ser feita através do tempo disponível para a análise. Ou seja, para um mesmo aumento de temperatura, se o estudo requerer um menor tempo de exposição, será necessário usar uma maior concentração de GQR. A Figura 19(b) mostra o tempo que foi necessário para que cada uma das amostras atingissem cerca de 6°C acima da temperatura ambiente.

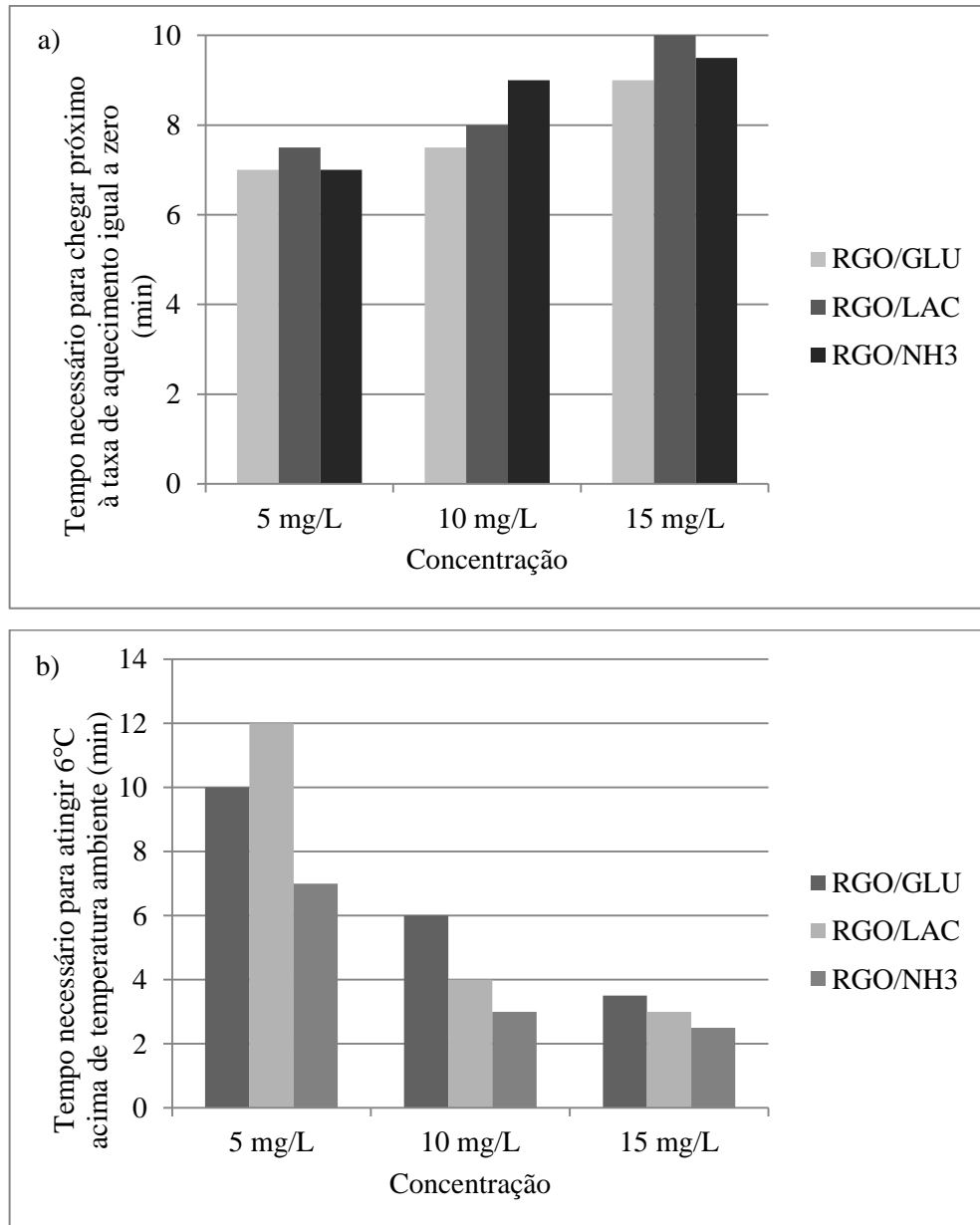


Figura 19 - a) Tempo necessário para equilíbrio da temperatura das amostras.
b) Tempo necessário para aumentar em 6°C a temperatura das amostras.

Se cada uma das concentrações for analisada separadamente, nota-se certa variação entre as amostras de grafeno reduzido. Este fato pode ser explicado por desvios experimentais inerentes ao aparelho e à técnica de medição. No entanto, os resultados mostraram que é possível obter um aumento de 6°C para qualquer uma das amostras, em qualquer concentração, podendo ser feita a escolha de acordo com o tempo necessário ou requerido na aplicação. Para a técnica de fotohipertermia estudada neste trabalho, um aumento de 6°C elevaria a temperatura do corpo humano de 37°C para 43°C, que já seria suficiente para iniciar a desnaturação das proteínas e afetaria a dinâmica celular da região atingida pelo calor.

Temperaturas maiores que essas podem ocasionar a inativação celular de longa duração e, conseqüentemente, danos irreversíveis para o corpo como a desnaturação do DNA e severa desnaturação das proteínas (JAQUE et al., 2014), mostrando a relevância do controle de temperatura.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter um grafite oxidado (GO) com folhas de pequeno tamanho e que se manteve estável tanto em meios ácidos, neutros e alcalinos. Este fato foi verificado analisando o resultado de todas as técnicas de caracterização utilizadas para conhecer e entender melhor as características do grafeno oxidado. Além disso, os dois tipos de grafeno reduzidos também apresentaram folhas de pequeno tamanho e se mostraram estáveis por pouco mais de um mês. Sabe-se que durante o processo de redução, o grafeno perde parte dos seus grupos funcionais, o que o faz naturalmente mais instável e contribui para a formação de agregados. No entanto, a utilização das moléculas de glutamina e lactose durante a reação de redução pode ter contribuído para a obtenção de um produto mais estável que o usual.

As suspensões de grafeno reduzido com glutamina (RGO/GLU) e de grafeno reduzido com lactose (RGO/LAC) se mostraram estáveis em pH neutro, fato importante pois ao idealizar uma situação na qual o grafeno seria utilizado para o tratamento de tumores sólidos, para atingir seu alvo este nanomaterial circularia pelas veias e artérias através do sangue, que também possui pH 7,0. Entretanto, seriam necessárias mais análises e estudos sobre a hipótese de que as folhas de grafeno estabilizadas com moléculas orgânicas seriam mais facilmente internalizadas nas células.

O grafeno quimicamente reduzido (GQR) obtido tem grande potencial para aplicações em terapias de fototerapia, uma vez que todos os resultados mostraram um considerável aumento de temperatura, que ocorreu de forma diretamente proporcional a sua concentração. Já a taxa de aquecimento calculada para as amostras se mostrou praticamente independente da concentração de grafeno, permitindo maior controle sobre a temperatura do sistema analisado.

O estudo contribuiu para o conhecimento que se tem em relação ao grafeno e suas possíveis aplicações na nanomedicina. No entanto, mesmo existindo na literatura trabalhos relacionados à toxicidade do grafeno e a sua eficiência em terapias contra células tumorais, as informações existentes ainda não são suficientes para conclusão da eficiência deste nanomaterial, sendo necessário mais estudos relacionados a sua toxicidade e danos a médio e longo prazo para o corpo humano, bem como formas de garantir o aumento de temperatura localizado.

REFERÊNCIAS

ACIK, M. et al. Unusual infrared-absorption mechanism in thermally reduced graphene oxide. **Nature Materials**, v. 9, n. 10, p. 840-845, Oct 2010.

AKHAVAN, O. et al. The use of a glucose-reduced graphene oxide suspension for photothermal cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 27, p. 13773-13781, 2012 2012.

CHENG, L. et al. Organic Stealth Nanoparticles for Highly Effective in Vivo Near-Infrared Photothermal Therapy of Cancer. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 5605-5613, Jun 2012.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133-149, 2008.

FENG, L.; LIU, Z. Graphene in biomedicine: opportunities and challenges. **Nanomedicine**, v. 6, n. 2, p. 317-324, Feb 2011.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 161-171, Mar 2005.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, n. 3, p. 183-191, Mar 2007.

HILDEBRANDT, B. et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 43, n. 1, p. 33-56, Jul 2002.

HUANG, X. et al. Graphene-Based Materials: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications. **Small**, v. 7, n. 14, p. 1876-1902, Jul 18 2011.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958 1958.

JAQUE, D. et al. Nanoparticles for photothermal therapies. **Nanoscale**, v. 6, n. 16, p. 9494-9530, Aug 21 2014.

JASTRZEBSKA, A. M.; KURTYCZ, P.; OLSZYNA, A. R. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 12, Dec 2012.

KONG, G.; BRAUN, R. D.; DEWHIRST, M. W. Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: Effect of particle size. **Cancer Research**, v. 60, n. 16, p. 4440-4445, Aug 15 2000.

KONKENA, B.; VASUDEVAN, S. Understanding Aqueous Dispersibility of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide through pK(a) Measurements. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, n. 7, p. 867-872, Apr 5 2012.

LEPOCK, J. R. et al. Hyperthermia-induced inhibition of respiration and mitochondrial protein denaturation in chl cells. **International Journal of Hyperthermia**, v. 3, n. 2, p. 123-132, Mar-Apr 1987.

LIU, Z. et al. Carbon materials for drug delivery & cancer therapy. **Materials Today**, v. 14, n. 7-8, p. 316-323, Jul-Aug 2011.

MARKOVIC, Z. M. et al. In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 1121-1129, Feb 2011.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Nanomedicine: current status and future prospects. **Faseb Journal**, v. 19, n. 3, p. 311-330, Mar 2005.

PEI, S.; CHENG, H.-M. The reduction of graphene oxide. **Carbon**, v. 50, n. 9, p. 3210-3228, Aug 2012.

SCHEDIN, F. et al. Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene. **Nature Materials**, v. 6, n. 9, p. 652-655, Sep 2007.

SCHNIEPP, H. C. et al. Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 17, p. 8535-8539, May 4 2006.

SCHWIERZ, F. Graphene transistors. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 7, p. 487-496, Jul 2010.

SHENG, Z. et al. Protein-assisted fabrication of nano-reduced graphene oxide for combined in vivo photoacoustic imaging and photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 34, n. 21, p. 5236-5243, Jul 2013.

SINGH, V. et al. Graphene based materials: Past, present and future. **Progress in Materials Science**, v. 56, n. 8, p. 1178-1271, Oct 2011.

SMITH, A. M.; MANCINI, M. C.; NIE, S. Bioimaging Second window for in vivo imaging. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 11, p. 710-711, Nov 2009.

STANKOVICH, S. et al. Graphene-based composite materials. **Nature**, v. 442, n. 7100, p. 282-286, Jul 2006.

STANKOVICH, S. et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. **Carbon**, v. 45, n. 7, p. 1558-1565, Jun 2007.

SUN, Y. Q.; WU, Q. O.; SHI, G. Q. Graphene based new energy materials. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 4, p. 1113-1132, Apr 2011.

TIAN, B. et al. Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide. **Acs Nano**, v. 5, n. 9, p. 7000-7009, Sep 2011.

TUNG, V. C. et al. High-throughput solution processing of large-scale graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25-29, Jan 2009.

WAGNER, V. et al. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1211-1217, Oct 2006.

WANG, K. et al. Biocompatibility of Graphene Oxide. **Nanoscale Research Letters**, v. 6, 2011 2011.

WEISSLEDER, R. A clearer vision for in vivo imaging. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 316-317, Apr 2001.

WUST, P. et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **Lancet Oncology**, v. 3, n. 8, p. 487-497, Aug 2002.

ZHANG, W. et al. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8555-8561, Nov 2011.

ZHANG, X. et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration. **Carbon**, v. 49, n. 3, p. 986-995, Mar 2011.

ZHOU, Y. et al. Hydrothermal Dehydration for the "Green" Reduction of Exfoliated Graphene Oxide to Graphene and Demonstration of Tunable Optical Limiting Properties. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 13, p. 2950-2956, Jul 14 2009.

ZHU, C. et al. Reducing Sugar: New Functional Molecules for the Green Synthesis of Graphene Nanosheets. **Acs Nano**, v. 4, n. 4, p. 2429-2437, Apr 2010.