

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – SÃO CARLOS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HENRIQUE LUIZ BERTHAULT MOURA

Distribuição espacial de fluorescência de micropartículas de óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado utilizando microscopia confocal e de campo largo em TIRF

SÃO CARLOS

2024

Henrique Luiz Berthault Moura

Distribuição espacial de fluorescência de micropartículas de óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado utilizando microscopia confocal e de campo largo em TIRF

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo – São Carlos como parte
dos requisitos para a obtenção do título de mestre em
ciências

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

SÃO CARLOS

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: Henrique Moura

Data: 05/02/2024

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Moura, Henrique Luiz Berthault

Distribuição espacial de fluorescência de micropartículas de óxido de grafeno e óxido de grafeno funcionalizado utilizando microscopia confocal e de campo largo em TIRF / Henrique Luiz Berthault Moura. — São Carlos, 2024.
46 f.

Dissertação (Mestrado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Gehlen

1. Óxido de grafeno funcionalizado. 2. Fluorescência. 3. ICT. 4. TIRFM. 5. Confocal. I. Título.



Agradecimentos

À aluna de doutorado do grupo de fluorescência molecular da USP – São Carlos Izadora Fonseca Reis, por ter me ajudado com ensinamentos sobre o sistema óptico do grupo, lavagem de lamínulas e reações orgânicas.

Aos meus queridos amigos e familiares por terem me dado apoio nesse momento difícil da minha vida de mudança de cidade em meio à uma pandemia.

RESUMO

Novos materiais com geometria bidimensional (2D) que apresentem fluorescência molecular modular são sistemas de interesse tanto em estudos fundamentais bem como em aplicações em foto-catálise ou sensores de fluorescência molecular. Neste trabalho, óxido de grafeno (GO), material 2D proveniente do grafite, foi obtido através do método de Hummer, e usado como precursor para obtenção de GO modificado perifericamente com inclusão de grupo benzimidazol substituído, denominado de GOK. Ambos os materiais foram investigados por microscopia de emissão confocal e de campo largo em alta resolução, além de microscopia RAMAN e TEM para a caracterização de suas propriedades no nível de partícula única 2D micrométrica. Este novo material denominado de GOK apresentou propriedades fluorescentes distintas do GO, a destacar seu alto rendimento de emissão e localização periférica da fluorescência como resultado da modificação química obtida.

Palavras-chave: Fluorescência. Óxido de grafeno. Óxido de grafeno modificado. Microscopia confocal. Microscopia campo largo. TIRF. Reação Orgânica.

ABSTRACT

New materials with bidimensional geometry (2D) that present modulated molecular fluorescence are systems of great interest in fundamental studies as well as in applications such as photo-catalysis or sensors of molecular fluorescence. In this work, graphene oxide (GO), a 2D material coming from graphite, was obtained by Hummer's method, and used as a precursor for the synthesis of peripherally modified GO with the introduction of substituted benzimidazole, denominated as GOK. Both materials were investigated by confocal emission microscopy and widefield TIRF in high resolution, in addition to RAMAN microscopy and TEM for characterization of their proprieties in single 2D micrometer particle level. This new material denominated GOK presented distinguished fluorescence proprieties compared to GO, with high yield of emission and peripheral localization of fluorescence as a result of the chemical derivatization.

Keywords: Fluorescence. Graphene oxide. Funcionalized graphene oxide. Confocal microscopy. Widefield microscopy. TIRF. Organic Reaction

Lista de figuras

Figura 1: Modelos estruturais do GO ao decorrer dos anos. Adaptado da Ref.: Dreyer et al., 2014

Figura 2: Modelo de Lerf-Klinoski. (DREYER et al., 2010)

Figura 3: Novo modelo estrutural do GO com todos os grupos funcionais descoberto até 2023 (adaptado de (Brisebois & Siaj, 2020)).

Figura 4: Imagem TEM com resolução quase atômica de um, flake de GO. A barra representa 2 nm. A direita, defeitos de ponto são representados em azul, áreas grafíticas em amarelo, e regiões distorcidas, indicando a presença de grupos funcionais oxigenadas, em vermelho (ERICKSON et al., 2010).

Figura 5: Imagem TEM de uma monocamada de GO. A barra de escala representa 2nm. A expansão (a) mostra uma área de de 1 nm² região oxidada ampliada do material, e uma proposta atômica estrutural desta região. A expansão (B) concentra-se na mancha branca na região grafítica. As figuras de esferas e bastão abaixo das imagens de microscopia representam a estrutura atômica proposta para tais funcionalidade. Expansão (c) mostra uma porção grafítica de 1 nm² da porção grafítica do GO desta região (ERICKSON et al., 2010).

Figura 6: Mecanismo proposto para a formação de carbonos radicais no GO pela adição de radicais hidróxidos (YANG et al., 2014).

Figura 7: Ilustração para a conversão de grafite bulk em GO. As três etapas representam a formação de dois produtos intermediários (GIC estágio-1 e PGO) e o produto final sendo o GO. As linhas pretas contínuas representam camadas de grafeno; linhas pretas pontilhadas representam monocamadas de GO; linhas azuis largas representam intercalante H₂SO₄/HSO₄⁻; linhas largas roxas representam uma mistura do intercalante H₂SO₄/HSO₄⁻ misturado com a forma reduzida do agente oxidante (DIMIEV; TOUR, 2014).

Figura 8: Exemplos de diversas reações catalisadas por GO (adaptado da referência (Dreyer et al., 2014)).

Figura 9: Banda proibida da estrutura obtida pelo grupo (SHANG et al., 2012)

Figura 10: Níveis de energia quasi-molecular dos orbitais do GO.

Figura 11: Equipamentos de microscopia de Fluorescência construídos no LFM: A) Lasers utilizados durante o trabalho, e ao fundo, microscópio confocal com linhas de laser de 405 nm, 473 nm, 532 nm CW e 473 nm Omicron e 633 nm Hammamatsu pulsados (100 os FWHM), resolução em passo de 20nm e dois detectores pontuais APD; capacidade de análise de espectro de emissão e decaimentos em os. B) Microscópio de campo largo (widefield) com linhas para três lasers (Verdi 532 nm, Cobolt/Omicron 473 nm, Cube 405 nm), resolução espacial de 100nm/pixel em imagens de 512x512 pixels, com câmera EMCCD Evolve 512 – Photometrics acoplado na lateral.

Figura 12: Detalhes do microscópio confocal construído com múltiplas capacidades. Linha confocal com dois detectores pontuais tipo APD, IX71 com Piezoelétrico PI, e saída lateral para medidas espectrais.

Figura 13: Espectro UV-Vis do GO.

Figura 14: Espectro FTIR-ATR do GO.

Figura 15: Raman obtido com comprimento de onda de excitação de 633nm (a) foto do flake de GO selecionado para obter espectro, a barra de dimensão representa 5 micrometros. (b) espectro Raman do ponto do flake obtido de GO.

Figura 16: XRD dos materiais grafite malha 140 (azul) e GO (preto).

Figura 17: Imagem TEM de um flake de GO, focado na borda do material. A barra indica uma distância de 100 nm.

Figura 18: Imagens confocal (a,c) de um flake de GO analisado em 405 nm com 15 mW de potência e filtro de 500nm, para reduzir sinais de espalhamento, imagens obtidas utilizando área de varredura de 40000x40000nm e uma resolução de 300x300 pixels, utilizando Z inicial de 150 nm. A barra corresponde a 10 μ m de tamanho. Imagens (b,d) são fotos dos flakes utilizando câmera modelo DCC1240C.

Figura 19: Mapeamento 3D da fluorescência do GO utilizando Origin. A) Flake A da figura 18. B) Flake B da Figura 18.

Figura 20: Confocal de GO utilizando laser 473 com 15 mW de potência e dicróico 473 + 532 nm, sem filtro de 500nm. Área de varredura de 40000x40000nm e resolução de 200x200 pixels.

Figura 21: Mapeamento 3D da fluorescência dos Gos da figura 19 utilizando o Origin.

Figura 22: Espectro do GO utilizando laser Cube 405 nm, com potência de 20 mW, no software Spectra-Suite com tempo de aquisição 600 ms e 10 scans. A imagem apresenta 19 espectros que foram somados para obter uma média, com 150 pontos de smooth, utilizando o software Origin.

Figura 23: Decaimento do GO utilizando o software Fast. Decaimento biexponencial.

Figura 24: Imagens SOFI (*Stochastic Optical Fluctuation Image*) de segunda ordem obtida pelo software Igor de 6 flakes diferentes, obtidas com laser Cube 405 nm, potência nominal de 20 mW, área de varredura de 300x300 pixels, com aumento 1,6x por 7ms de tempo de aquisição. Barra de tamanho varia conforme flake.

Figura 25: Espectro UV-Vis de GOK.

Figura 26: Espectro FTIR-ATR de GOK.

Figura 27: Espectro de emissão médio de diferentes flakes de GOK em 405 nm.

Figura 28: Informações sobre moléculas que estão presentes no GOK. a) Estrutura do (4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzoaldeído) b) Estrutura do (E)-2-(4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzildieno) de metila. C) Espectro de emissão do (4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzoaldeído). D) Espectro de emissão do (E)-2-(4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzildieno) de metila (Gehlen et al., 2020).

Figura 29: XRD do GOK.

Figura 30: Imagem TEM em modo brightfield de dois flakes de GOK. A barra representa uma distância de 20 nm.

Figura 31: Espectro Raman de GOK. Obtido em 633nm.

Figura 32: Imagens confocal de 4 flakes de GOK obtidas com laser 405 nm com potência nominal 15 mW, com uma área de varredura de 40000x40000 nm, e resolução de 200x200 pixels.

Figura 33: Mapeamento 3D de fluorescência de flakes de GOK, com maior emissão na borda do material.

Figura 34: Decaimento do GOK utilizando o software Fast. Decaimento biexponencial.

Figura 35: Decaimento de dois flakes de GOK.

Figura 36: SOFI de segunda ordem de GOK utilizando excitação em 405 nm, com tempo de aquisição de 7ms, com aumento de 1,6X e resolução de 300x300 pixels.

Lista de siglas e abreviamentos

ATR - Reflectância Total Atenuada

BHT - Hidróxitolueno butilado

CB - Banda de condução

CGO - GO após a adição de água no mecanismo

CP - Cross-polarization

CS – Quitosana

DA - Diels-Alder

DCC - 1,3-diciclohexilcarbodimida

DDAT - Ácido S-1-dodecil-S'-(α,α' -dimetil- α'' -acético)tritanocarbonato

DMDA - Dimetil-N,N-acetamida dimetil acetato

DP - Pulso direto

EDC - Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EPR - Ressonância Paramagnética Nuclear

GO – Óxido de grafeno

GO-BR - Óxido de grafeno proveniente do método de Brodie

GO-HO - Óxido de grafeno proveniente do método de Hofmann

GO-HU - Óxido de grafeno proveniente do método de Hummer

GO-malononitrila – Óxido de grafeno funcionalizado com malononitrila

GO-ST - Óxido de grafeno proveniente do método de Staudenmaier

GO-Sultona – Óxido de grafeno funcionalizado com sultona

GO-TO - Óxido de grafeno proveniente do método de Tour

GOK - Óxido de grafeno funcionalizado com formação de imidazol seguido por reação de Knoevenagel.

HRP - Peroxidase de rábano

H₂SO₄-GIC - Intermediário de ácido sulfúrico-composto de intercalação de grafite

ICT - transferência de carga intramolecular

LK - Lerf-Klinowski

MA - Ácido málico anidrido

MAS - Fiação de ângulo mágico

NHS - N-hidroxissuccinimida

PGO - Segundo intermediário do mecanismo de formação do GO

rGO - Forma reduzida do óxido de grafeno

RMN - Ressonância magnética nuclear

SOFI - Flutuação de imagem óptica estocástica

SS-NMR - Ressonância magnética nuclear em estado sólido

FTIR-ATR – Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

TEM - Microscopia eletrônica de transmissão

TGA – Análise termogravimétrica

THF – Tetraidrofurano

TIRF - Fluorescência no modo campo largo em reflexão interna total

VB - Banda de valência

XPS - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-X

XRD - Difração de Raio-X

Lista de símbolos

λ_{exc} - Comprimento de onda de excitação

λ_{em} - Comprimento de onda de emissão

τ_1 – tempo de vida da componente mais rápida

τ_2 – Tempo de vida da segunda componente

B_1 – Peso do primeiro tempo de vida

B_2 – Peso do segundo tempo de vida

Sumário

Introdução	1
Estrutura do GO.....	2
Propriedades físicas e químicas do óxido de grafeno.....	11
Mecanismo de formação do GO.....	12
Funcionalizações do GO	13
Nos grupos carboxílicos.....	13
Nos grupos álcoois	15
Nos grupos epóxidos	15
Propriedades catalíticas	15
Fluorescência do GO.....	17
Objetivos	19
Materiais e Métodos.....	19
Preparação da amostra.....	19
Microscopia confocal	20
Microscopia widefield em TIRF	21
Síntese do GO	23
Síntese do GOK.....	23
Resultados e Discussão	23
GO.....	23
Caracterização do GO	23
Microscopia do GO	28
GOK.....	33
Caracterização do GOK	33
Microscopia do GOK	38
Conclusões	43
Referências	44

Introdução

Dentro dos materiais do tipo grafeno encontra-se o óxido de grafeno. A preparação de óxido de grafite data desde 1859, quando Benjamin Brodie tratou grafite com fortes oxidantes, com o objetivo de elucidar a estrutura do material. Após isso, diversos novos métodos foram surgindo com a intenção de criar um óxido de grafeno com melhor qualidade de material, que não gerasse tantos gases tóxicos (NO_2 e N_2O_4) e componentes explosivos (ClO_2), provenientes do uso de ácido nítrico e clorato de potássio, respectivamente (BRISEBOIS; SIAJ, 2020; ZAABA et al., 2017).

A síntese do óxido de grafeno (GO) pelo método de Brodie (1859), é feita pela mistura de clorato de potássio (KClO_3) e ácido nítrico fumegante (HNO_3) à 60°C por alguns dias (3-4 dias). O produto obtido (GO-BR) após múltiplos tratamentos com oxidantes (4 a 7), processo de lavagem e secagem mostrou-se uma composição de carbono, hidrogênio e oxigênio e sua fórmula geral foi estimada como sendo $\text{C}_{11}\text{H}_4\text{O}_5$ (C/O : 2.2) (BRISEBOIS; SIAJ, 2020; ZAABA et al., 2017).

Quase 40 anos depois do experimento de Brodie, Staudenmaier melhorou o procedimento alterando a forma como o clorato de potássio é adicionado à reação. Passou a ser adicionado em pequenas porções para eliminar o perigo de formação de subproduto explosivo. Além disso o ácido sulfúrico foi adicionado em etapas no decorrer da reação. Devido à presença de ácido sulfúrico uma menor quantidade de ácido nítrico fumegante para a oxidação era necessária, evitando assim formação excessiva de gases tóxicos (NO_2 , N_2O_4). O GO produzido por esse método será denominado por GO-ST. Em 1937, Hofmann também desenvolveu uma alternativa segura usando KClO_3 e ácido nítrico não fumegante para preparar GO, aqui denominado (GO-HO) (BRISEBOIS; SIAJ, 2020; DREYER et al., 2010; DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014; ZAABA et al., 2017).

Quase 100 anos após o método de Brodie. Os cientistas Hummer e Offeman desenvolveram o método mais rápido e mais seguro de produzir GO (GO-HU) com relação C/O de 2.25, muito similar ao GO-BR (2.2). O método desenvolvido por eles era baseado na ação do excesso de permanganato de potássio, ácido sulfúrico e uma pequena quantidade de nitrato de sódio sobre o grafite. Esse método é muito mais seguro do que os métodos a base de clorato por evitar a formação do explosivo ClO_2 . Além disso, o excesso de permanganato de potássio era neutralizado com uma solução diluída de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para formação de composto não tóxico de sais sulfatos de manganês e oxigênio gasoso facilmente removível durante o processo de purificação. Ainda assim, ácido nítrico era gerado in situ no processo de acidificação de nitrato de sódio e alguns gases tóxicos (NO_2 , N_2O_4) ainda eram produzidos (BRISEBOIS; SIAJ, 2020; ZAABA et al., 2017).

Outro método digno de se notar foi o método de Tour, publicado em 2010, que aprimorou a preparação de GO com alto nível de oxidação utilizando um método de Hummer modificado. Ácido fosfórico (H_3PO_4), foi utilizado ao invés no nitrato de sódio para auxiliar a oxidação exfoliativa química do grafite e para produzir GO com maior rendimento. O GO preparado por esse método (GO-TO) tem um grau maior de oxidação e possui uma estrutura mais regular, com menos defeitos no seu plano basal comparado aos métodos GO-BR, GO-ST e GO-HU. Em relação à estrutura do GO, foram teorizados

diversos modelos diferentes, passando desde Hoffmann até modelos mais atuais (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

Estrutura do GO

Identificar a estrutura média do GO continua sendo um desafio pois o GO deve ser pensando como uma família de materiais, já que ele não tem uma composição fixa sendo um material não estequiométrico. Sua relação C/O varia de acordo com o método de síntese utilizado (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). A Tabela 1 apresenta as diferentes características do GO a partir do método de síntese utilizado.

Método	Oxidante	Meio de reação	Relação Carbono-oxigênio	Relação I_D/I_G do espectro Raman	Observações
Brodie	$KClO_3$	HNO_3 fumegante	1,17	0,89	---
Staudenmaier	$KClO_3$	HNO_3 + H_2SO_4	---	----	$KClO_3$ adicionado em etapas ao invés de uma única vez
Hofmann	$KClO_3$	HNO_3 não fumegante	1,15	0,87	---
Hummer	$KMnO_4$ + $NaNO_3$	H_2SO_4 concentrado	0,84	0,87	Modificações podem ser realizadas para excluir a necessidade de $NaNO_3$
Tour	$KMnO_4$	H_2SO_4 + H_3PO_4	0,74	0,85	---

Tabela 1: Características do GO produzidos pelos diferentes métodos (adaptado da referência Dreyer et al., 2014).

Diversos modelos de GO foram sugeridos, representados na figura 1, porém por muito tempo o modelo mais aceito foi o do Lerf-Klinowski, Figura 2 (Dreyer et al., 2010).

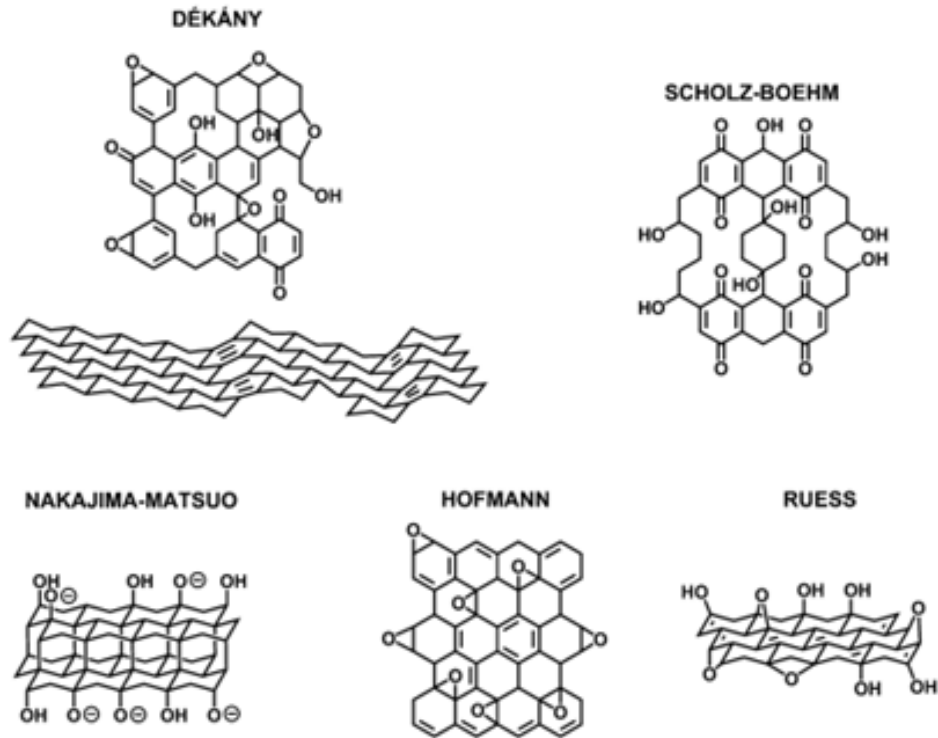


Figura 1: Modelos estruturais do GO ao decorrer dos anos. Adaptado da Ref.: Dreyer et al., 2014.

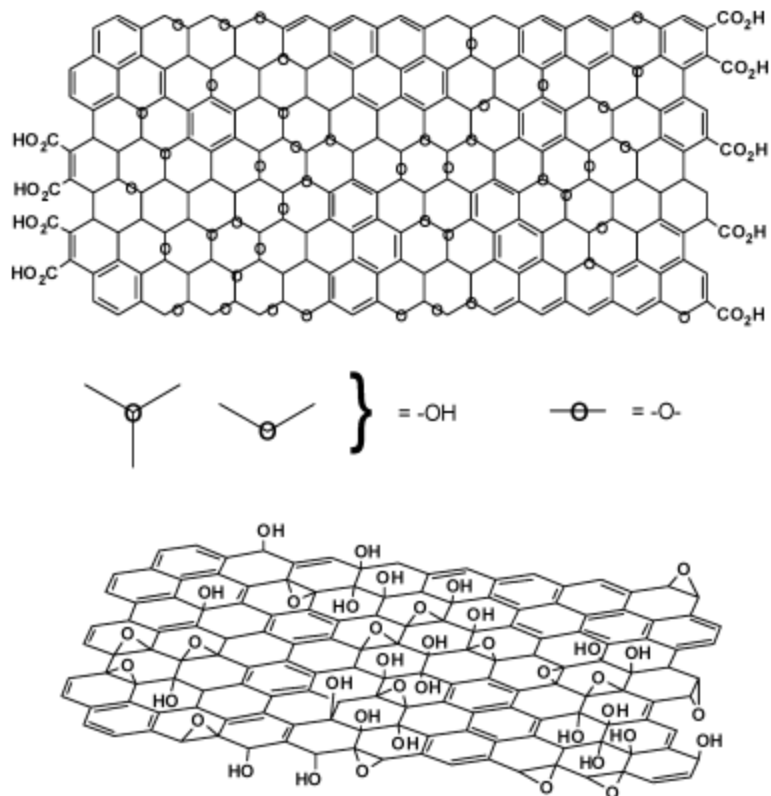
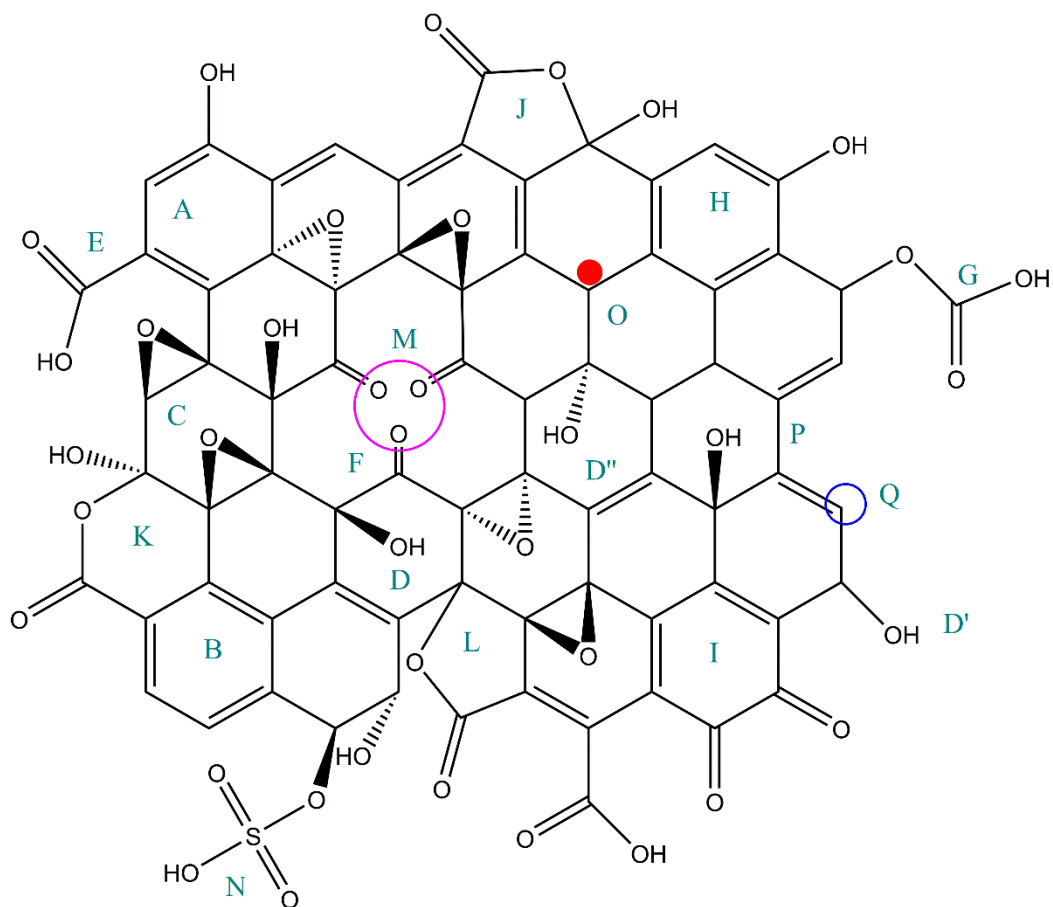


Figura 2: Modelo de Lerf-Klinoski. (DREYER et al., 2010).

Após diversos estudos sobre a estrutura do GO, chegou-se à conclusão que o modelo de Lerf Klinowski não é o mais completo, devido à falta de diversos grupos

funcionais. O modelo mais completo e aceito atualmente está representado na Figura 3, e será discutido à diante.



1996-1998 -

- A - Ligação Dupla
- B - Entidade Aromática
- C - Epóxido (C-O-C; 1-2 éter)
- D - Hidroxila (C-OH; 2 tipos)
- E - Ácido Carboxílico (OH-C=O ou sal)

2005-2006 -

- F - Cetona
- G - Carbonato orgânico (C-O-COH)
- H - Fenol
- I - Quinona

2009 -

- J - Lactol (5)
- K - Lactol (6)
- L - Ester Carbonílico

2010 -

- M - Defeito De Ponto

2012 -

- N - Organossulfato (C-O-SO₃H)

2014 -

- O - Carbono Radical Pi-Conjugado

2016 -

- P - But-1,3-dieno
- Q - Ligação C-H Implícita

Figura 3: Novo modelo estrutural do GO com todos os grupos funcionais descoberto até 2023 (adaptado de (Brisebois & Sij, 2020)).

O modelo que consta com maiores observações experimentais sobre GO preparado com permanganato de potássio como oxidante foi proposto por Lerf-Klinowski (LK) no final dos anos 1990. Usando majoritariamente ressonância magnética nuclear em

estado sólido de carbono-13 e hidrogênio-1, FTIR e derivação química de óxido de grafite com reagentes com conhecidos mecanismos de reação, LK concluiu que há duas regiões no GO: regiões com anéis de seis membros alifáticas e regiões aromáticas com anéis de benzeno não oxidados. A relação das duas regiões depende do grau de oxidação do material (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

Como representado na figura 2 o composto é constituído majoritariamente de ligações duplas (A), entidades aromáticas (B) e grupos epóxidos (C) que torna o plano basal quase bidimensional, apenas átomos de carbonos ligados a grupos hidroxilas apresentam uma leve configuração tetraédrica. As funções oxo estão abaixo e acima do plano basal, formando uma camada de átomos de oxigênio de concentrações variáveis com um grande número de grupos epóxidos (1,2 éter) (C) e C-OH (D,D',D'') muitos próximos um do outro (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

A distribuição dos grupos funcionais nos anéis aromáticos oxidados não é necessariamente idêntica, e tanto os anéis oxidados e entidades aromáticas são distribuídas aleatoriamente. A estrutura do GO termina em grupos C-OH (D') e COOH (E), o que também pode explicar a acidez do composto. Experimentos mais recentes baseados na derivação química usando rearranjo do tipo Claisen também foi utilizada para provar a presença de álcoois alílicos (D'') na superfície do óxido de grafite (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

Outros importantes aspectos de GO foram descritos por Dékány et al. que identificaram, sem dúvidas, a presença de outros grupos oxo como, por exemplo, cetona (F), carbonatos orgânicos (G), fenol (H) e quinonas (I). Em seu artigo original, Dékány et al. propuseram uma versão modificada do modelo de Scholtz-Boehm para suas novas observações. Importante ressaltar que em seu trabalho, o GO foi preparado utilizando um método diferente (oxidação com clorato de potássio), e por tanto, tinha composição química diferente. Ambos os modelos são plausíveis, mas o de Dékány é mais específico para GO com alto nível de oxidação, enquanto o de LK é mais geral e compatível com a maioria dos tipos de GO (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

O espectro de ressonância magnética nuclear de Carbono-13 do GO, apresenta baixa relação de sinal/ruído, que pode explicar porque LK, nos anos 1990, não detectaram explicitamente a presença de constituintes em menor quantidade como cetonas e enóis (BRISEBOIS; SIAJ, 2020). Nesse contexto, é plausível incluir ambos (F, D'') no modelo para terminação de GO (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

Além disso, Cai et al. não observaram 'cross peaks' entre $^{13}\text{C-sp}^2$ (129 ppm) e seus outros componentes em 169 ppm e 193 ppm ($^{13}\text{COOH}$, $^{13}\text{C=O}$), respectivamente. Esses resultados implicam que grupos carboxilas (E) e carbonilas (F) estão separados espacialmente de uma quantidade maior de átomos de carbono atribuídos a funcionalidade (A, C, D) encontrados na superfície. Por tanto, na figura 3, grupos ácidos carboxílico (E) e cetona (F) estão localizados na periferia do material, encerrando a borda do flake ou defeito de ponto (M). Importantes entendimentos sobre a estrutura do GO foram revelados também por Gao et al. Baseado em Ressonância Magnética nuclear de estado sólido eles conseguiram identificar a presença de outros grupos em menor quantidade: carbonos não protonados em torno de 100 ppm. De acordo com eles: *“provavelmente anéis lactol de cinco (5)- e seis (6) membros (J, K), junto da periferia*

são as estruturas mais prováveis responsáveis por esse sinal no GO.” (tradução livre de (BRISEBOIS; SIAJ, 2020)).

Cai et al. também foram capazes de identificar sinais de éster (L) em 167 ppm. Eles explicam suas origens da presença de inúmeros álcoois terciários em GO que permite a possibilidade de alguns dele de reagir com ácidos carboxílicos próximos para formar grupos éster na periferia, tanto na mesma camada de GO ou na camada vizinha. A estrutura de GO não é completamente compreendida, e o modelo geral de LK deveria ser atualizado com as novas descobertas, até então, desconhecidas na época como defeitos de ponto (M), éster sulfato (N), carbonos radicais π -conjugados (O), implícita ligação C-H (P) e sistemas 1,3 butadieno (Q), que descreveriam melhor sua reatividade química (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

Há defeitos no GO, também chamado de defeitos de ponto (M), que é explicado devido à liberação de CO e CO₂ durante o processo de oxidação. Isso foi observado utilizando TEM de resolução quase atômica, esses experimentos demonstraram que o GO não possui apenas duas regiões (grafíticas e regiões oxidadas), com LK descreveu, mas também buracos abaixo de 5 nm² encontradas ao longo do flake do GO (Figura 4 e 5) (BRISEBOIS; SIAJ, 2020; ERICKSON et al., 2010).

No estudo conduzido por Erickson et. al, foram analisadas imagem de TEM com resolução quase atômica de GO sintetizado pelo método de Hummer modificado e GO reduzido por anelamento (ERICKSON et al., 2010). As regiões em azul apresentam defeitos de ponto, as em amarelo regiões grafíticas, e em vermelho regiões em alto contraste desordenada, ou seja, alto nível de oxidação. As áreas azuis, amarelas e vermelhas indicam regiões com área de 2%, 16%, e 82 %, respectivamente da Figura 4. Foi possível estabelecer a estrutura atômica de algumas regiões do GO selecionada pelo grupo de Erickson, sendo possível observar regiões altamente oxidadas, regiões com menos grupos oxigenados e regiões grafíticas, ou seja, sem a presença de átomos de carbono hibridizados em sp³, todos em sp², como apresentado na Figura 5. Essa Figura apresenta uma imagem TEM de uma monocamada de GO. Em (a), a expansão mostra, da esquerda para a direita, uma área de de 1 nm² região oxidada ampliada do material, então é possível uma proposta atômica estrutural desta região com átomos de carbono em cinza e átomos de oxigênio em vermelho, e finalmente a média de uma imagem TEM simulada da estrutura proposta e uma imagem TEM simulada de outra estrutura onde a posição de funcionalidade oxidativas foram alteradas. A expansão (B) concentra-se na mancha branca na região grafítica.

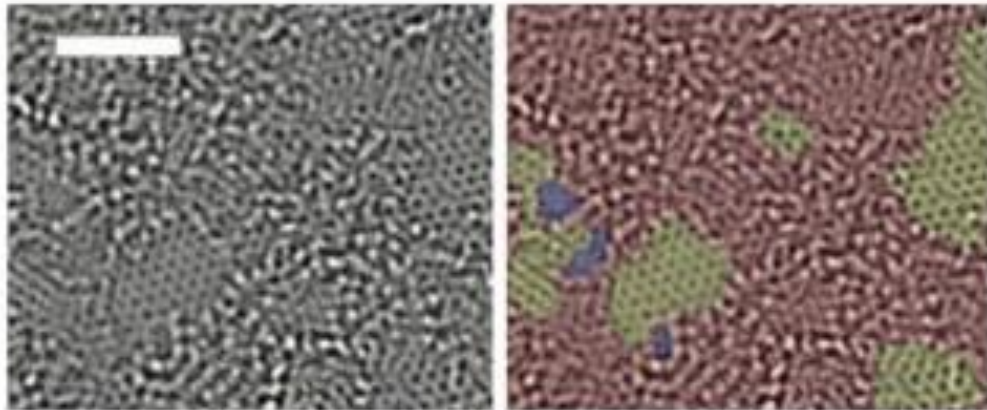


Figura 4: Imagem TEM com resolução quase atômica de um, flake de GO. A barra representa 2 nm. A direita, defeitos de ponto são representados em azul, áreas gráficas em amarelo, e regiões distorcidas, indicando a presença de grupos funcionais oxigenadas, em vermelho (ERICKSON et al., 2010).

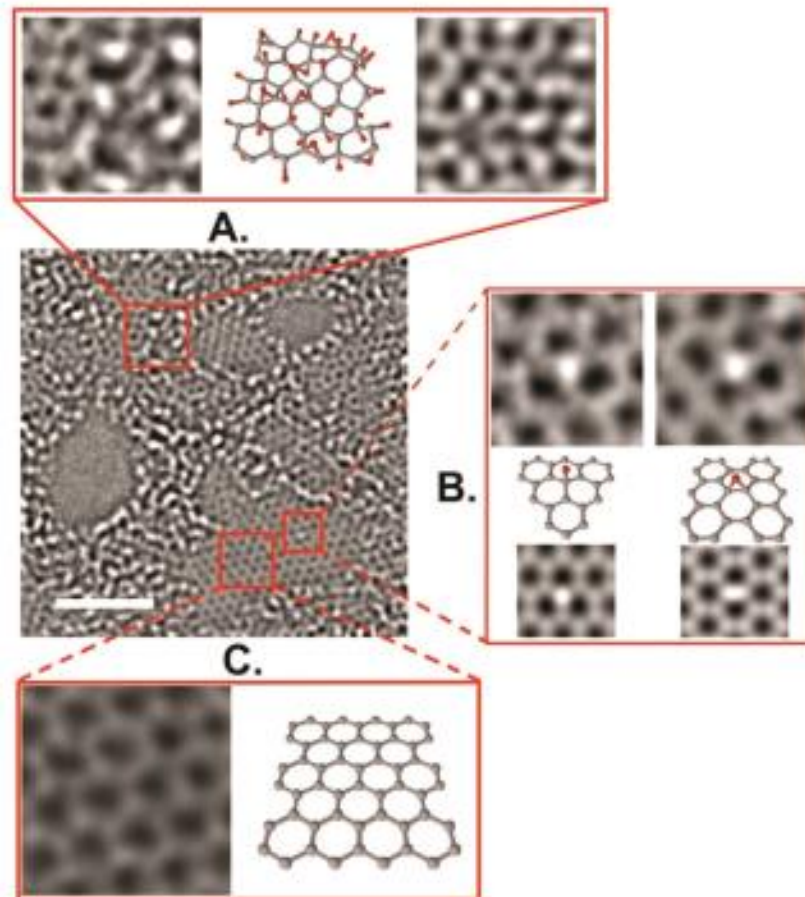
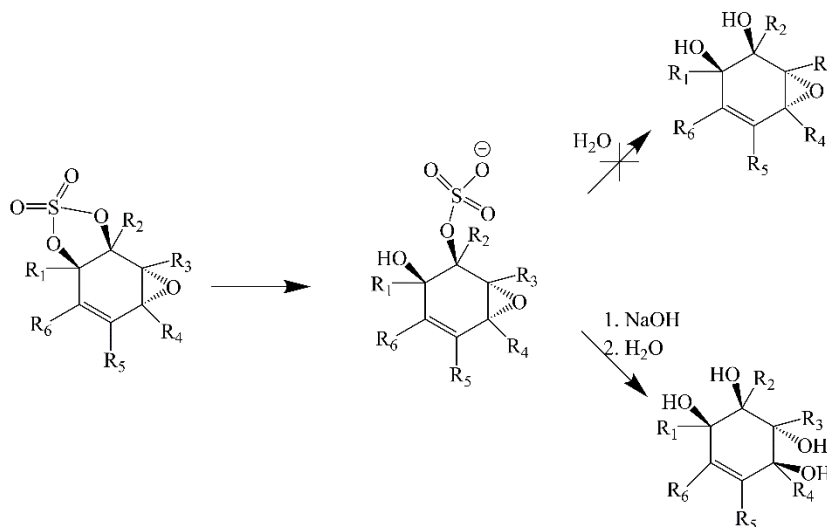


Figura 5: Imagem TEM de uma monocamada de GO. A barra de escala representas 2nm. A expansão (a) mostra uma área de de 1 nm^2 região oxidada ampliada do material, e uma proposta atômica estrutural desta região. A expansão (B) concentra-se na mancha branca na região gráfica. As figuras de esferas e bastão abaixo das imagens de microscopia representam a estrutura atômica proposta para tais funcionalidade. Expansão (c) mostra uma porção gráfica de 1 nm^2 da porção gráfica do GO desta região (ERICKSON et al., 2010).

Há também os grupos organossulfatos presentes no GO, comprovado pelo trabalho de Eigler et al (EIGLER et al., 2013). Tratamento de óxido de grafite com água resulta em hidrólise e ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, organossulfatos cíclicos

são clivados à organossulfatos. Na segunda etapa os organossulfatos são clivados à dióis vicinais (Esquema 1) (EIGLER et al., 2013). O trabalho comprova que somente a primeira etapa ocorre, por isso o conteúdo de enxofre permanece no GO (EIGLER et al., 2013).



Esquema 1: Formação de organossulfatos no GO (adaptado da referência (Eigler et al., 2013)).

Os grupos funcionais (A-N), descritos na figura 3 podem explicar, em certa medida, propriedades químicas e físicas do GO, tais como basicidade, acidez, redutivas e características hidrofílicas. Porém esses grupos não podem explicar a capacidade do GO de ativar a quimiluminescência do luminol, por exemplo. Yang et al., então, realizou experimentos para aumentar os conhecimentos da estrutura do GO.

Em seu experimento sintetizou-se dois GOs pelo método de Hummer clássico, utilizando quatro etapas. Primeiro o grafite foi oxidado utilizando P_2O_5 e $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (etapa 1); o produto obtido foi exfoliado e oxidado a nano-folhas utilizando H_2SO_4 e KMnO_4 (etapas 2 e 3), e por último, o excesso de KMnO_4 foi removido adicionando H_2O_2 (etapa 4). O primeiro GO, denominado GO-1 foi sintetizado utilizando essas quatro etapas, enquanto o GO-2 foi sintetizado realizando as 3 primeiras etapas, ou seja, sem a adição de H_2O_2 (YANG et al., 2014).

Após a adição de KI e alumínio, a coloração amarela clara da solução de GO-1 imediatamente alterou para azul escuro, enquanto a coloração da solução de GO-2 permaneceu sem mudança. Isso mostra que o GO-1 pode oxidar íons I^- a I_2 , formando o complexo triiodoalumínio, que possui coloração azul, enquanto GO-2 não possui a capacidade de realizar essa reação. Isso mostra que GO-1 por si só pode reagir com KI (YANG et al., 2014), já que os resíduos de oxidantes, como, KMnO_4 e H_2O_2 foram totalmente removidos anteriormente, demonstrando que a adição de H_2O_2 possui um papel importante na estrutura e composição do GO, além de neutralizar o permanganato adicionado na etapa anterior (YANG et al., 2014).

Foi então, realizado um experimento comparando a intensidade de quimiluminescência do GO-1, peroxidase de rábano (HRP) e agente Fenton ($\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) com luminol. O grupo observou que o GO-1 possui maior intensidade de quimiluminescência. A rede de estrutura pi-conjugada do GO e seu modelo estrutural teorizado até então, não podiam explicar a origem da capacidade oxidativa e habilidade

de ativar a forte quimiluminescência do luminol. Houve três grandes motivos para o grupo considerar a presença de radicais ativos em GO-1. O primeiro foi a forte quimiluminescência do luminol, que é similar à observada com HRP e normalmente relacionada a radicais. O segundo é o gradual desaparecimento da capacidade oxidante da solução em ar, comum em radicais ativos. E, por último, a adição de H_2O_2 na quarta etapa que permite o GO a ativar a quimiluminescência do luminol (YANG et al., 2014).

O grupo, então utilizou uma técnica sensível e específica para o estudo de radicais formados em reações química, conhecida como Ressonância Paramagnética Nuclear (EPR). GO-1 apresentou um pico de ressonância fino e intenso com $g= 2,003$. As características do pico mencionadas anteriormente implicam que não há carregadores de condução no GO-1, diferentemente do grafite (YANG et al., 2014). Ou seja, GO-1 não possui extensos anéis aromáticos com carbonos hibridizados em sp^2 , e sim, a presença de anéis aromáticos com carbonos hibridizados em sp^3 , que não permitem a formação de uma banda de condução (Yang et al., 2014). O EPR de GO-2 não apresentou nenhum sinal, portanto o sinal de EPR do GO-1 não resulta dos elétrons π com mobilidade nos anéis aromáticos com carbonos hibridizados em sp^3 , mas sim das possíveis espécies radicalares produzidas durante o tratamento com H_2O_2 (YANG et al., 2014).

Além disso, o grupo misturou H_2O_2 e GO-2, que produziu um pico de baixa intensidade no EPR, com g idêntico igual a 2,003, enquanto o peróxido de hidrogênio sozinho não produziu nenhum sinal EPR, portanto a adição do peróxido de hidrogênio na síntese do GO-1 levou a formação de sinal EPR (YANG et al., 2014).

Porém, GO-1 apresenta um sinal único de EPR, sem splitting, sugerindo que não há um núcleo diretamente ligado aos radicais, portanto, o pico de EPR é originário dos carbonos radicais centrados na rede π no plano ao invés de outros possíveis radicais (YANG et al., 2014). O mecanismo de formação dos carbonos radicais do GO-1 é ilustrado na Figura 6, proposto por Yang et al.

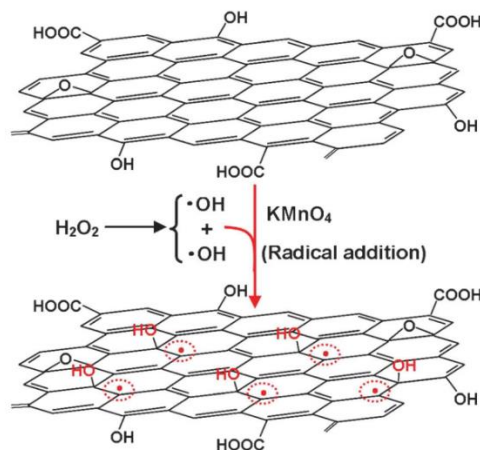


Figura 6: Mecanismo proposto para a formação de carbonos radicais no GO pela adição de radicais hidroxilados (YANG et al., 2014).

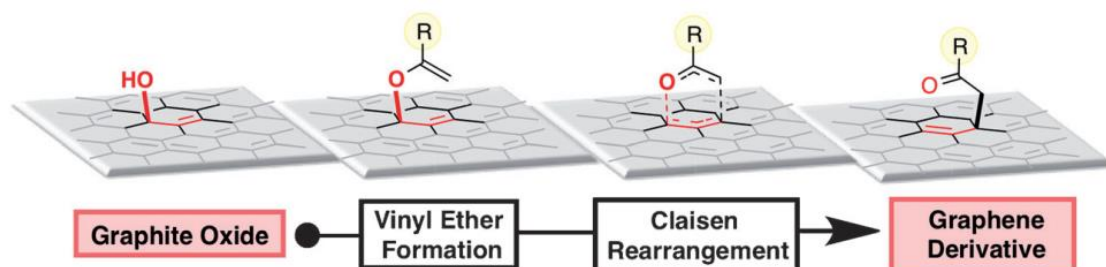
Utilizando reação de Diels-Alder (DA) e ^{13}C -SS-NMR, ^{13}C pulso direto (DP) e 1H - ^{13}C cross-polarization (CP) utilizando fiação de ângulo mágico (MAS), Brisebois et al. obtiveram resultados de uma cicloadição [4+2] entre GO e anidrido málico (BRISEBOIS et al., 2016). Isso reabre a questão fundamental de LK sobre a presença ou

não de ligações duplas conjugadas no GO (BRISEBOIS; SIAJ, 2020). O grupo conduziu o experimento reagindo GO como fonte de dieno com ácido málico anidrido (MA) como um dienófilo (BRISEBOIS et al., 2016).

O GO contém dois tipos de estruturas que podem reagir com o dienófilo, os carbonos das estruturas devem estar em conformação *cis* para reagirem em ciclo adição [4+2]. Durante a reação foi possível observar a formação de uma nova ligação covalente devido a novas bandas formadas nos resultados de pulso direto de ^{13}C - ^1H desacoplado. Importante ressaltar que esses deslocamentos químicos não são provenientes do MA que não reagiu ou do éster malato, ou de nenhum grupo funcional presentes no modelo do GO até então (BRISEBOIS et al., 2016).

Para suportar esses resultados, o grupo realizou análises de FTIR, XPS, uma forma modificada da titulação de Boehm, Raman e TGA para estudar a presença de novos grupos COOH formados pela reação e formação após a hidrólise, além de uma análise de TGA para estudar a estabilidade do novo composto. Todos os resultados indicam que a reação química ocorreu devido ao aumento de grupos oxigenados/ ácidos carboxílicos após a reação, e os resultados de TGA apontam que o produto da reação do GO com MA pode sofrer uma decomposição térmica dos grupos oxigenados instáveis ou um retro-DA sem sofrer danos em sua estrutura (BRISEBOIS et al., 2016).

Um outro estudo foi realizado para a funcionalização de álcoois alílicos do GO (COLLINS et al., 2011). Esse estudo o grupo realizou uma funcionalização do GO através de um rearranjo de Claisen, reagindo o GO com dimetil-N,N-acetamida dimetil acetato (DMDA), convertendo os grupos álcoois alílicos em N,N-dimetilamida γ,δ -insaturados (Esquema 2), onde $\text{R}=\text{N}(\text{CH}_3)_2$.



Esquema 2: Transformação do oxigênio alílico para ligação de carbono no óxido de grafeno (COLLINS et al., 2011).

Essa reação foi a escolhida pelo grupo por quatro razões: 1) Devido à habilidade de avaliar quanticamente a eficiência da transformação devido ao grupo nitrogenado. 2) A quimo especificação do DMDA para grupos álcool. 3) apenas aquecimento do DMDA é necessário para efetivamente transferir o grupo vinílico, e 4) a formação das ligações entre átomos de carbonos quaternários é bem estabelecida usando a variante Eschenmoser-Claisen (COLLINS et al., 2011).

O resultado de difração de Raio-X (XRD) revelou um aumento na distância interplanar do G1 em relação ao GO, indicando a instalação de novos grupos no plano basal, o resultado de TGA indicou uma diminuição dos grupos C-O (epóxidos ou álcoois terciários) devido à menor perda de massa de 190 a 210°C, enquanto houve uma nova formação de decomposição em 290 a 310°C, que potencialmente se refere aos grupos

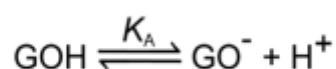
amidas formadas na superfície do G1, a relativa alta temperatura para decomposição desses grupos demonstra uma ligação covalente, ao invés a adsorção desse material no GO. Os resultados de XPS mostram uma presença de 1,4% de nitrogênio e um único sinal de N(1s) foi encontrado em 399,9 eV, indicando que todo o DMDA foi consumido para gerar o produto ou removido durante as lavagens (COLLINS et al., 2011).

Em seguida o grupo estudou se é possível converter as amidas em outros grupos, como os grupos carboxilatos na borda do material são responsáveis pela estabilização de colóides de óxido de grafeno eletrostaticamente por curtos períodos (COLLINS et al., 2011), o grupo aumentou a quantidade de carboxilatos presentes através da saponificação dos grupos amidas, tratando uma amostra de GO que foi funcionalizada com grupos amidas utilizando DMDA e após a acidificação da solução do reagente o material foi precipitado e pôde ser isolado (COLLINS et al., 2011). Resultados de XPS desse novo material indicou uma queda em peso atômico de nitrogênio de 3,1% para 0,6%. Além do potencial zeta aumentar de -68 mV para -15mV em pH entre 6,3 e 4,6, ficando quase nulo em pH 3, indicando que os grupos carboxilatos estão protonados (COLLINS et al., 2011).

Propriedades físicas e químicas do óxido de grafeno

No GO, átomos de carbono (C), oxigênio (O) e hidrogênio (H) são agrupados e organizados em uma folha monocamada de profundidade em torno de 1 nm, e o formato de uma partícula de GO pode ter diferentes formatos, tais como, flake, folha, quantum dot (esfera), placas ou fita (BRISEBOIS; SIAJ, 2020). O GO estaca um sobre o outro podendo ter uma distância interplanar entre 0,7 e 1 nm, a depender do método de síntese utilizado, essas camadas estacam uma sobre a outra, majoritariamente, por ligação de hidrogênio (BRISEBOIS; SIAJ, 2020). A denominação também varia conforme o número de folhas estacadas de GO, quando envolvem duas folhas (2), essa recebe o nome de bi-camada, três folhas (3) tri-camada, de (4) a (10) algumas-camadas e de (10) acima, de multi-camada (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

No GO, grupos funcionais como epóxido e álcool estão majoritariamente no plano basal, enquanto grupos ionizáveis, encontram-se majoritariamente na borda do material (BRISEBOIS; SIAJ, 2020). A repulsão eletrostática entre os grupos ionizados carboxílicos e fenólicos impedem a agregação do GO em meio aquoso. Além disso, a solubilidade do GO reduz conforme a diminuição do pH, devido a força de repulsão eletrostática ficar enfraquecida pela protonação dos grupos carboxilatos e fenolatos. Portanto, folhas maiores de GO podem ser selecionadas acidificando o meio aquoso para pH = 4, além de poder ocorrer em solventes orgânicos polares, como o etanol, quando GO é dispersado em etanol e espera-se a decantação, as maiores folhas de GO decantam mais rapidamente, enquanto as menores ficam dispersas no solvente (BRISEBOIS; SIAJ, 2020). Folhas de GO possuem três pKa diferentes de valores 4,3, 6,6 e 9,0, relacionados à dissociação dos grupos carboxílicos, fenólicos e álcoois, respectivamente, representado no esquema 3 (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).



Esquema 3: Dissociação do GO em água (BRISEBOIS; SIAJ, 2020).

Mecanismo de formação do GO

Muitos aspectos do GO têm sido estudados, porém, pouco se sabe sobre o mecanismo de formação. O grupo de Tour estudou esse mecanismo, sugerindo que a formação do GO ocorre em três etapas: 1) Conversão do grafite em um intermediário de ácido sulfúrico-composto de intercalação de grafite (H_2SO_4 -GIC). 2) Conversão do GIC na forma oxidada do grafite, definido como PGO, sendo esse o segundo intermediário. 3) Conversão do PGO para GO (CGO) pela reação do PGO com água (DIMIEV; TOUR, 2014).

Na primeira etapa, a formação de H_2SO_4 -GIC se dá logo após a exposição do grafite ao ácido sulfúrico, e sua formação torna-se perceptível pela cor azul escuro característica adquirida pelos flakes de grafite, e pode ser confirmada por análises de espectroscopia Raman e XRD (DIMIEV; TOUR, 2014). A formação do primeiro intermediário varia conforme de acordo com o potencial eletroquímico do meio. Na situação de uma oxidação realizada pelo método de Hummer modificado, o primeiro intermediário se forma em 3-5 minutos (DIMIEV; TOUR, 2014). A formação do segundo intermediário é o processo lento da reação, demorando horas, ou até mesmo dias a depender do grafite precursor usado (DIMIEV; TOUR, 2014).

O grupo de Tour realizou a reação utilizando massas diferentes de permanganato de potássio, para estudar o grau de oxidação de seu GO. A massa de permanganato foi pesada de acordo à massa de grafite, na proporção 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5, de grafite e permanganato, respectivamente. Áreas não oxidadas apresentam coloração azul na luz transmitida e refletida, enquanto áreas oxidadas apresentam coloração amarelo claro (DIMIEV; TOUR, 2014).

O espectro Raman das áreas azuis próximas ao centro do flake, contém um único pico em 1635 cm^{-1} relacionado ao pico G, ou seja, o plano grafítico. O espectro das áreas mais oxidadas apresentam dois picos, G e D, e duas bandas de baixa intensidade, 2D e G + D, esse espectro é típico de GO (DIMIEV; TOUR, 2014). Após consumo da segunda parte de $KMnO_4$, em massa, o tamanho da região azul reduziu e a largura da porção amarela clara de GO nas extremidades aumentou (DIMIEV; TOUR, 2014). Após o consumo de 3 parte de $KMnO_4$, em massa, todos os flakes da amostra parecem estar completamente oxidados, sem regiões azuis detectáveis pela microfotografia, porém, 20% dos flakes ainda apresentam centros levemente azulados (DIMIEV; TOUR, 2014). O PGO formado pelo consumo de quatro partes de $KMnO_4$, em massa, dispersou-se facilmente agitando a amostra em água após 15 minutos. Isso indica que, após o consumo de 3 partes de $KMnO_4$, em massa, o material não apresenta densidade de grupos funcionais o suficiente para exfoliação espontânea (DIMIEV; TOUR, 2014).

A identidade do agente oxidante específico atacando as camadas de grafeno ainda é desconhecida, sendo que a própria natureza oxidante da solução $KMnO_4/H_2SO_4$ não foi muito estudada (DIMIEV; TOUR, 2014). Alguns autores sugerem o agente oxidante sendo o heptaóxido de manganês (VII) (DREYER et al., 2010). É mais possível, no entanto, que $H_2SO_4Mn(VII)$ existe na forma planar de cátion (MnO_3^+), que possui característica semelhantes aos íons HSO_4^- e sulfato (SO_4^{2-}) na forma MnO_3HSO_4 , ou $(MnO_3)_2SO_4$ (DIMIEV; TOUR, 2014).

O progresso da reação difere de flake para flake, devido à morfologia (DIMIEV; TOUR, 2014). A diferença na morfologia causa uma diferença de taxa de difusão, oxidando o material de graus de oxidação diferente, permitindo que flakes menores se oxidem em maior grau em relação a flakes maiores (DIMIEV; TOUR, 2014).

A terceira etapa, ou seja, formação de PGO em GO, se dá pela exfoliação em monocamadas, além do processo de hidrólise dos sulfatos covalentes que servem de grupos protetores, e modificação de grupos funcionais oxigenados devido à reação desses com água (DIMIEV; TOUR, 2014). A Figura 7 resume e ilustra as três etapas constituintes para a formação de grafite bulk em GO.

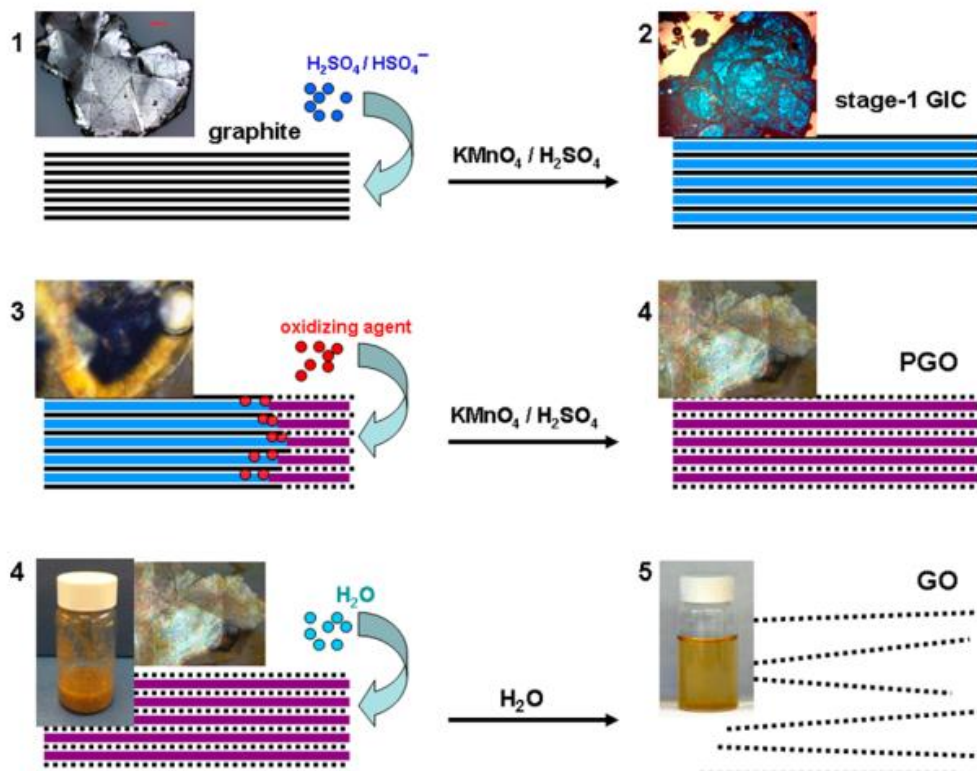


Figura 7: Ilustração para a conversão de grafite bulk em GO. As três etapas representam a formação de dois produtos intermediários (GIC estágio-1 e PGO) e o produto final sendo o GO. As linhas pretas contínuas representam camadas de grafeno; linhas pretas pontilhadas representam monocamadas de GO; linhas azuis largas representam intercalante $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HSO}_4^-$; linhas largas roxas representam uma mistura do intercalante $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HSO}_4^-$ misturado com a forma reduzida do agente oxidante (DIMIEV; TOUR, 2014).

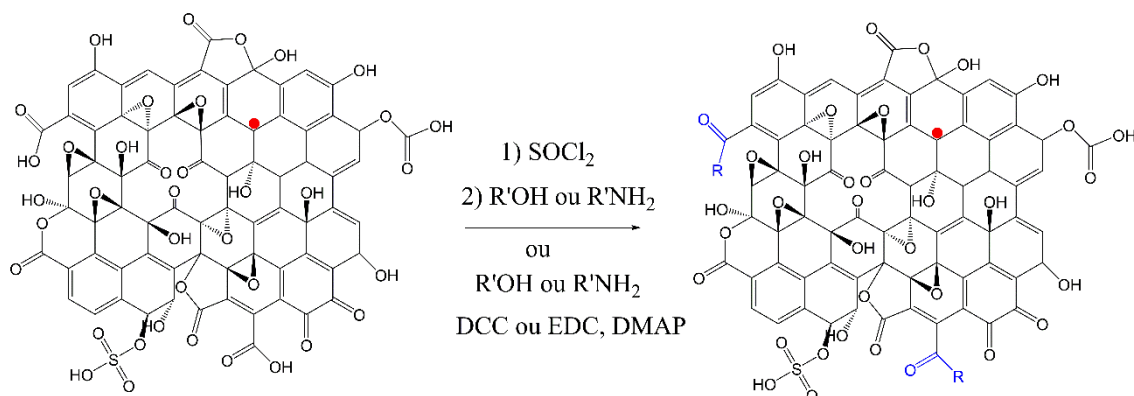
Funcionalizações do GO

Devido aos diferentes grupos funcionais presentes no GO, é possível realizar diversas funcionalizações do material obtendo diferentes propriedades químicas e físicas. Sua funcionalização depende do tipo de aplicação e propriedades desejadas, como por exemplo, condutividade elétrica e térmica, hidrofobicidade e melhorias mecânicas (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014; EIGLER; HIRSCH, 2014; GEORGAKILAS et al., 2012; ZHU et al., 2010)

Nos grupos carboxílicos

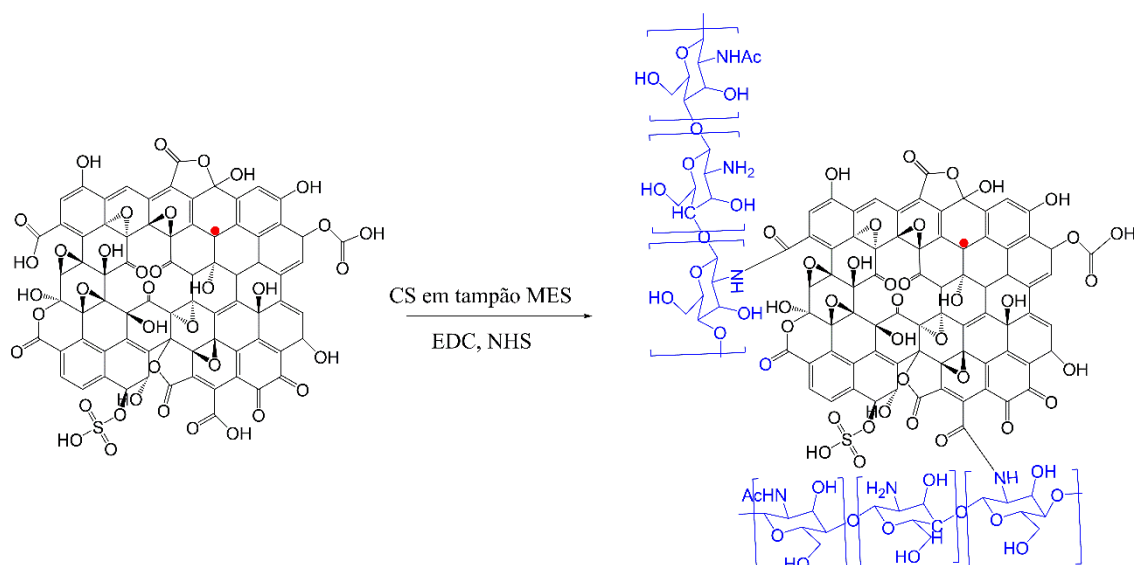
Os grupos ácidos carboxílicos na periferia do material podem ser funcionalizados pelo pré-tratamento com SOCl_2 seguido por uma condensação com um nucleófilo, ou

através do acoplamento de carbodiimida com álcoois ou aminas (Esquema 4) (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014).



Esquema 4: Funcionalização dos ácidos carboxílicos periféricos tanto com SOCl_2 ou uma carbodiimida, seguido por uma condensação com um álcool ou uma amina. Adaptado da referência (Dreyer et al., 2014).

Um exemplo dessa reação é presente no trabalho de Li et al., através da funcionalização do GO com quitosana (CS), para formação de GO-quitosana, possível de ser disperso em água para transporte da droga insolúvel em água camptotecina (BAO et al., 2011). Neste artigo, o reagente ativo EDC foi iniciado para a formação de uma ligação amídica entre GO e CS, formando um intermediário, que foi estabilizado utilizando NHS, apresentado no esquema 5. (BAO et al., 2011). A funcionalização do GO com CS foi comprovada com FTIR, RMN- ^1H e TGA (BAO et al., 2011).



Esquema 5: Síntese de GO-CS. Adaptado da referência (Bao et al., 2011).

Testes de solubilidade foram realizados no GO e GO-CS variando o pH das soluções. O GO-CS foi dispersado uniformemente em meio ácido ($\text{pH} < 7$), porém não foi bem dispersado em meio alcalino ($\text{pH} \approx 11$), e precipita após a sonicação ser interrompida. Esses dados são opostos ao GO, que dispersam bem em meio alcalino e precipitam em meio ácido, como discutindo anteriormente. (BAO et al., 2011).

GO e seus derivados dispersam em água, porém precipitam em condições fisiológicas ricas em sais ou proteínas (BAO et al., 2011). A dispersão de GO-CS e GO

foi testada em tampão fosfato salino e meio de cultura de células, e foi possível observar a dispersão uniforme de GO-CS em ambos os meios, enquanto o GO não obteve esse resultado, logo, a solubilidade de GO-CS é substancialmente melhorada devido à benigna solubilidade do CS com baixo peso molecular (BAO et al., 2011).

Nos grupos álcoois

Assim como grupos ácidos carboxílicos, os grupos álcoois no plano basal do GO podem ser funcionalizados através de acoplamento usando carbodiimida (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). O grupo de Zhang et al funcionalizou o GO utilizando (ácido S-1-dodecil-S'-(α,α' -dimetil- α'' -acético)tritanocarbonato (DDAT) e N-N'-dimetilaminopiridina, para formação de GO-DDAT, em seguida esse produto reagiu com 1,3-diciclohexilcarbodimida (DCC), para resultar o produto final PVK-GO (ZHANG et al., 2011).

Memórias de polímeros podem ser uma tecnologia alternativa ou complementar se tratando de switch liga-desliga em relação às convencionais que possuem problemas de miniaturização (ZHANG et al., 2011). O grupo preparou um filme com alumínio e óxido de índio-estanho (ITO) para fabricação de um dispositivo de memória, e o efeito de memória desse material foi estudado. Foi possível observar que a condutividade do material fabricado é baixa, inicialmente, aumentando gradualmente com a aplicação de uma voltagem negativa. Quando alcança -1,7V, a condutividade aumenta em três ordens de grandeza, indicando que o dispositivo passa do estado off para o estado on (ZHANG et al., 2011). Esse estado on é mantido até a voltagem de +2,6 V, então a condutividade cai para o estado inicial off (processo de apagar). O estado off pode ser lido e reprogramado para o estado on novamente na varredura negativa subsequente. Tal ciclo é um típico “escrita-leitura-apagar-leitura-reescrita” de um dispositivo de memória (ZHANG et al., 2011).

Nos grupos epóxidos

Outra forma de funcionalização do GO é a abertura dos grupos epóxidos presentes no plano basal. A escolha de nucleófilo normalmente é uma amina, incluindo alifáticas, aromáticas ou poliméricas (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). Além disso, carbânions podem ser usados da mesma forma. Swager et al. reagiu GO com sal de malononitrila sódico em THF à 60°C por 24h, para formação de um derivado de óxido de grafeno (GO-malonotrila) (COLLINS; SCHMOIS; SWAGER, 2011).

Para aprimorar a solubilidade do GO-malononitrila, os grupos malononitrilas foram submetidos a mais modificações químicas por reação aniônica alcalina, o GO-malononitrila foi desprotonado utilizando NaH e depois tratado com iodohexadecano ou 1,3-propanosultona, denominados GO-IHexdec e GO-Sultona. O GO-IHexdec, ao contrário do GO-malononitrila pôde ser disperso em diversos solventes orgânicos polares e apolares. O GO-Sultona é imiscível em solventes orgânicos (COLLINS; SCHMOIS; SWAGER, 2011).

Propriedades catalíticas

O GO também pode catalisar diversas reações químicas (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). Algumas observações são importantes para que isso ocorra. Notadamente, GO permite a catalise de algumas reações, enquanto sua forma reduzida (rGO) ou grafite não permitem, podendo assim afirmar que os grupos oxigenados

assumem papel importante nessas reações (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). Realizando oxidações alcoólicas em atmosfera inerte de nitrogênio resultou em conversão mínima, assim como reagir na presença de um inibidor radicalar (por exemplo, hidróxitolueno butilado, BHT), ambos resultados consistentes com processos que incorporam oxigênio molecular como oxidante estequiométrico (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). Finalmente, o GO foi recuperado e reutilizado múltiplas vezes (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014). Juntos, essas informações sugerem que o GO agiu como catalizador, e não como reagente estequiométrico (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014).

Uma série de estudos para reações foram realizadas utilizando GO como catalisador, expandindo a área de carbocatálise (uso de materiais heterogêneos, livres de metais a base de carbono para síntese), as reações ocorrem devido à acidez, basicidade do GO ou ambas (Figura 8) (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014).

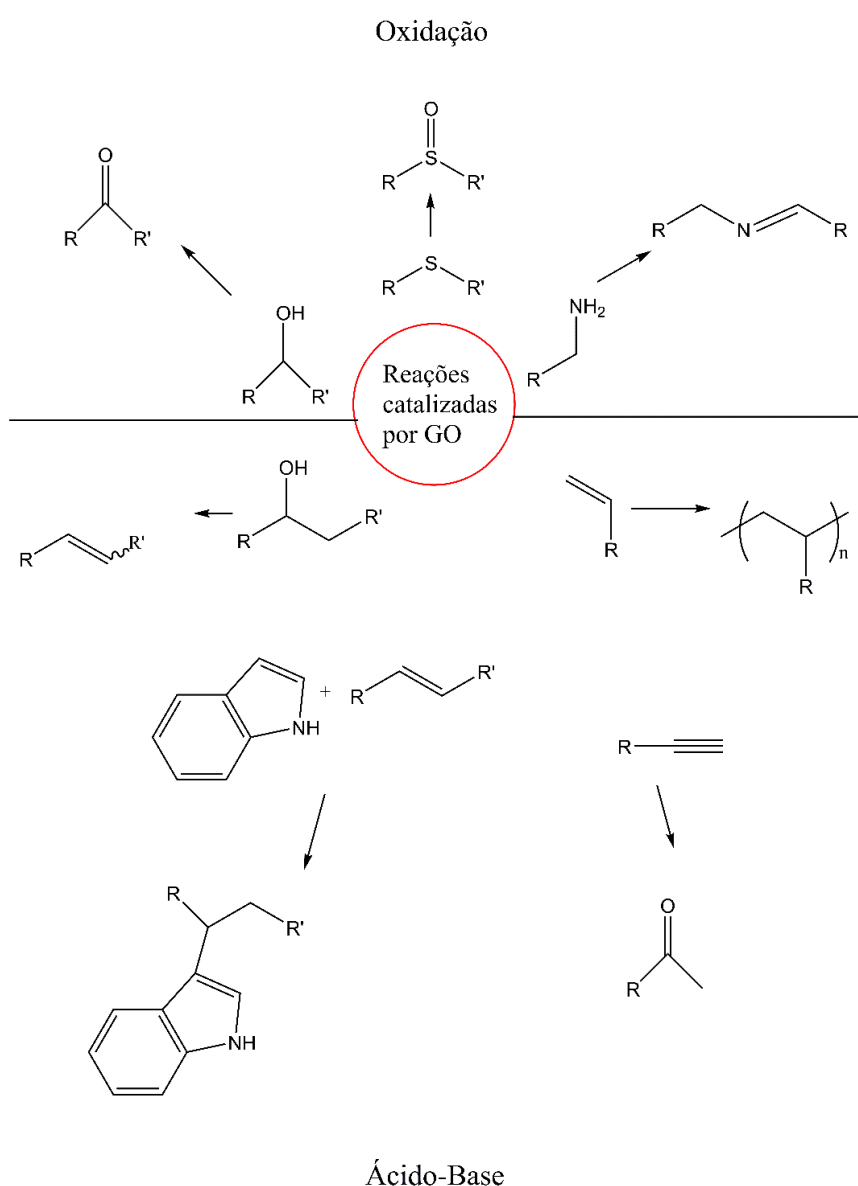


Figura 8: Exemplos de diversas reações catalizadas por GO (adaptado da referência (Dreyer et al., 2014)).

Fluorescência do GO

Até os dias atuais a origem da fluorescência do GO é um assunto controverso (SHANG et al., 2012). O estudo realizado pelo grupo de Shang trouxe essas afirmações baseadas em uma série de dados teóricos e experimentais. Porém, há estudos que associam a fluorescência do GO com pequenos destroços de material altamente oxidado (DREYER; TODD; BIELAWSKI, 2014; ROURKE et al., 2011).

A dependência de ambos, espectro de excitação versus comprimento de onda de emissão (λ_{em}) e espectro de emissão versus comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) foi percebida pela emissão de fluorescência com diferentes λ_{exc} . O máximo de emissão sofre um deslocamento para o vermelho (red-shift) com λ_{exc} , mais pronunciada na região II (525 – 700 nm). Na região I (350-525 nm), o máxima de emissão é praticamente constante. Essa dependência desses dois fatores é indicativa de sistema com múltiplos cromóforos/fluoróforos envolvidos com grupos aromáticos e grupos oxidados (SHANG et al., 2012).

A banda proibida da estrutura obtida pelo grupo por simulações baseadas em resultados de XPS e espectro de absorção é de $\approx 0,6$ eV, encontra-se na Figura 9.

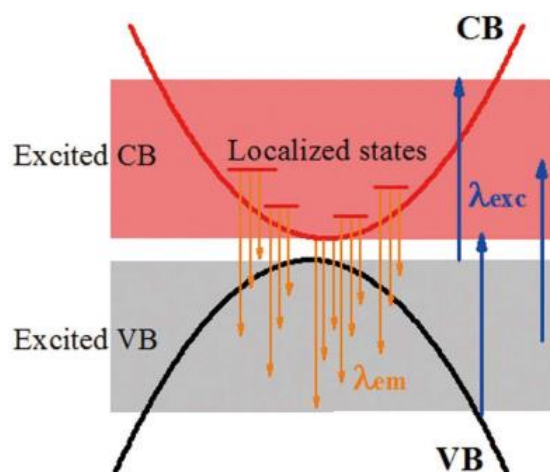


Figura 9: Banda proibida da estrutura obtida pelo grupo (SHANG et al., 2012).

Para a absorção do estado excitado dominante, as transições correspondentes são de CB e de estados localizados próximos até estados excitados mais energéticos (SHANG et al., 2012; ZHENG; WU, 2017). Para a fluorescência observada em $\lambda_{exc} = 400-800$ nm, a origem está relacionada às transições eletrônicas de CB para estados localizados próximos da VB tal como mostrado pelas setas da Figura 9 (SHANG et al., 2012).

Na figura 10 estão representados os níveis de energia dos orbitais quasi-moleculares e os orbitais relacionados à fluorescência do GO. A diferença de energia entre HOMO e LUMO é de quase 0,6 eV, e as regiões gráficas são majoritariamente responsáveis pela sua formação (SHANG et al., 2012). A fluorescência de estados mais altos excitados deve ser levada em consideração, já que a fluorescência observada do GO entre 400 e 800 nm não provém da transição eletrônica LUMO - HOMO (SHANG et al., 2012). Para a emissão próximo à 640 nm, LUMO, L+1, L+2, HOMO e H-1 até H-5 podem ser responsáveis, onde os grupos de átomos correspondentes incluem -C=C- com -C-O-, -C=O e O=C-OH (SHANG et al., 2012). Os níveis L+1, L+2, e H-1 até H-5 são formados

de regiões contendo ambos C=C- e grupos oxigenados, logo, a fluorescência observada é majoritariamente resultado das transições eletrônicas entre regiões não oxidadas -C=C- e o limite das regiões oxidadas. (SHANG et al., 2012).

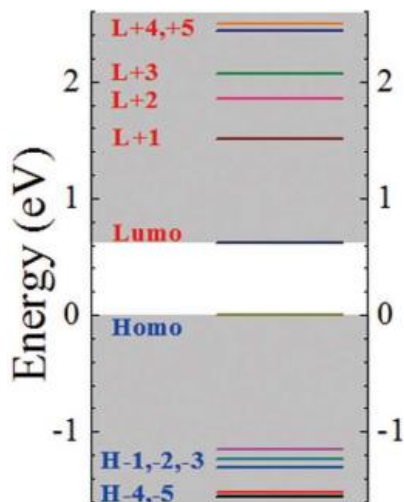
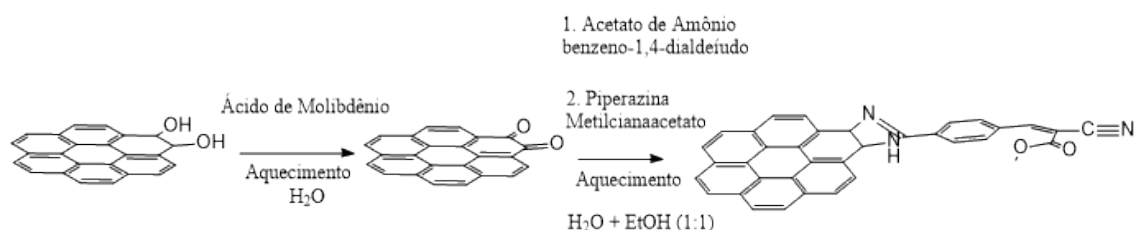


Figura 0: Níveis de energia quasi-molecular dos orbitais do GO.

Resultados experimentais e teóricos sugerem que a fluorescência do GO se dá pela recombinação de elétron-buraco da banda de condução (CB) e estados eletrônicos pertos da banda de valência (VB) (SHANG et al., 2012). Do ponto de vista estrutural, a emissão do GO é predominantemente das transições eletrônicas entre as regiões gráficas do GO e a vizinhança das regiões oxidadas (C-O, C=O e O=C-OH) (SHANG et al., 2012).

Objetivos

Neste trabalho, o objetivo central é a obtenção de um GO modificado com a inclusão de grupos heterocíclicos fluorescentes da classe dos imidazóis. Assim, o GO foi modificado quimicamente, iniciado pela oxidação dos grupos hidroxilas vicinais à orto-quinonas utilizando ácido de molibdênio. Em seguida, as orto-quinonas formadas foram convertidas em benzoimidazol utilizando uma reação de Debus-Radziszewski (MUNOZ; JUNIOR; SILVA, 2014) com os reagentes benzo-1,4-dialdeído e acetato de amônio. E, por fim, uma reação de condensação de Knoevenagel utilizando ciano acetato de metila e piperazina para formação de um novo cromóforo derivado de benzoimidazol no GO contendo grupo retirador de carga. O esquema 6 ilustra a reação global.



Esquema 6: Reação global da síntese de GOK.

Os grupos ceto e ácidos carboxílicos encontram-se predominantemente na borda do material, logo, espera-se que tal modificação introduzam modificações nas propriedades fotofísicas dos micro-flakes, em particular, na intensidade e localização da fluorescência quando comparadas ao precursor GO. O grupo nitrila e éster atuam como aceptores de cargas, enquanto o restante do material atua como doador de carga, portanto, espera-se que os elétrons se locomovam do GO em direção à periferia do produto final, obtendo uma maior fluorescência nesta região.

Materiais e Métodos

Preparação da amostra

As lamínulas 22x22mm foram limpas quimicamente antes das análises, primeiramente elas foram colocadas em um suporte de teflon, submersas em água Milli-Q com detergente neutro incolor, sonicadas por 30 minutos. Após essa etapa, elas foram lavadas com quantidades abundantes de água Milli-Q, para retirar o excesso de detergente. Em seguida, colocadas em solução piranha (ácido sulfúrico concentrado/H₂O₂ 30%), lavadas novamente com água Milli-Q, para retirar todo o ácido residual delas, lavadas com isopropanol HPLC e sonicadas no mesmo solvente por 15 minutos. Após esse procedimento elas foram colocadas em estufa com aquecimento a temperaturas entre 110-180°C. Por último, guardadas no dessecador com sílica gel nova, até serem utilizadas. Antes da utilização das lamínulas elas eram colocadas em um limpador UV com ozônio, da marca Ossila, entre 10-20 minutos para oxidação de qualquer traço de compostos orgânicos.

Após as lamínulas estarem prontas para uso, elas eram colocadas em um spin coater (Ossila), no modo de duas etapas, a primeira etapa com 30 segundos à 5000 rpm e a segunda etapa, 30 segundos à 6000 rpm, para que todo o solvente seja evaporado da lamínula, impedindo formação de gotículas.

Primeiramente, a lamínula recebeu 3 a 5 gotas de solução de L-polilisina (Sigma Aldrich) sob rotação. A superfície vítrea da lamínula pode estar carregada negativamente devido a presença de grupos SiO^- . Considerando que GO e GOK possuem grupos ácido carboxílicos que podem estar dissociados em solução, a interação repulsiva de carga faz com que o material depositado por spin-coating não se distribua bem na lamínula provocando uma auto-agregação elevada. A L-polilisina é uma sequência de lisinas, que são aminoácidos polares com carga positiva em solução aquosa, que quando aplicada sobre a lamínula torna a superfície do vidro neutra, sem carga, facilitando a deposição do GO e GOK sobre a superfície.

O GO e GOK obtido foram dispersados, centrifugado e o sobrenadante foi desprezado dez vezes, para retirar os flakes menores, que atrapalham as medidas de microscopia.

Os espectros de infravermelho das amostras na forma de pó foram obtidos com um espectrômetro FT-IR IRAffinity 1, da marca Shimadzu, no modo ATR. A difração de Raio X foi realizada com a amostra em pó depositada em uma lâmina de vidro, e colocada em um D8 Advance, da marca Bruker.

Os espectros Raman foram obtidos depositando o material em uma lamínula 22x22 mm, utilizando a L-polilisina e spin coater, e posteriormente colocada em cima de uma lâmina de vidro retangular. Foi utilizado um LabHam HR Evolution, da marca Horiba, utilizando laser de 633 nm. Todas as medidas foram realizadas com grade de difração Edge 600 (500nm), 10 scans com tempo de aquisição de 5 segundos.

Para as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram depositadas em uma grade específica para análise de materiais compostos por carbono, o equipamento utilizado foi um JEM2100 LaB6 200kV, da marca JEOL.

Microscopia confocal

Em microscopia confocal, o campo de iluminação é limitado há um único ponto no limite de difração, posicionado no centro dos eixos do microscópio. A varredura de posição se dá movendo à amostra por curtas distâncias, e luz espalhada de outras partes que não do ponto que ilumina a amostra é descartado pelo sistema ótico pela utilização de filtros óticos e uma abertura (*pinhole*) de 50 micrómetros. Assim, o método confocal apresenta vantagens como diminuição de desfoque da imagem devido à luz espalhada, relação sinal-ruído melhorada, e a varredura nas direções x e y da amostra poder ser de área de dezenas de micrómetros e possível inclusão do eixo z.

O comportamento de sistemas individuais ou nanoscópicos possibilita conhecer detalhes microscópicos de cromóforos e suas flutuações (chamada de intermitência) em reatividade local e temporal. Assim podemos por estas técnicas acompanhar a reatividade química de uma única nanopartícula envolvida em um processo de catálise ou fotocatálise (LINO; GEHLEN, 2017). Também pode ser usado como ferramenta para observação de metabólitos fluorescentes gerados por micro-organismos produzindo toxinas em muito baixa concentração (SABATINI; GEHLEN, 2014).

O laboratório do GFM está equipado com equipamentos construídos de microscopia de fluorescência (CHIMENEZ et al., 2014; LAUER et al., 2014;

LENCIONE et al., 2016; LINO; GEHLEN, 2017; SABATINI; GEHLEN, 2014) que possibilitam a aplicação destas novas metodologias.

As imagens de fluorescência em confocal foram obtidas utilizando o microscópio Olympus IX71 com um piezoelétrico (PI, E-710.3CD e P-517.3CD) para escaneamento em escala nanométrica. Foram utilizados lasers com diferentes comprimentos de onda, um Coherent Cube com excitação em 405 nm, um Hübner Cobolt, 473 nm, com pulso contínuo, e por último, um Omicron 473nm, com modo pulsado. Os lasers de excitação foram focados na amostra utilizando uma objetiva Olympus, UPlanFL N 100X.

Espectros de emissão foram obtidos utilizando um espectrômetro *Maya 2000 Pro*, da *Ocean Optics*, acoplado com uma fibra no microscópio. Os decaimentos foram medidos pela técnica e contagem de fótons, utilizando uma placa de contagem (*Becker and Hickl 140*), sincronizada com o laser pulsado 473 nm, com baixa intensidade, da *Omicron*, em frequência de pulsos de 2MHz. Os decaimentos foram analisados utilizando o software FAST (*Edinburgh Instruments*). Os resultados foram obtidos em 40000x40000 nm (equivalente em 40x40 micrómetros) como altura e largura de imagem e 300x300 pixels, e tempo de aquisição de 1 milissegundo por pixel.

Microscopia widefield em TIRF

Imagens de fluorescência no modo campo largo em reflexão interna total (TIRF) foram obtidas em microscópio Olympus IX71, com uma objetiva Olympus UApo N 100X NA 1.49, específica para TIRF. A câmera utilizada para obtenção das imagens foi uma Evolve 512 – Photometrics, operando a temperaturas menores que -80°C. Os resultados foram obtidos em 300x300 pixels, com tempo de aquisição de 7 milissegundos, algumas imagens com aumento de 1,6 X. Para obtenção da fotografia das partículas por contraste foi utilizada uma câmera modelo DCC1240C, Thor Labs. Nas figuras 11 e 12 estão fotografias do sistema de microscopia de fluorescência construídos no grupo.

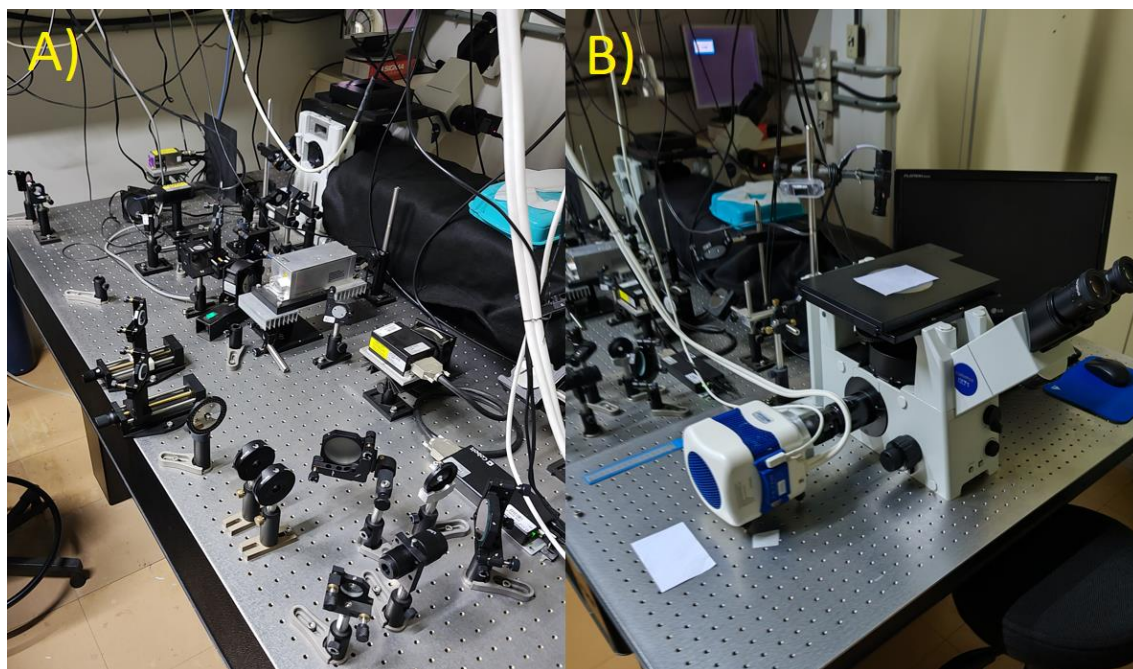


Figura 11: Equipamentos de microscopia de Fluorescência construídos no LFM: A) Lasers utilizados durante o trabalho, e ao fundo, microscópio confocal com linhas de laser de 405 nm, 473 nm, 532 nm CW e 473 nm Omicron e 633 nm Hammamatsu pulsados (100 os FWHM), resolução em passo de 20nm e dois

detectores pontuais APD; capacidade de análise de espectro de emissão e decaimentos em os. B) Microscópio de campo largo (widefield) com linhas para três lasers (Verdi 532 nm, Cobolt/Omicron 473 nm, Cube 405 nm), resolução espacial de 100nm/pixel em imagens de 512x512 pixels, com câmera EMCCD Evolve 512 – Photometrics acoplado na lateral.



Figura 12: Detalhes do microscópio confocal construído com múltiplas capacidades. Linha confocal com dois detectores pontuais tipo APD, IX71 com Piezoelétrico PI, e saída lateral para medidas espectrais.

Síntese do GO

Para síntese do GO foram pesados em torno de 1,5 g de grafite malha 140, Êxodo Científica, dispersado em 55 mL de ácido sulfúrico P.A, êxodo científica, agitado em banho de gelo até todo o grafite dispersar no meio ácido. Ainda no banho de gelo, foram adicionados 6,4 g de permanganato de potássio, Êxodo Científica, lentamente, para que a temperatura não excedesse 20°C. O sistema permaneceu por 30 minutos sob agitação em banho de gelo e, após isso, 20 minutos fora do banho de gelo, à temperatura ambiente.

Após essa etapa, foram adicionados 60 mL de água Milli-Q, lentamente, e o sistema foi aquecido à 95°C, permanecendo nessa temperatura por 45 minutos, em seguida, deixou-se o sistema esfriar até aproximadamente 70°C. Adicionou-se 12 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v), para cessar a reação.

Para finalizar a síntese o material foi filtrado em um funil de Büchner com vidro sinterizados de numeração 2, em seguida, lavado com 120 mL de ácido clorídrico 2 molar, após isso lavagem com 400 mL de água Milli-Q para retirar o excesso de ácido. O GO foi armazenado em dessecador à vácuo com sílica gel nova, para retirar o excesso de umidade da amostra.

Síntese do GOK

A síntese do GOK se deu em duas etapas, a primeiro foi a reação de 0,2g de GO com 0,06g de ácido de molibdênio (Sigma Aldrich) em água Milli-Q com aquecimento em refluxo por 1 hora. Em seguida o material foi filtrado e lavado com excesso de água Milli-Q, guardado no dessecador até o dia seguinte. Após o material estar seco, 0,1g dele foi dispersado em uma mistura 1:1 de água Milli-Q com etanol HPLC (Sigma Aldrich), em seguida adicionou-se 0,13g de benzeno-1,4-dialdeído (Sigma Aldrich) e 0,3g de acetato de amônio (Sigma Aldrich), e aqueceu-se o sistema à 65°C em refluxo por 3 horas. Após esse tempo, foi adicionado no mesmo balão 1,2g de ciano acetato de metila (Sigma Aldrich) e 0,07g de piperazina (Sigma Aldrich) em aquecimento à 65°C por mais 1 hora.

Em seguida o material foi filtrado, lavado com água Milli-Q e com etanol para retirar os reagentes não consumidos e guardado em dessecador com sílica gel.

Resultados e Discussão

GO

Caracterização do GO

Foi realizada medidas de fotometria de chama na amostra de GO para quantificar a quantidade de manganês residual presente na amostra. O resultado aponta 0,1171 mg.Kg⁻¹, com R² = 0,93, indicando uma quantidade muito baixa de Mn residual.

O espectro de UV-Vis do GO foi obtido com sua dispersão em água Milli-Q e está representado na Figura 13. O espectro está condizente com o resultado publicado por Shang et al, O pico principal em ~231 nm é proveniente da transição $\pi-\pi^*$ das ligações C-C e C=C nas regiões hibridizadas em sp², e o ombro em ~303 nm se forma devido às transições n- π^* das ligações C=O nas regiões hibridizadas em sp³ (MANORATNE; ROSA; KOTTEGODA, 2017; SHANG et al., 2012).

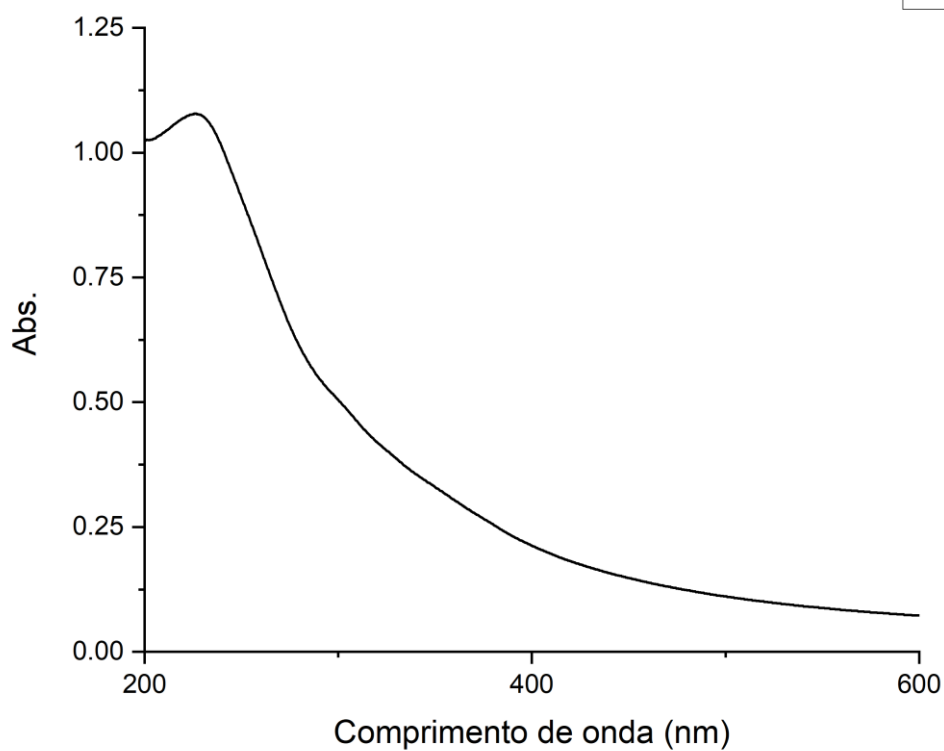


Figura 13: Espectro UV-Vis do GO.

O resultado do espectro de FTIR-ATR do GO preparado está representado na Figura 14. O espectro indica a presença de estiramento O-H (banda larga entre 3600 – 3000 cm^{-1} , devido aos grupos hidroxilas e ácidos carboxílicos. As bandas em 1716 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} e 995 cm^{-1} , indicam a presença de C=O, C=C e C-O-C, respectivamente, como descrito na literatura (CHEN et al., 2013; COLLINS et al., 2011; EIGLER et al., 2013).

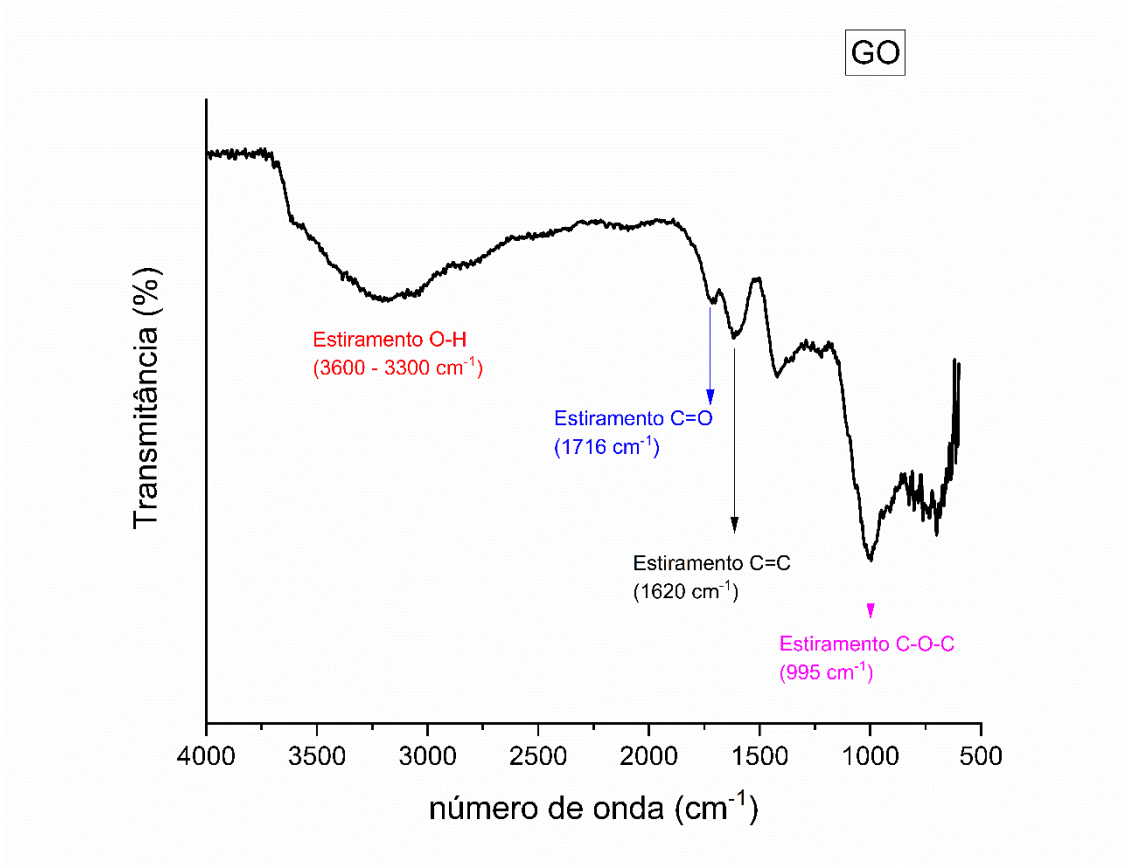


Figura 14: Espectro FTIR-ATR do GO.

Os espectros Raman foram feitos de diferentes flakes, porém foram selecionadas flakes menos agregados. O perfil de flake selecionado encontra-se na Figura 15a, enquanto o espectro do ponto de flake está presente na Figura 15b. Não houve diferenças do espectro Raman significativas entre um flake e outro, logo é possível generalizar para todos os flakes escolhidos o espectro representado na figura 15.

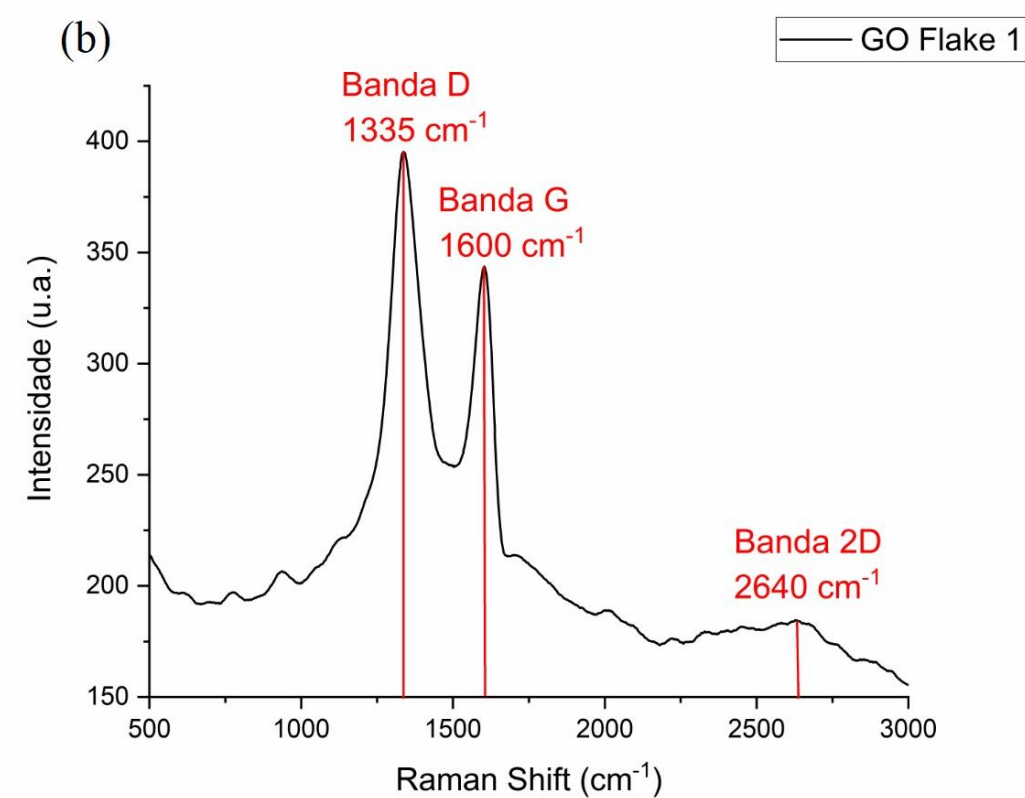
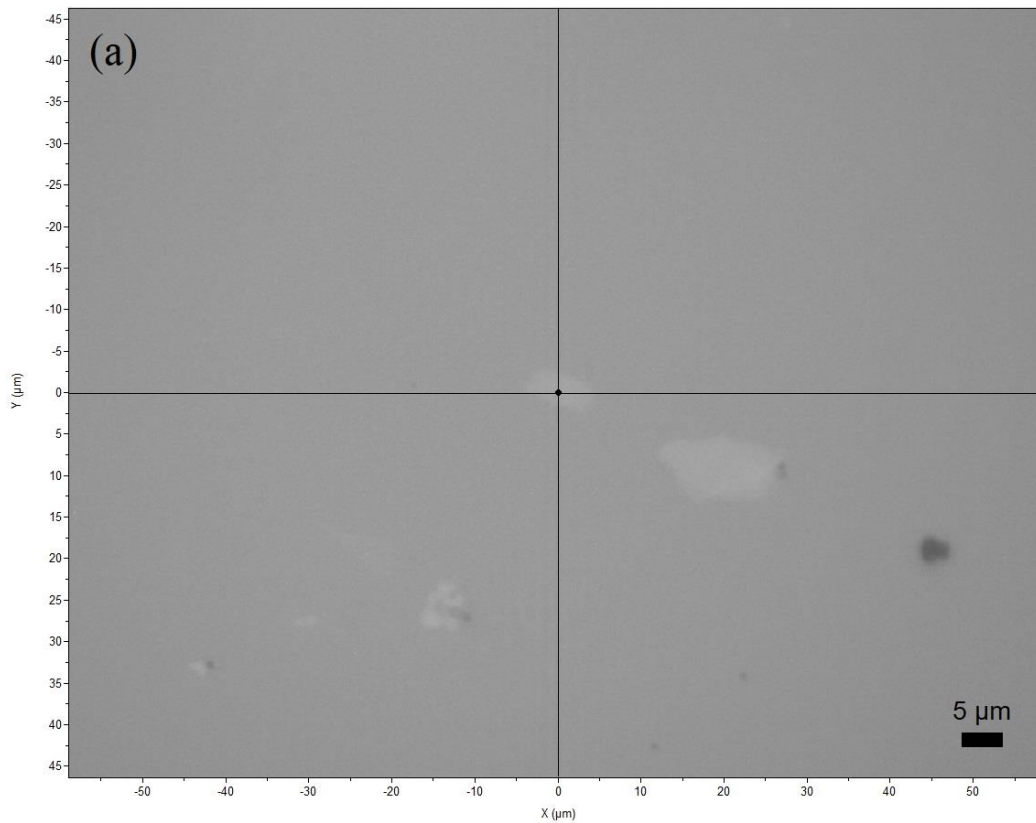
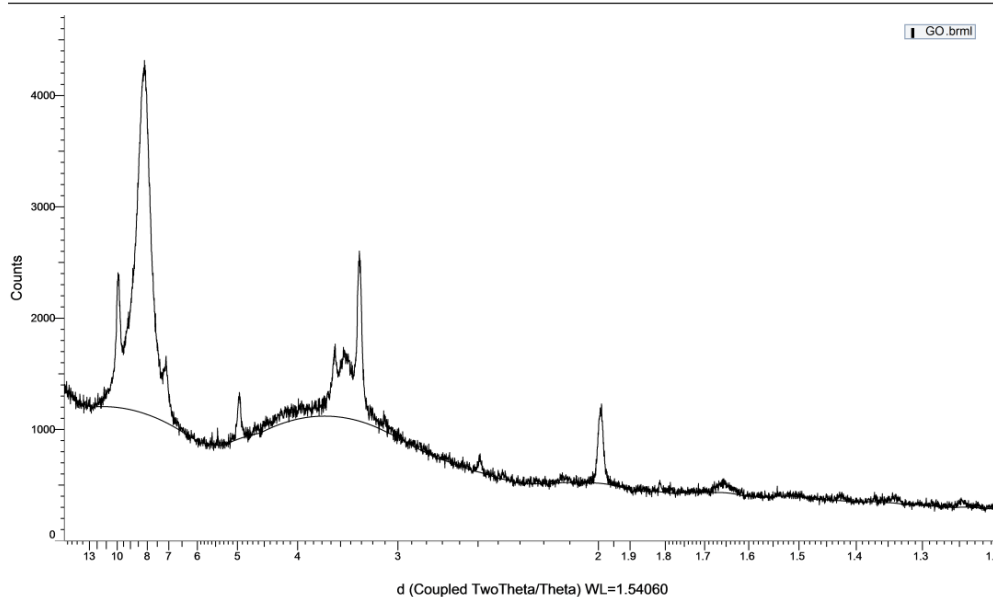


Figura 15: Raman obtido com comprimento de onda de excitação de 633nm (a) foto do flake de GO seleccionado para obter espectro, a barra de dimensão representa 5 micrometros. (b) espectro Raman do ponto do flake obtido de GO.

A banda G em 1600 cm^{-1} representa os modos vibracionais em fase da região do plano basal, enquanto a banda D em 1335 cm^{-1} é causada pelos defeitos de ponto do material. A relação I_D/I_G pode ser usada para avaliar a distância entre os defeitos do GO, ou seja, quanto do material possui defeitos de ponto. Como a síntese realizada foi o método de Hummer modificado, há mais defeitos na estrutura, ou seja, o plano basal apresenta muitos defeitos de ponto, que está condizente com a literatura (BOUŠA et al., 2013; BRISEBOIS; SIAJ, 2020; CHEN et al., 2013; KUDIN et al., 2008). A banda 2D é a segunda ordem da banda D, está presente em aproximadamente 2640 cm^{-1} (EIGLER; DOTZER; HIRSCH, 2012; ZHU et al., 2010).

Os difratogramas de grafite e GO foram obtidos, e estão representados na figura 16.

Commander Sample ID (Coupled TwoTheta/Theta)



(Coupled TwoTheta/Theta)

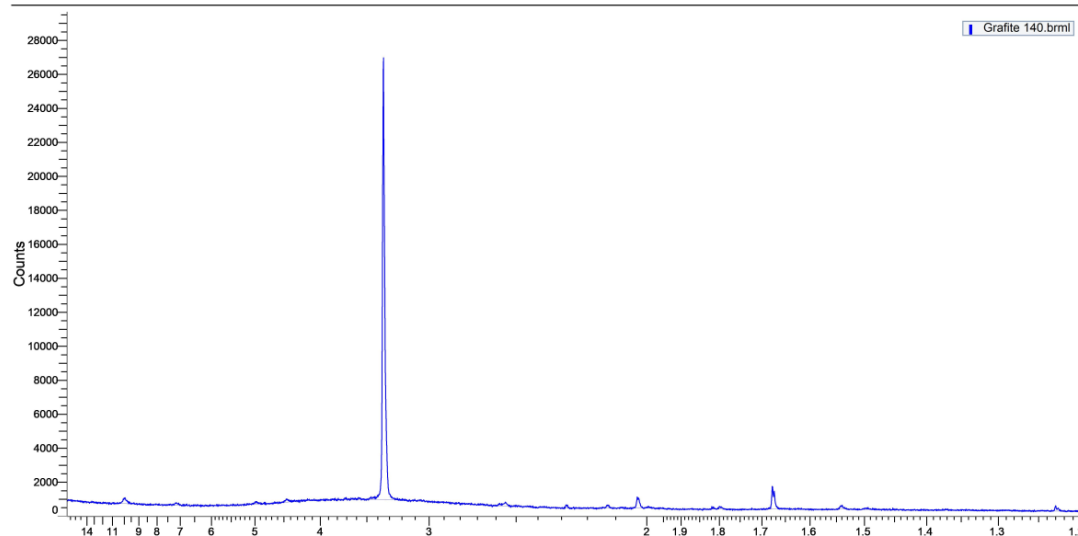


Figura 16: XRD dos materiais grafite malha 140 (azul) e GO (preto).

O pico de difração (002) do GO encontra-se em $d \approx 8,5 \text{ \AA}$, indicando a distância entre camadas de GO, e o pico de difração (10) em $d \approx 2 \text{ \AA}$ indica a ordem de curto alcance em camadas de GO sobrepostas uma sobre a outra, além de ainda estar presente o pico de grafite 002 em $d \approx 3,3 \text{ \AA}$. Em $d \approx 1,68 \text{ \AA}$ encontra-se o pico de difração 004 do grafite, os resultados estão condizentes com a literatura (STOBINSKI et al., 2014a, 2014b).

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do GO foram obtidas, tendo como objetivo observar a borda do material, a figura 17 apresenta uma parte de um flake de GO.

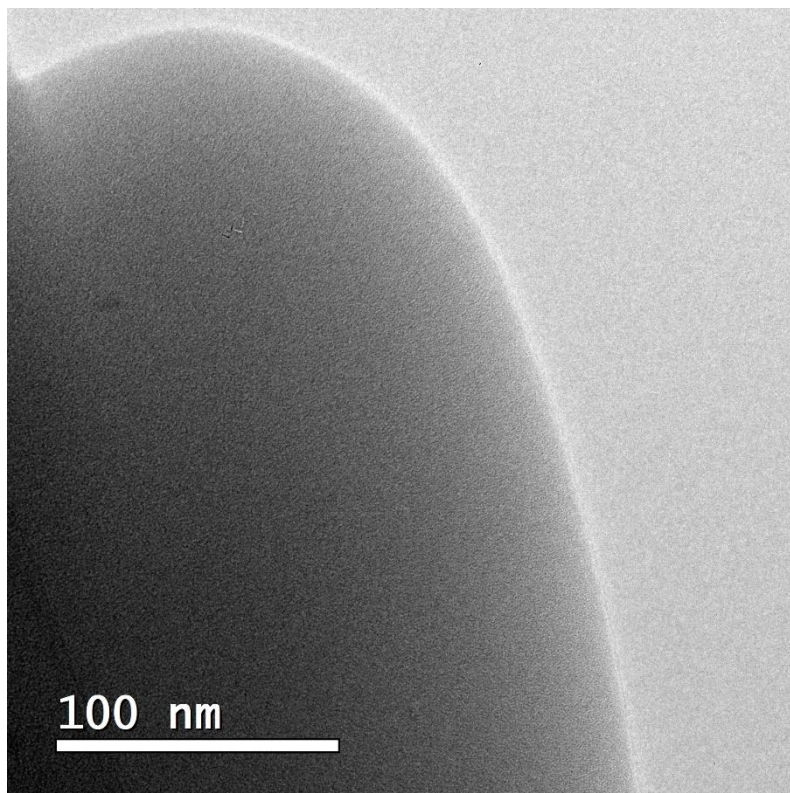


Figura 17: Imagem TEM de um flake de GO, focado na borda do material. A barra indica uma distância de 100 nm.

Microscopia do GO

Confocal

Para as imagens de microscopia de fluorescência, foram selecionados flakes menos aglomerados, apresentando tons mais claros. Na figura 18 estão representados flakes analisados e suas respectivas fotos por contraste iluminando o flake com uma lâmpada comercial por cima.

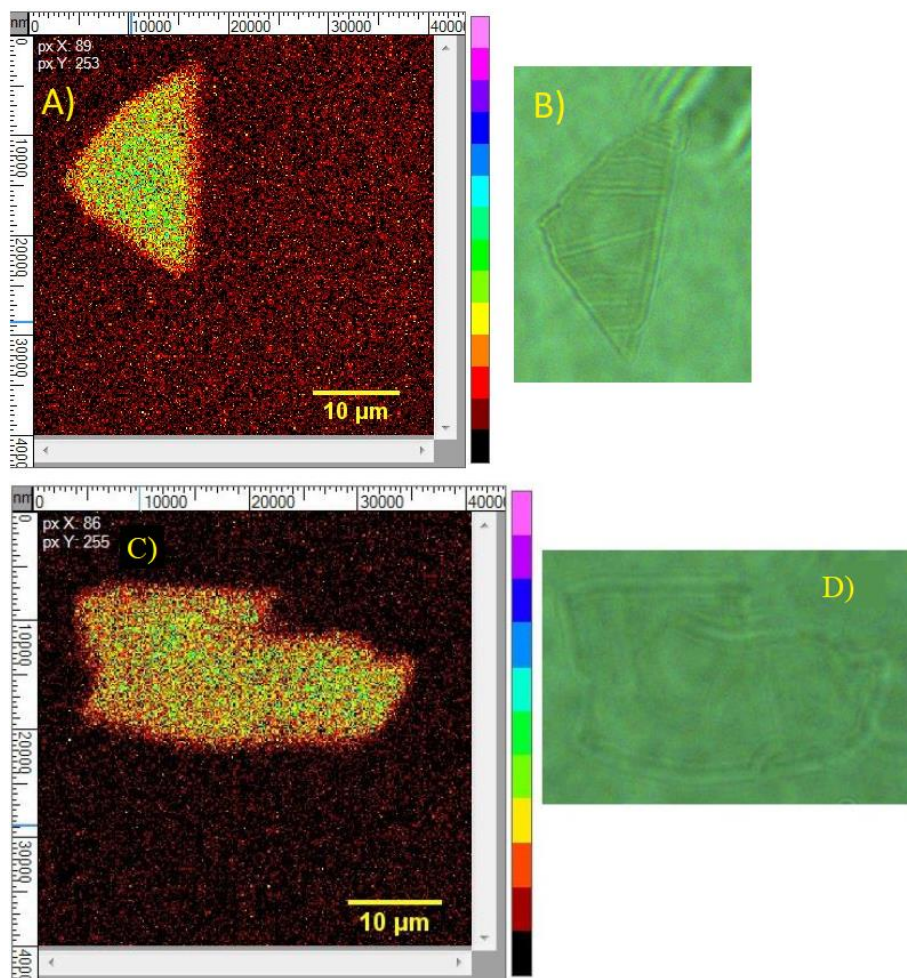


Figura 18: Imagens confocal (a,c) de um flake de GO analisado em 405 nm com 15 mW de potência e filtro de 500nm, para reduzir sinais de espalhamento, imagens obtidas utilizando área de varredura de 40000x40000nm e uma resolução de 300x300 pixels, utilizando Z inicial de 150 nm. A barra corresponde a 10 μm de tamanho. Imagens (b,d) são fotos dos flakes utilizando câmera modelo DCC1240C.

Com esses resultados é possível observar que o GO fluoresce em toda sua extensão com intensidade similar. Para complementar esse resultado foi feito um mapeamento 3D da fluorescência, apresentado na Figura 19.

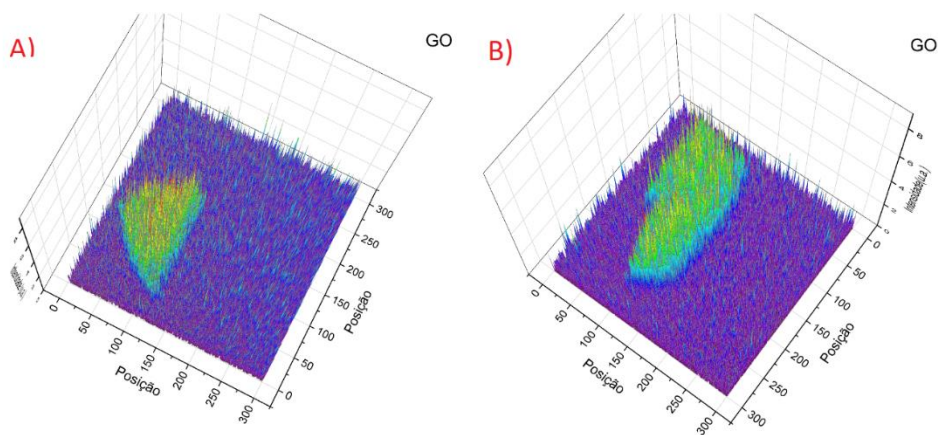


Figura 19: Mapeamento 3D da fluorescência do GO utilizando Origin. A) Flake A da figura 18. B) Flake B da Figura 18.

Também foram realizadas medidas de confocal utilizando laser 473 nm, apresentadas na Figura 20. Podendo observar, novamente, que a fluorescência do flake de GO se dá de forma bem similar ao longo de toda a sua área. Nota-se regiões com intensidade superior, mas dispersas em uma área mais central.

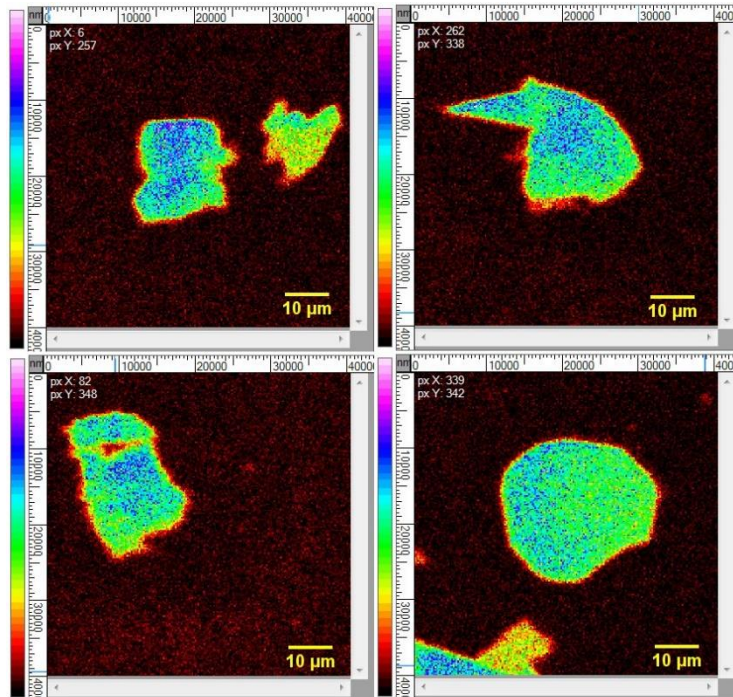


Figura 20: Confocal de GO utilizando laser 473 com 15 mW de potência e dicróico 473 + 532 nm, sem filtro de 500nm. Área de varredura de 40000x40000nm e resolução de 200x200 pixels.

O Mapeamento 3D de fluorescência dos flakes da figura 20 também foram feitos, e encontra-se na figura 21.

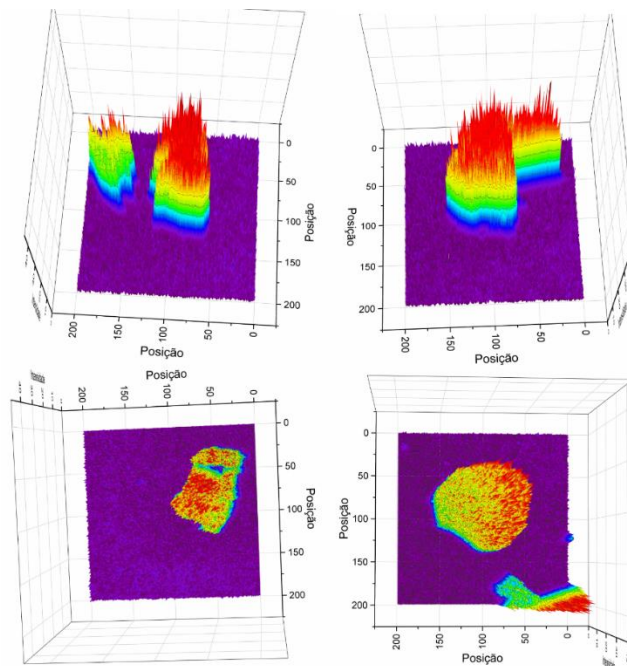


Figura 21: Mapeamento 3D da fluorescência dos Gos da figura 19 utilizando o Origin.

Espectros de emissão foram coletados e realizou-se uma média dos valores obtidos para montar apenas um espectro, apresentado na Figura 22.

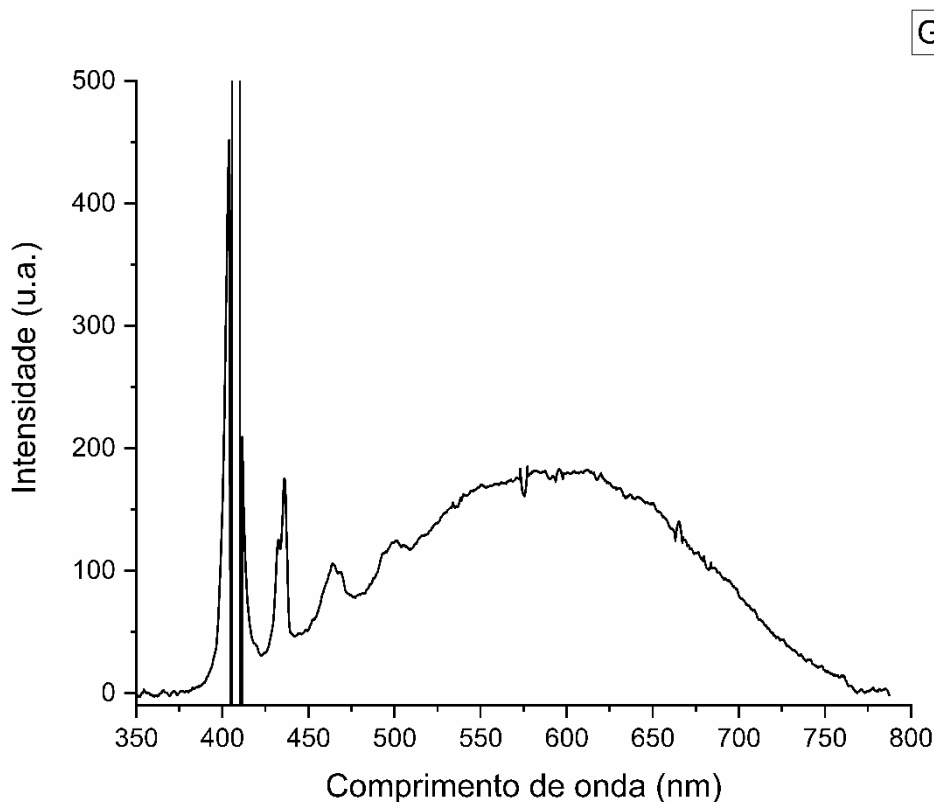


Figura 22: Espectro do GO utilizando laser Cube 405 nm, com potência de 20 mW, no software Spectra-Suite com tempo de aquisição 600 ms e 10 scans. A imagem apresenta 19 espectros que foram somados para obter uma média, com 150 pontos de smooth, utilizando o software Origin.

O máximo do espectro de emissão encontra-se em aproximadamente 600 nm, condizentes com o resultado publicado por Shang et al (SHANG et al., 2012). Novamente, é possível observar o pico em 405 nm devido ao laser utilizado e seu Raman em aproximadamente 440 nm.

O decaimento de 8 flakes de GO foram analisados, realizou-se uma média dos tempos de vida e valores de peso das componentes para dar origem à Tabela 2. Utilizando a Equação 1 para determinar o tempo de vida normalizado. Este resultado é de um tempo de vida médio 0,3 ns (calculado usando a equação 1) que corresponde a um decaimento bem rápido de 300 ps. A figura 23 apresenta um decaimento típico de GO.

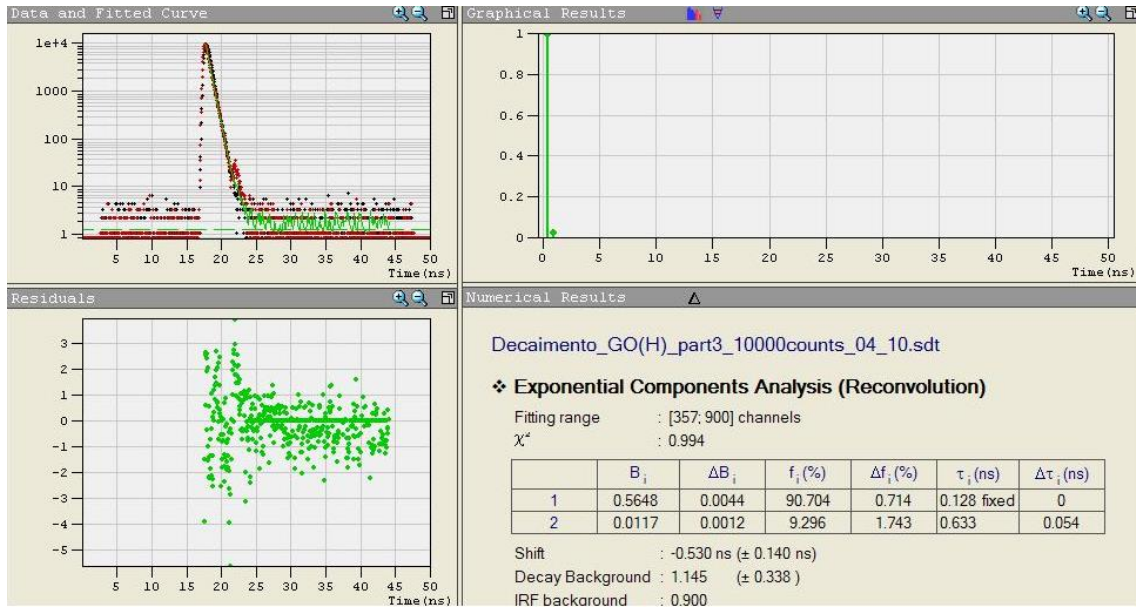


Figura 23: Decaimento do GO utilizando o software Fast. Decaimento biexponencial.

Tabela 2: Valores de tempo de vida e peso das duas componentes de decaimento do GO

τ_1 (ns)	B_1	τ_2 (ns)	B_2
0,130	94,40	0,777	5,61

$$\langle \tau \rangle = \frac{b_1 \cdot \tau_1^2 + b_2 \cdot \tau_2^2}{b_1 \cdot \tau_1 + b_2 \cdot \tau_2}, \text{ onde } b_1 = \frac{B_1}{B_1 + B_2} \text{ e } b_2 = \frac{B_2}{B_1 + B_2} \quad 1$$

Widefield

As imagens de microscopia de campo largo (*widefield*) foram realizadas em amostras de GO dispersados em água, obtendo uma imagem SOFI (*Stochastic Optical Fluctuation Image*) de segunda ordem, ou seja, uma imagem que analisa as flutuações de fluorescência emitidas pelos diversos fluoróforos para reconstruir a imagem com uma resolução superando o limite de difração. Novamente, foram selecionados flakes menos aglomerados para as análises. A Figura 24 apresenta alguns flakes de GO analisados no microscópio.

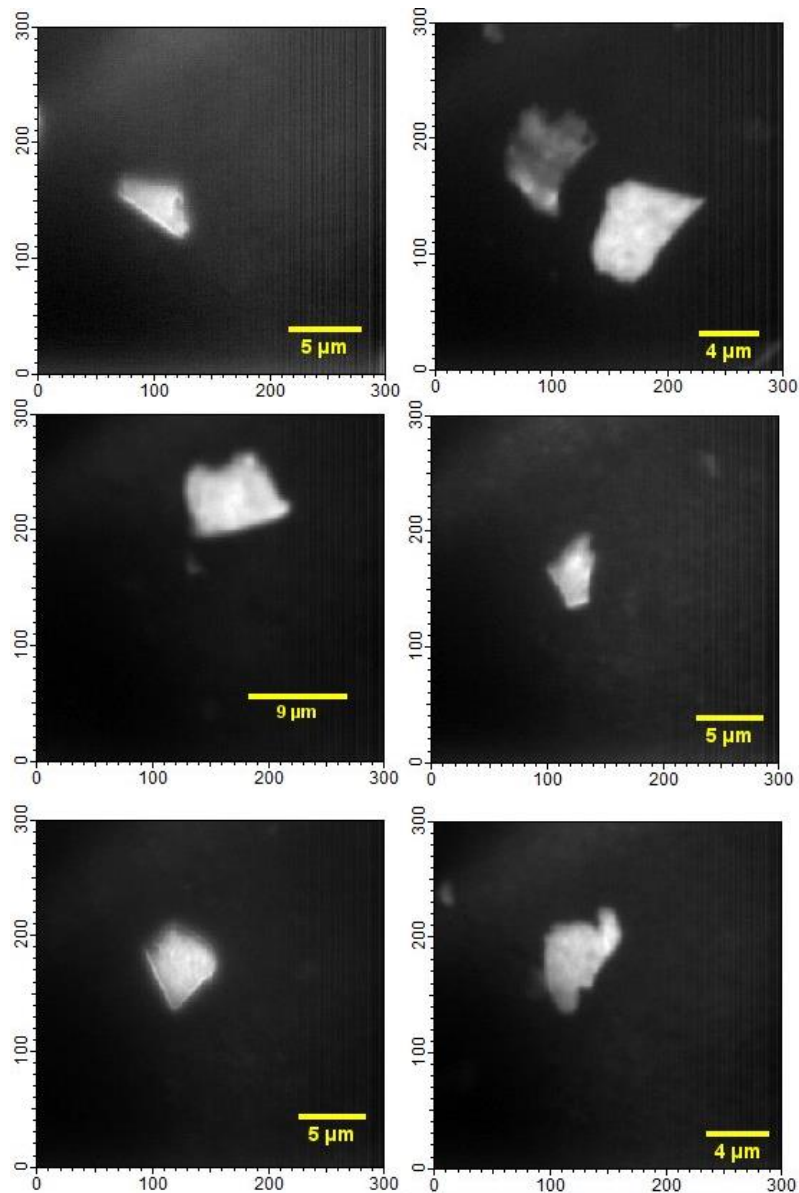


Figura 24: Imagens SOFI (*Stochastic Optical Fluctuation Image*) de segunda ordem obtida pelo software Igor de 6 flakes diferentes, obtidas com laser Cube 405 nm, potência nominal de 20 mW, área de varredura de 300x300 pixels, com aumento 1,6x por 7ms de tempo de aquisição. Barra de tamanho varia conforme flake.

GOK

Caracterização do GOK

As mesmas análises feitas no GO foram realizadas no GOK. A Figura 25 apresenta o espectro UV-Vis do material. É possível notar uma diferença considerável dos espectros de UV-Vis dos materiais, sendo que o GOK possui banda bem estruturada na região entre 300 – 400 nm proveniente das introdução de um benzoimidazol substituído.

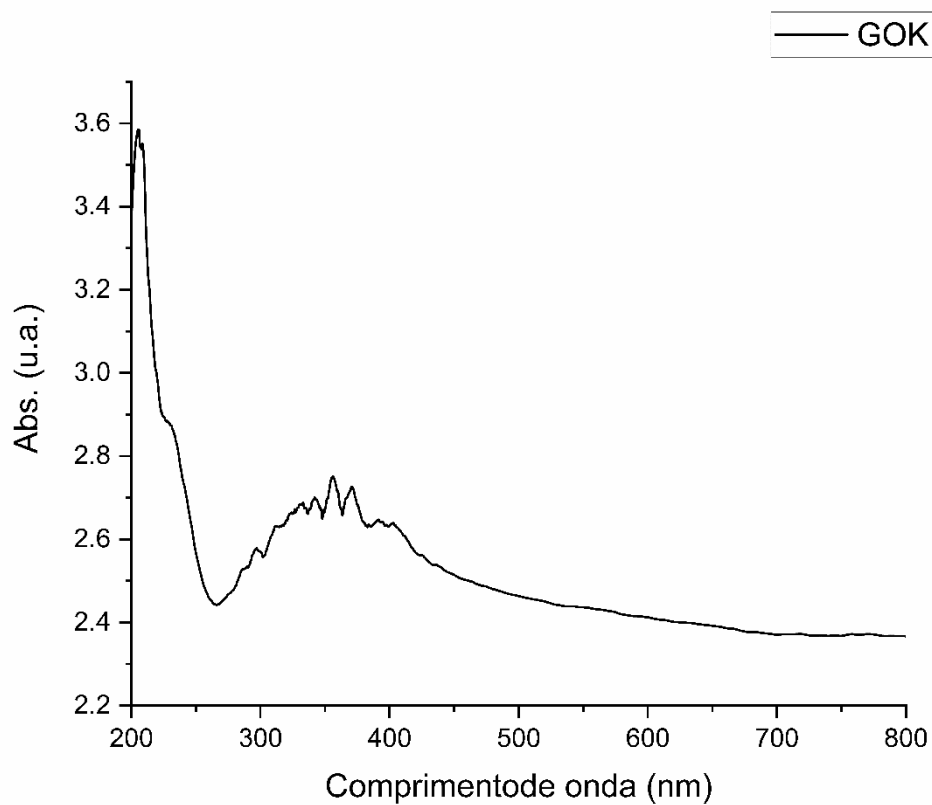


Figura 25: Espectro UV-Vis de GOK.

O espectro de FTIR-ATR do GOK encontra-se na Figura 26. O estiramento CN de nitrila (2218 cm^{-1}), estiramento C=O éster (1733 cm^{-1}), indicam a modificação que ocorreu após a condensação de Knoevenagel, enquanto o estiramento C-N de aminas aromáticas em 1261 cm^{-1} apresenta a formação de imidazol. Estas bandas são ausentes no GO, vide figura 27.

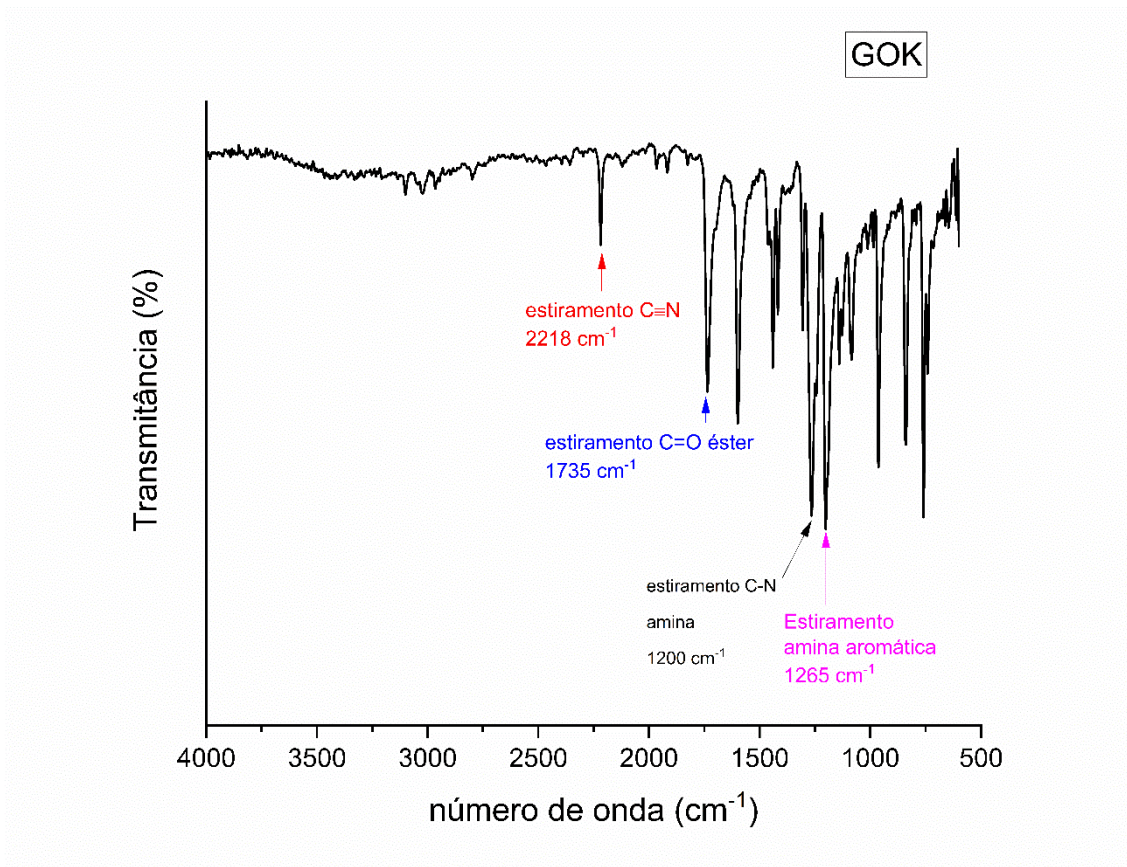


Figura 26: Espectro FTIR-ATR de GOK.

O espectro de emissão dos flakes de GOK foi obtido, apresentado na figura 27 apresentando uma emissão máxima em aproximadamente 520 nm, concordante com resultados de compostos semelhantes ao GOK, que encontram-se na Figura 28, porém sem o material GO (GEHLEN et al., 2020). Esses materiais são semelhantes pois há a presença de transferência de carga intramolecular (ICT), ou seja, um grupo doador de elétrons, que são os anéis aromáticos e imidazol, e um grupo aceptor de elétrons, que são a nitrila e éster. O material GOK apresenta uma mistura de grupos com aldeídos que não foram totalmente substituídos pela reação de Knoevenagel, por isso seu espectro é uma soma dos espectros de ciano acetato (E)-2-(4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzildieno) de metila e (4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzoaldeído). Além disso há um pico em 405nm devido ao laser utilizado.

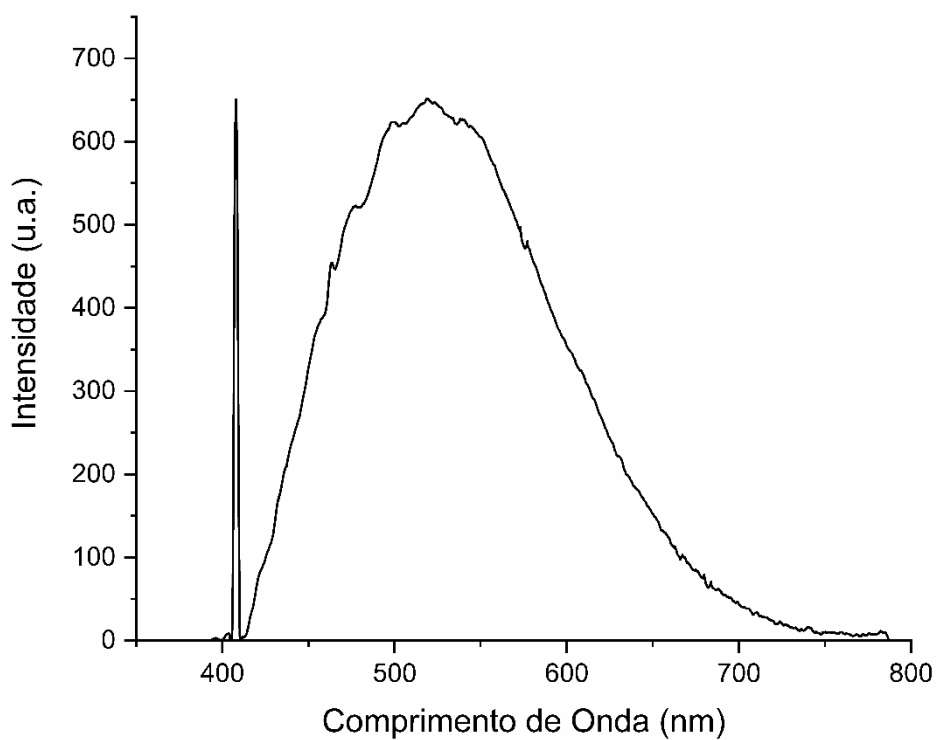


Figura 27: Espectro de emissão médio de diferentes flakes de GOK em 405 nm.

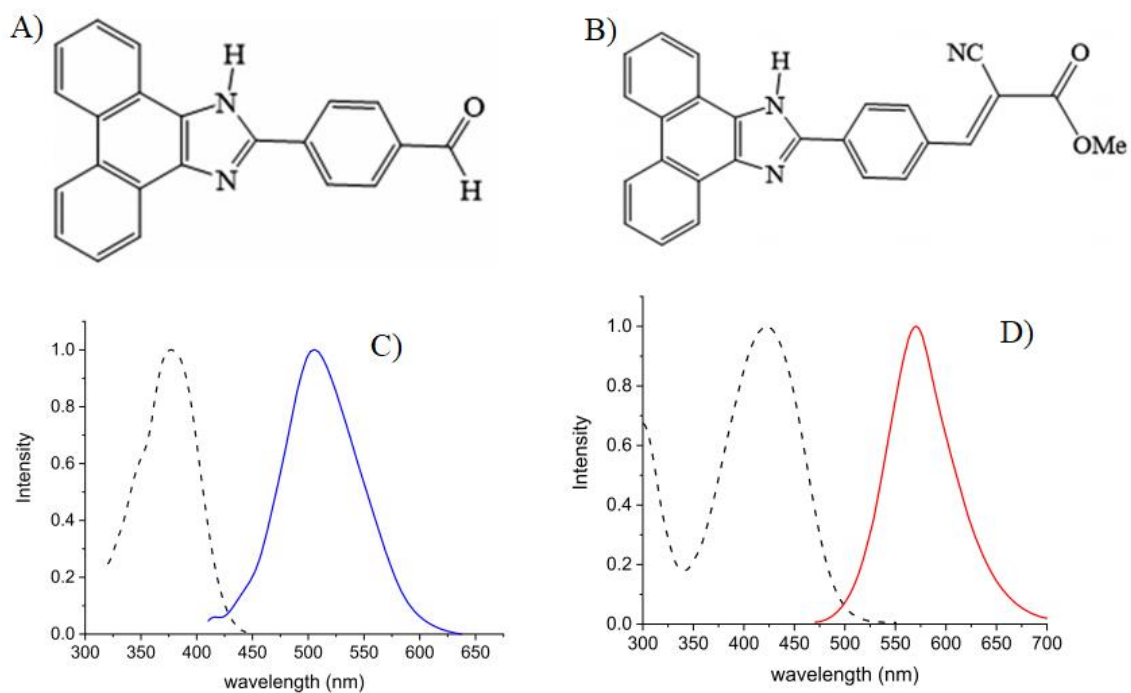


Figura 28: Informações sobre moléculas que estão presentes no GOK. a) Estrutura do (4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzoaldeído) b) Estrutura do (E)-2-(4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzildieno) de metila. C) Espectro de emissão do (4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzoaldeído). D) Espectro de emissão do (E)-2-(4-(1H-fenantrol[9,10-d]imidazol-2-il)benzildieno) de metila (Gehlen et al., 2020).

O difratograma de pó de GOK apresenta alguns picos semelhantes ao do GO (vide figura 16), como o pico de difração (002), em $d \approx 8,5\text{\AA}$. O pico de difração 002 do grafite em $d \approx 3,3\text{\AA}$. E o pico em $d \approx 2\text{\AA}$ que representa o pico de difração (10) do GO. O difratômetro está apresentando na figura 29.

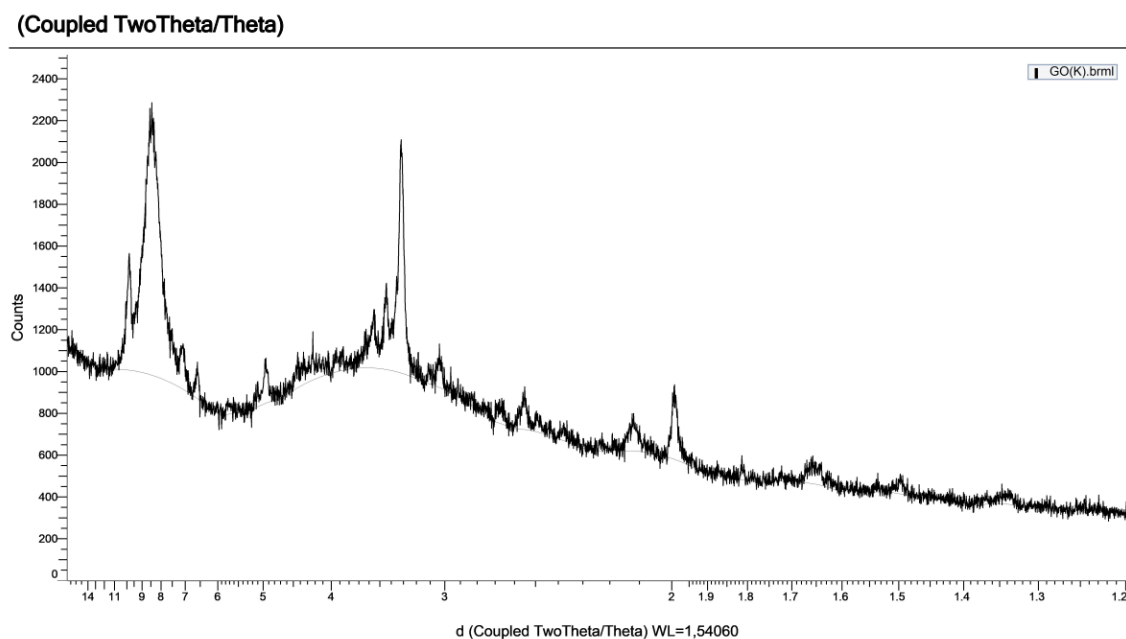


Figura 29: XRD do GOK.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de GOK também foram obtidas e estão presentes na figura 30. A presença de regiões escuras na imagem aponta regiões amorfas ou sem orientação no material, o que indica que ocorreu uma reação química que espalha os elétrons de uma forma mais intensa.

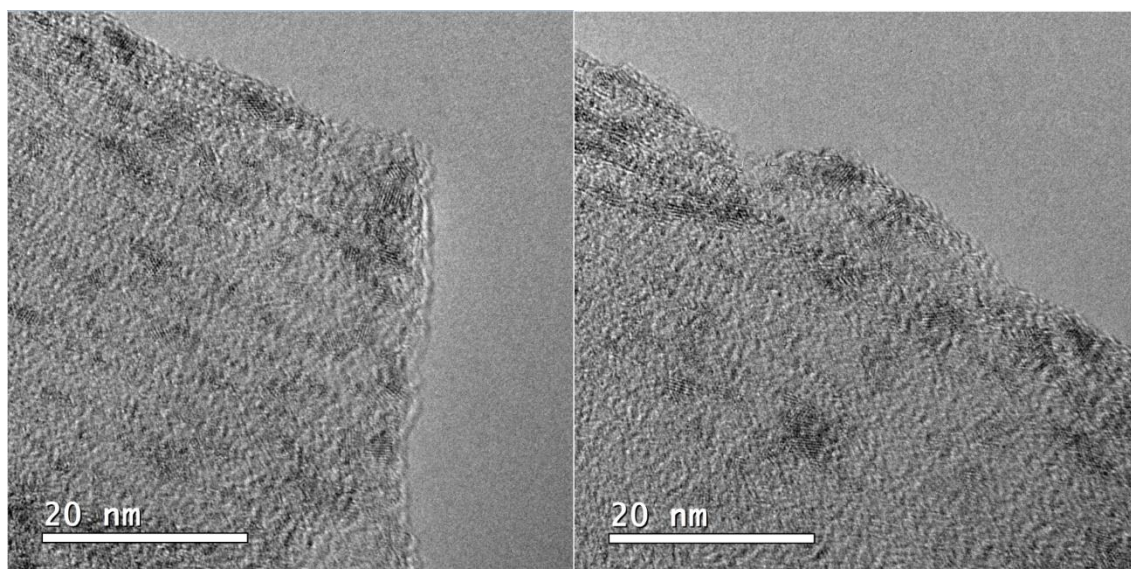


Figura 30: Imagem TEM em modo *brightfield* de dois flakes de GOK. A barra representa uma distância de 20 nm.

O Raman de GOK também foi obtido e está apresentado na figura 31. É possível notar a diferenças do espectro do GOK e GO (vide figura 22), há a presença de um pico

de anéis aromáticos em 1593 cm^{-1} , e um pico fraco de nitrila em 2218 cm^{-1} , correspondente aos grupos orgânicos introduzidos pelas reações descritas.

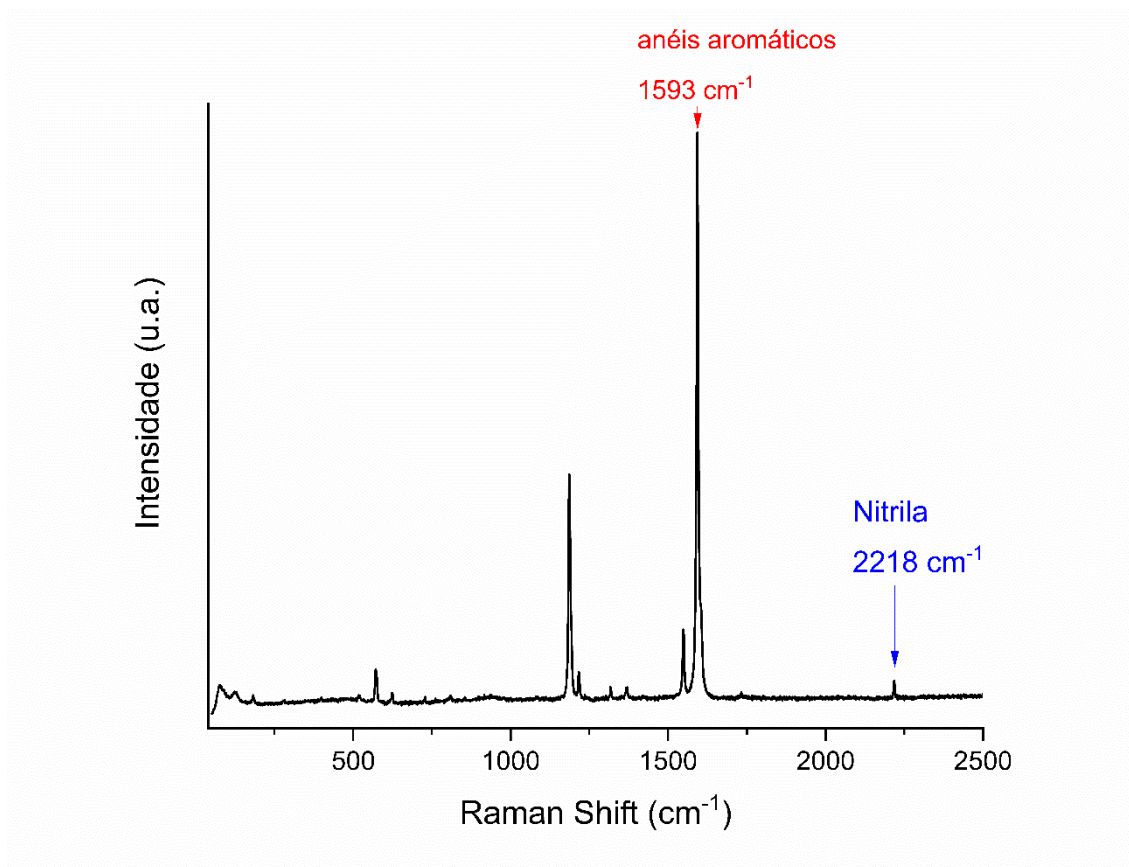


Figura 31: Espectro Raman de GOK. Obtido em 633nm.

Microscopia do GOK

Confocal

Imagens confocais foram obtidas para o GOK, e estão apresentadas na Figura 32. É possível observar uma maior emissão de fluorescência nas bordas do material, indicando a presença de grupos funcionais ou cromóforos de maior rendimento de emissão.

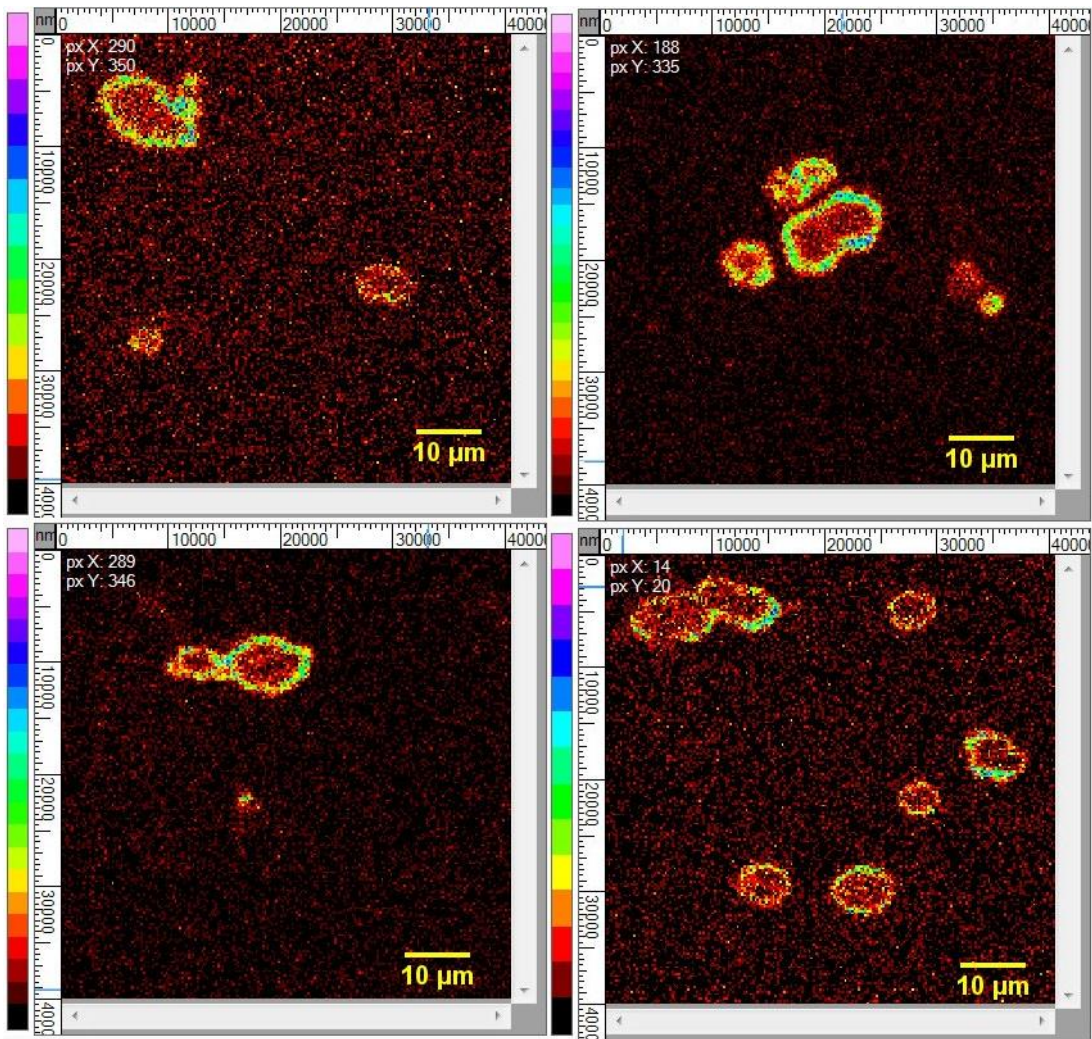


Figura 32: Imagens confocal de 4 flakes de GOK obtidas com laser 405 nm com potência nominal 15 mW, com uma área de varredura de 40000x40000 nm, e resolução de 200x200 pixels.

Foi feito um mapeamento 3D de fluorescência nos flakes da Figura 32, que está apresentado na figura 33. Por esse mapeamento é possível observar melhor ainda a maior intensidade de fluorescência na borda do material.

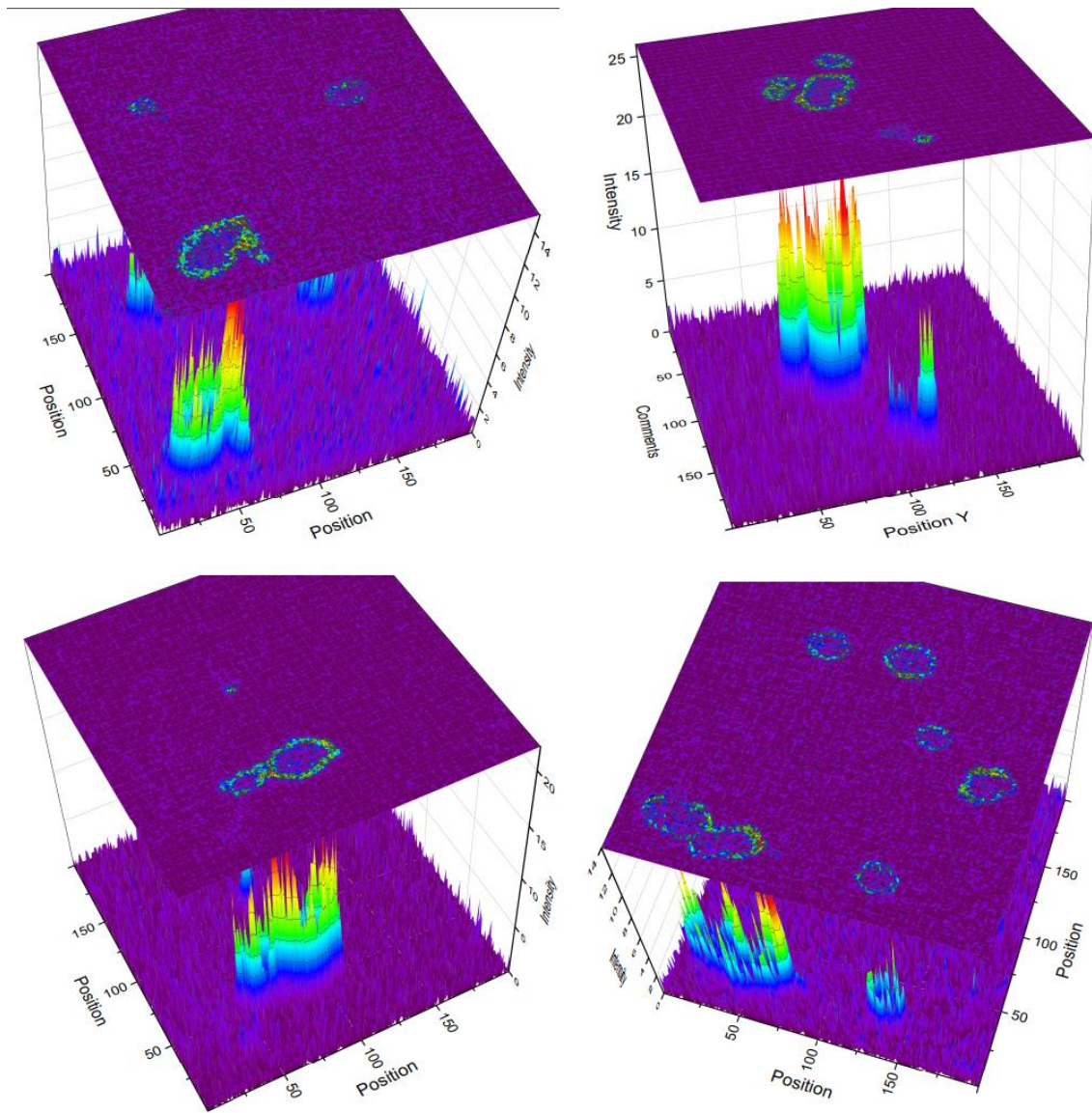


Figura 33: Mapeamento 3D de fluorescência de flakes de GOK, com maior emissão na borda do material.

O decaimento dos flakes de GOK foram medidos, apresentando duas componentes, e tratou-se esses dados da mesma forma como os de GO foram tratados, dando origem à Tabela 3. Após isso, utilizou-se a Equação 1 para obter o tempo de vida média do GOK, que é de 4.40 ns. O decaimento típico de GOK está representado nas figuras 34 e 35.

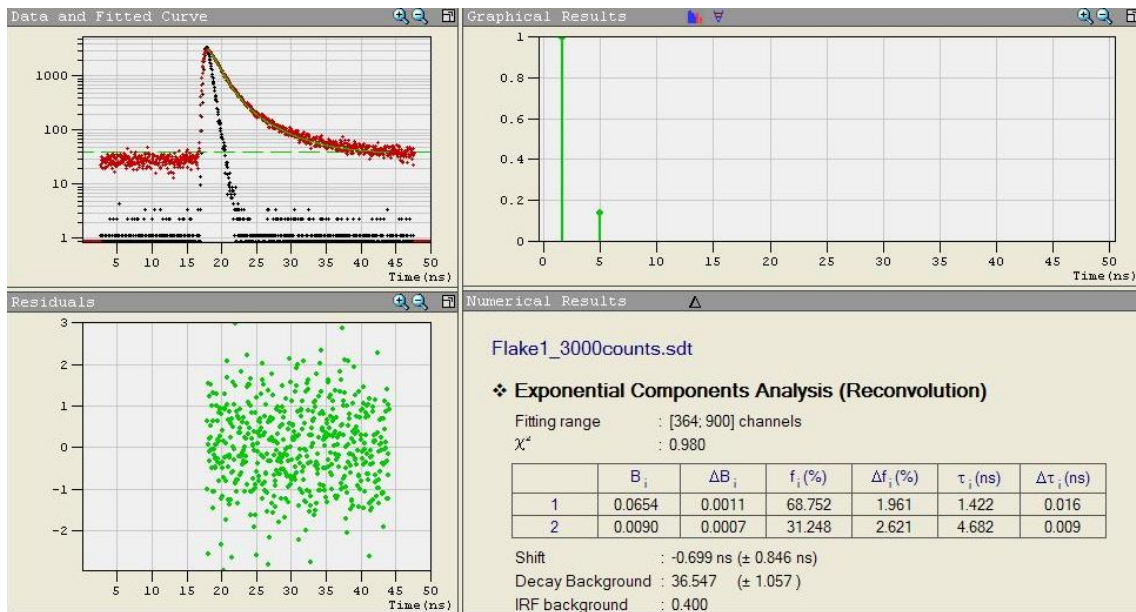


Figura 34: Decaimento do GOK utilizando o software Fast. Decaimento biexponencial.

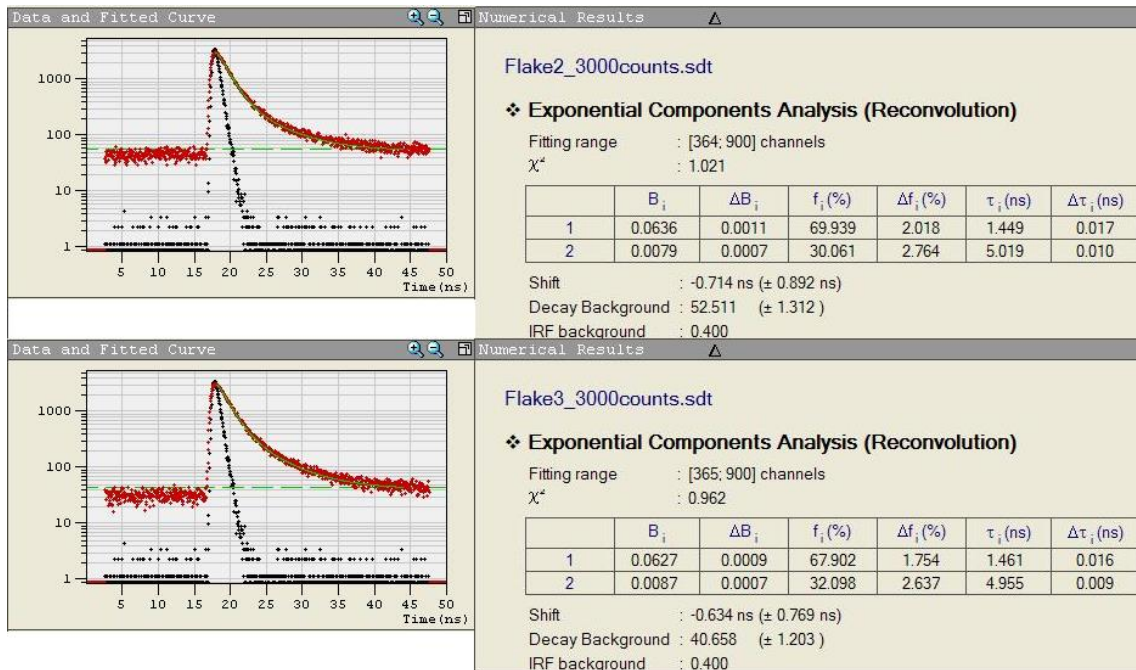


Figura 35: Decaimento de dois flakes de GOK.

Tabela 3: Tempos de vida e pesos do tempo de vida do GOK.

$\tau_1(\text{ns})$	B_1	$\tau_2(\text{ns})$	B_2
1.500	67,03	5.900	32,97

Widefield

Imagens SOFI de fluorescência em widefield do GOK foram obtidas e estão apresentadas na Figura 36. Novamente, possível observar uma maior fluorescência partindo da borda do material, muito similar ao que foi observado nas imagens de microscopia confocal.

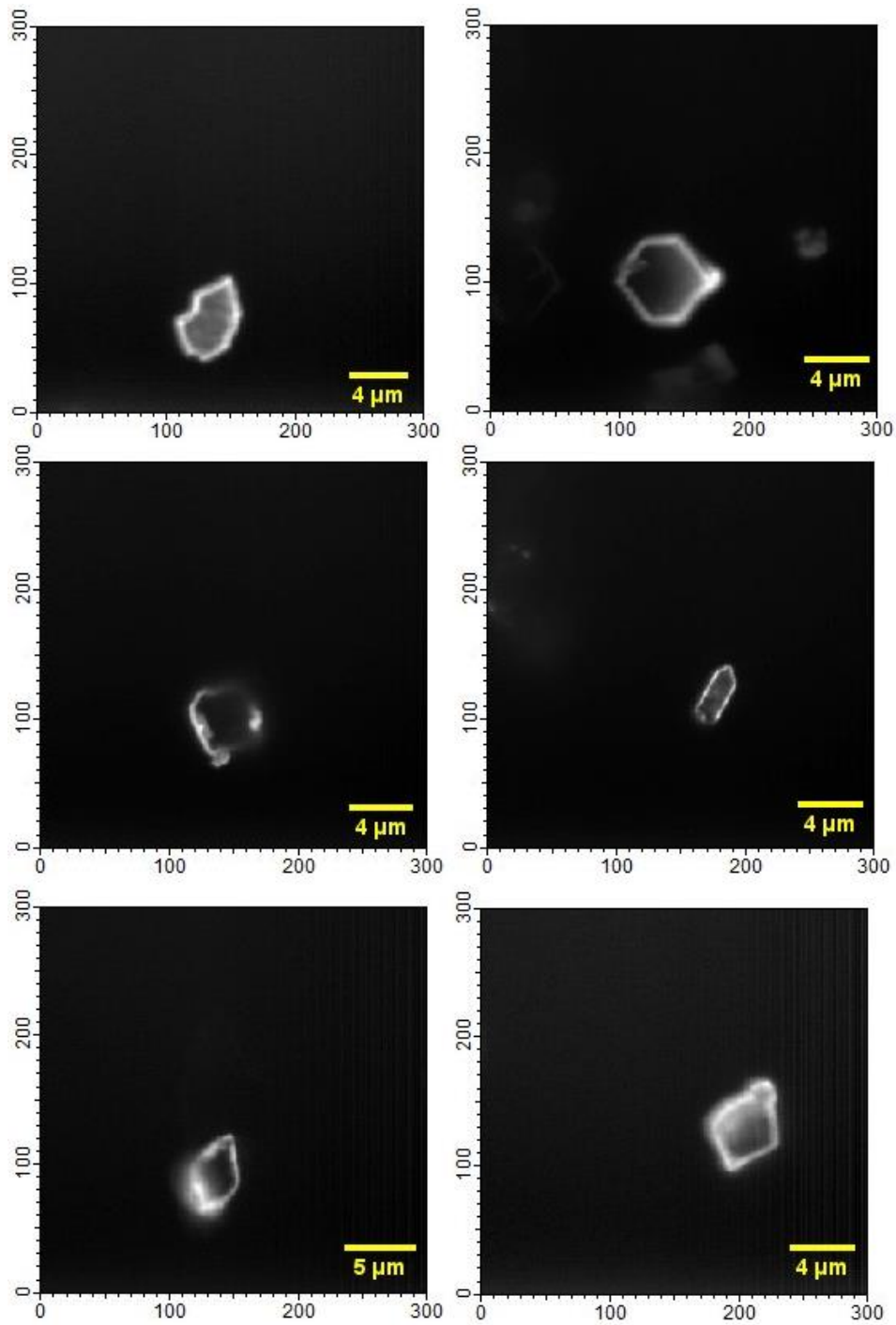


Figura 36: SOFI de segunda ordem de GOK utilizando excitação em 405 nm, com tempo de aquisição de 7ms, com aumento de 1,6X e resolução de 300x300 pixels.

Conclusões

GO foi preparado através do método de Hummer modificado, e a partir desse GO como precursor foi sintetizado um GO modificado com grupos benzimidazol substituído. Ambos os materiais foram estudados através de diferenças técnicas de caracterização, em busca de compreender suas propriedades espectroscópicas, com ênfase em como a fluorescência desse material se diferencia. O espectro FTIR-ATR do GO apresentou resultados típicos de estiramento dos grupos presentes no material, estiramento O-H (banda larga entre $3600 - 3000 \text{ cm}^{-1}$), 1716 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} e 995 cm^{-1} , indicando a presença de C=O, C=C e C-O-C, respectivamente. Da mesma forma o espectro FTIR-ATR de GOK apresenta esses grupos funcionais com a presença de estiramento dos grupos nitrila ($\text{C}\equiv\text{N}$, 2218 cm^{-1}), amina aromática (C-N, 1261 cm^{-1}), estiramento C=O de éster (1733 cm^{-1}), indicando a formação de benzimidazol substituído. Imagens TEM foram analisadas, podendo observar regiões escuras no GOK, devido à modificação química que ocorreu induzindo uma maior densidade atômica que resulta em um contraste no mapa das imagens. Os espectros Raman apresentam formas diferentes, o de GOK apresenta novos picos associados à anéis aromáticos e nitrilas. As análises XRD dos materiais apresentam resultados diferentes, novo picos foram formados em GOK. Os espectros de emissão das micropartículas foram obtidos e notou-se uma diferença marcante no comprimento de onda máximo da emissão, sendo este 600 nm para GO e 520 nm para GOK. Além disso, foi possível constatar um diferente comportamento da fluorescência entre os dois materiais (GO e GOK) através de microscopia de fluorescência confocal e de campo largo. Foi possível observar uma maior emissão do material modificado quimicamente na periferia das micropartículas, região onde a reação ocorreu predominantemente. A dinâmica de decaimento da fluorescência foi distinta entre os materiais; o GO possui decaimento rápido com um tempo de vida normalizado de $0,3 \text{ ns}$ quando excitado em 473 nm na borda da absorção. Por outro lado, o GOK apresentou um decaimento de fluorescência mais longo, com o tempo de vida médio de 4.400 ns bem mais longo. Todos esses resultados comprovam e atestam a diferenciação do novo material emissivo GOK em relação ao GO.

Referências

- ¹BAO, H.; PAN, Y.; PING, Y.; SAHOO, N. G.; WU, T.; LI, L.; LI, J.; GAN, L. H. Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. **Small**, Weinheim, v. 7, n. 11, p. 1569–1578, Jun. 2011.
- ²BOUŠA, M.; FRANK, O.; JIRKA, I.; KAVAN L. In situ raman spectroelectrochemistry of graphene oxide. **Physica Status Solidi (B): basic research**, Weinheim, v. 250, n. 12, p. 2662–2667, Nov. 2013.
- ³BRISEBOIS, P. P.; KUSS, C.; SCHOUGAARD, S. B.; IZQUIERDO, R.; SIAJ, M. New insights into the Diels-Alder Reaction of graphene oxide. **Chemistry: a european journal**, Weinheim v. 22, n. 17, p. 5849–5852, Abr. 2016.
- ⁴BRISEBOIS, P. P.; SIAJ, M. Harvesting graphene oxide-years 1859 to 2019: a review of its structure, synthesis, properties and exfoliation. **Journal of Materials Chemistry C**, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 1517-1547, Nov. 2019.
- ⁵CHEN, J.; YAO, B.; SHI, G. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. **Carbon**, Lexington, v. 64, p. 225-229, Jul. 2013.
- ⁶CHIMENEZ, T. A.; GEHLEN M. H.; MARABEZI, K.; CURVELO, A. A. S. Characterization of sugarcane bagasse by autofluorescence microscopy. **Cellulose**, Dordrecht, v. 21, n. 1, p. 653-664, Dec. 2014.
- ⁷COLLINS, W. R.; LEWANDOWSKI, W.; SCHMOIS, E.; WALISH, J.; SWAGER, T. M. Claisen rearrangement of graphite oxide: a route to covalently functionalized graphenes. **Angewandte Chemie - International Edition**, Weinheim, v. 50, n. 38, p. 8848–8852, Sept. 2011.
- ⁸COLLINS, W. R.; SCHMOIS, E.; SWAGER, T. M. Graphene oxide as an electrophile for carbon nucleophiles. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 47, n. 31, p. 8790–8792, Aug. 2011.
- ⁹DIMIEV, A. M.; TOUR, J. M. Mechanism of graphene oxide formation. **ACS Nano**, Washington, v. 8, n. 3, p. 3060–3068, Mar. 2014.
- ¹⁰DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 39, n. 1, p.228-240, Jan. 2010.
- ¹¹DREYER, D. R.; TODD, A. D.; BIELAWSKI, C. W. Harnessing the chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 43, n. 15, p. 5288-5301, May 2014.
- ¹²EIGLER, S.; DOTZER, C.; HOF, F.; BAUER, W.; HIRSCH, A. Sulfur species in graphene oxide. **Chemistry: a european journal**, Weinheim, v. 19, n. 29, p. 9490–9496, Jul. 2013.
- ¹³EIGLER, S.; DOTZER, C.; HIRSCH, A. Visualization of defect densities in reduced graphene oxide. **Carbon**, Lexington, v. 50, n. 10, p. 3666–3673, Aug. 2012.
- ¹⁴EIGLER, S.; HIRSCH, A. Chemistry with graphene and graphene oxide - Challenges for synthetic chemists. **Angewandte Chemie - International Edition**, Weinheim, v. 53, n. 30, p. 7720-7738, Jul. 2014.

- ¹⁵ERICKSON, K. et al. Determination of the local chemical structure of graphene oxide and reduced graphene oxide. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 22, n. 40, p. 4467–4472, Oct. 2010.
- ¹⁶GEHLEN, M. H.; FOLTRAN, L. S.; KIENLE, D. F.; SCHWARTZ, D. K. Single-molecule observations provide mechanistic insights into bimolecular Knoevenagel amino catalysis. **Journal of Physical Chemistry Letters**, Washington, v. 11, n. 22, p. 9714–9724, Nov. 2020.
- ¹⁷GEORGAKILAS, V.; OTYEPKA, M.; BOURLINOS, A. B.; CHANDRA, V.; KIM, N.; KEMP, K. C.; HOBZA, P.; ZBORIL, R.; KIM, K. S. Functionalization of graphene: covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. **Chemical Reviews**, Washington, v. 112, n. 11, p. 6156-6214, Sept. 2012.
- ¹⁸KUDIN, K. N.; OZBAS, B.; SCHNIEPP, H. C.; PRUD'HOMME, R. K.; AKSAY, I. A.; CAR, R. Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets. **Nano Letters**, Washington, v. 8, n. 1, p. 36-41, Dec. 2007.
- ¹⁹LAUER, M. H.; GEHLEN, M. H.; JESUS, K.; BERLINCK, R. G. S. Fluorescence spectroscopy and confocal microscopy of the mycotoxin citrinin in condensed phase and hydrogel films. **Journal of Fluorescence**, New York, v. 24, n. 3, p. 745-750, Jan 2014.
- ²⁰LENCIONE, D.; GEHLEN, M. H.; TRUJILLO, L. N.; LEITAO, R. C. F.; ALBUQUERQUE, R. Q. The spatial distribution of the photostability of thionine in zeolite L nanochannels investigated by Photobleaching Lifetime Imaging Microscopy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, Heidelberg, v. 15, n. 3, p. 398-404, Feb. 2016.
- ²¹LINO, A. M.; GEHLEN, M. H. Styryl dye formation promoted by catalytic centers of piperazine bound to a silica surface traced by single molecule fluorescence microscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 19, n. 31, p. 20984-20990, Jul. 2017.
- ²²MANORATNE, C. H.; ROSA, S. R. D.; KOTTEGODA, I. R. M. XRD-HTA, UV Visible, FTIR and SEM interpretation of reduced graphene oxide synthesized from high purity vein graphite. **Material Science Research India**, Bhopal, v. 14, n. 1, p. 19–30, Jun. 2017.
- ²³MUNOZ, J. A. H.; JONES JUNIOR, J.; SILVA, F. M. Radziszewski reaction: an elegant, easy, simple and efficient method to synthesise imidazoles. **Current Organic Synthesis**, Sharjah, v. 11, n. 6, p. 824-834, 2014.
- ²⁴ROURKE, J. P.; PANDEY, P. A.; MOORE, J. J.; BATES, M.; KINLOCH, I. A.; YOUNG, R. J.; WILSON, N. R. The real graphene oxide revealed: stripping the oxidative debris from the graphene-like sheets. **Angewandte Chemie - International Edition**, Weinheim, v. 50, n. 14, p. 3173–3177, Mar. 2011.
- ²⁵SABATINI, C. A.; GEHLEN, M. H. Enzymatic hydrolysis of quinizarin diester by lipase in silica nanoparticles investigated by fluorescence microscopy. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 16, n. 6, p. 2093-2100, May 2014.
- ²⁶SHANG, J.; MA, L.; LI, J.; AI, W.; YU, T.; GURZADYAN, G. G. The origin of fluorescence from graphene oxide. **Scientific Reports**, London, v. 2, n. 792, p. 1-8, Nov. 2012.

- ²⁷SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of instrumental analysis**. 6. ed. Pacific Grove: Brooks/Cole, 2006. 1011 p.
- ²⁸STOBINSKI, L.; LESIAK, B.; MALOLEPSZY, A.; MAZURKIEWICZ, M.; MIERZWA, B.; ZEMEK, J.; JIRICEK, P.; BIELOSHAPKA, I. Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, Amsterdam, v. 195, p. 145–154, Jul. 2014.
- ²⁹YANG, L.; ZHANG R.; LIU, B.; WANG, J.; WANG, S.; Han M.; ZHANG, Z. π -Conjugated carbon radicals at graphene oxide to initiate ultrastrong chemiluminescence. **Angewandte Chemie - International Edition**, Weinheim, v. 53, n. 38, p. 10109–10113, Sept. 2014.
- ³⁰ZAABA, N. I.; FOO, K. L.; HASHIM, U.; TAN, S. J.; LIU, W.; VOON, C. H. Synthesis of graphene oxide using modified hummers method: solvent influence. **Procedia Engineering**, Amsterdam, v. 186, p. 469-477, 2017.
- ³¹ZHANG, B.; CHEN, Y.; XU, L.; ZENG, L.; HE, Y. KANG, E., ZHANG, J. Growing Poly(N-vinylcarbazole) from the surface of graphene oxide via RAFT polymerization. **Journal of Polymer Science, Part A: polymer chemistry**, Hoboken, v. 49, n. 9, p. 2043–2050, Mar. 2011.
- ³²ZHENG, P.; WU, N. Fluorescence and sensing applications of graphene oxide and graphene quantum dots: a review. **Chemistry - an asian journal**, Weinheim, v. 12, n. 18, p. 2343-2053, Sept. 2017.
- ³³ZHU, Y.; MURALI, S.; CAI, W.; LI, X.; SUK, J. W.; POTTS, J. R.; RUOFF, R. S. Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 22, n. 35, Aug. 2010.